



ALINE BARNABÉ

**“PREVALÊNCIA DAS DEFICIÊNCIAS DE ÁCIDO
FÓLICO, VITAMINA B₁₂ E FERRO EM DIVERSOS
GRUPOS DA POPULAÇÃO BRASILEIRA, APÓS O
PROGRAMA DE FORTIFICAÇÃO ADOTADO PELA
ANVISA”**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

ALINE BARNABÉ

**“PREVALÊNCIA DAS DEFICIÊNCIAS DE ÁCIDO FÓLICO,
VITAMINA B₁₂ E FERRO EM DIVERSOS GRUPOS DA
POPULAÇÃO BRASILEIRA, APÓS O PROGRAMA DE
FORTIFICAÇÃO ADOTADO PELA ANVISA”**

Orientador (a): Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Co-orientador (a): Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de título de Doutora em Ciências Médicas, área de concentração Ciências Biomédicas.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE BARNABÉ E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. NELCI FENALTI HÖEHR**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B252p Barnabé, Aline, 1982-
Prevalência das deficiências de ácido fólico, vitamina B12 e ferro em diversos grupos da população brasileira, após o programa de fortificação adotado pela ANVISA / Aline Barnabé. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Nelci Fenalti Höehr.
Coorientador: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Ácido fólico. 2. Vitamina B12. 3. Ferro. 4. Homocisteína. 5. Polimorfismo. I. Höehr, Nelci Fenalti, 1947-. II. Annichino-Bizzacchi, Joyce Maria, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Prevalence of folic acid, vitamin B12 and iron deficiencies in several groups of Brazilian population in the post fortification era

Palavras-chave em inglês:

Folic acid
Vitamin B12
Iron
Homocysteine
Polimorphism

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Titulação: Doutora em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Nelci Fenalti Höehr [Orientador]
Elvira Maria Guerra Shinohara
Sérgio Paulo Bydlowski
Fernanda Loureiro de Andrade Orsi
Erich Vinicius de Paula

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ALINE BARNABÉ

Orientador (a) PROF(A). DR(A). NELCI FENALTI HOEHR

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). JOYCE MARIA ANNICHINO BIZZACCHI

MEMBROS:

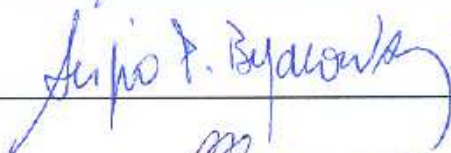
1. PROF(A). DR(A). NELCI FENALTI HOEHR



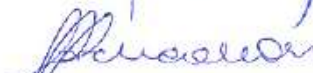
2. PROF(A). DR(A). ELVIRA MARIA GUERRA SHINOHARA



3. PROF(A). DR(A). SÉRGIO PAULO BYDŁOWSKI



4. PROF(A). DR(A). FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI



5. PROF(A). DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA



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

Data: 26 de fevereiro de 2014

Dedicatória

A Deus por ter iluminado meu caminho e por ter me concedido mais esta conquista.

Aos meus pais, Clélio e Maria Aparecida, que sempre apoiaram as minhas decisões.

Ao Lucas, por me amar acima de tudo.

Aos meus irmãos, Paula e Fernando, pela amizade e companheirismo.

Ao César, por me compreender e por estar ao meu lado sempre.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dra. Nelci Fenalti Höehr e Dra. Joyce M. Annichino-Bizzacchi, pela orientação, ensinamentos e pela confiança depositada para a realização deste estudo.

À Ana Cláudia que muito contribuiu para a realização deste estudo.

Ao Luis Fernando e Eloá que contribuíram para o recrutamento dos voluntários.

Aos amigos do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro da UNICAMP pelo apoio e carinho.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia e Hematologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

À Profa. Dra. Vânia D'Almeida da Universidade Federal de São Paulo, que tornou possível mais uma vez a realização da dosagem de homocisteína.

Aos participantes deste estudo, sem os quais seria impossível a realização do mesmo.

Gostaria também de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste estudo.

A Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

“Sempre parece impossível até que seja feito”

Nelson Mandela



RESUMO

Folato, vitamina B₁₂ e ferro são nutrientes essenciais, cujas deficiências afetam indivíduos em todas as faixas etárias, sendo consideradas um problema de Saúde Pública no mundo. Níveis reduzidos de folato e vitamina B₁₂ podem estar associados com níveis elevados de homocisteína (Hcy), e que eventualmente resultam em complicações. Entretanto, no Brasil, poucos estudos avaliaram a prevalência dessas deficiências, principalmente de folato e vitamina B₁₂, após a fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro. Os objetivos do presente estudo foram: avaliar a prevalência das deficiências de folato, vitamina B₁₂ e ferro em idosos, crianças, gestantes e lactantes após a fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro adotado pela ANVISA em 2004; e investigar a contribuição de polimorfismos genéticos sobre os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy nestes indivíduos. Os indivíduos foram recrutados em Centros de Saúde da cidade de Campinas entre 2006 a 2007. No total, 719 indivíduos incluindo, 262 idosos, 106 crianças, 291 gestantes e 60 lactantes foram incluídos. As concentrações destes nutrientes foram mensuradas por eletroquimioluminescência; a dosagem de Hcy foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); e os polimorfismos foram investigados por PCR-RFLP. Os resultados mostraram que a prevalência das deficiências de folato, vitamina B₁₂ e ferro no grupo total de indivíduos foram de 0,3%, 5,3% e 12,6%, respectivamente. Praticamente não se observou a deficiência de folato, presente apenas em um idoso e uma gestante, enquanto que a deficiência de vitamina B₁₂ foi prevalente em gestantes (8,9%) e idosos (4,2%). Além disso, a deficiência de ferro e anemia ferropriva foram prevalentes em crianças (9,9% e 4,9%, respectivamente), e gestantes (25,1% e

5,5%, respectivamente). A hiperhomocisteinemia esteve presente principalmente em idosos (34,3%). Com relação aos polimorfismos, apenas as gestantes carreadoras dos alelos CT+TT do polimorfismo no gene MTHFR (C677T) mostraram níveis reduzidos de folato ($p=0,030$). Através da análise múltipla, observamos que os níveis de Hcy foram determinados principalmente pelo folato ($p<0,001$), vitamina B₁₂ ($p<0,001$), gênero ($p<0,001$), idade ($p<0,001$) e o polimorfismo no gene RFC1 A80G ($p=0,011$) em idosos; vitamina B₁₂ ($p= 0,011$) em crianças e folato ($p=0,002$) em gestantes. Nossos resultados demonstraram que na população avaliada, após 2 anos do início da fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro, a deficiência de folato é praticamente inexistente, ao contrário da deficiência de ferro e de vitamina B₁₂. A elevada prevalência da deficiência de vitamina B₁₂ em idosos e gestantes deve ser valorizada na prática, devido ao risco de complicações. O mesmo deve ser observado em relação à deficiência de ferro, prevalente em crianças e gestantes. Portanto, medidas como suplementação e a dosagem desses nutrientes, para grupos populacionais de risco, devem ser implementados em políticas de Saúde Pública. Além disso, a hiperhomocisteinemia observada em idosos pode ser um fator de risco ou um marcador de doença arterial, que é comum nesses indivíduos.



ABSTRACT

Folate, vitamin B-12 and iron are essential nutrients, whose deficiencies are considerable public health problems worldwide, affecting all age groups. Low levels of folate and vitamin B12 have been associated with high concentrations of homocysteine (Hcy) and can lead to complications. In Brazil, a few studies evaluated the prevalence of these nutrients, especially, folate and vitamin B12, post acid folic and iron fortification era. The aim of this study was to assess folate, vitamin B12 and iron deficiencies in distinct Brazilian populations including elderly, children, pregnant and lactating women, after the initiation of folic acid and iron fortification by Brazilian authorities. We also investigated the contribution of polymorphisms on folate, vitamin B12 and Hcy levels in these individuals. Folate, vitamin B12 and ferritin levels were measured by chemiluminescence immunoassays, and Hcy levels were determined by high-performance liquid chromatography. Genotype analyses of RFC1 A80G, GCPII C1561T and MTHFR C677T polymorphisms were performed by PCR-RFLP. The individuals were recruited from primary care centers in Campinas – Brazil, between 2006 - 2007. In total 719 individuals, including elderly (262), children (106), pregnant women (291) and lactating women (60) were included. The overall prevalence of low folate, vitamin B-12 and iron status was 0.3%, 5.3% and 12.6%, respectively. Folate deficiency was practically inexistent and was observed only in elderly (n=1) and pregnant women (n=1), whereas vitamin B12 deficiency was frequent in pregnant women (8.9%) and elderly (4.2%). Moreover, iron deficiency and iron deficiency anemia were prevalent in children (9.9% and 4.9%, respectively) and pregnant women (25.1% and 5.5%, respectively). Plasma Hcy concentrations were

significantly higher in the elderly (34.3%). Pregnant women carrying the MTHFR 677T allele (CT+TT) showed lower serum folate levels ($p=0.030$), but none of the polymorphisms investigated in this study affected folate, vitamin B12 and Hcy levels in elderly, children and lactating women. After a multivariate analysis, Hcy levels were predicted by variables such as folate ($p<0.001$), vitamin B12 ($p<0.001$), gender ($p<0.001$), age ($p<0.001$) and RFC1 A80G polymorphism ($p=0,011$) in elderly; vitamin B12 ($p= 0.011$) in children; and folate ($p = 0.002$) in pregnant women. Our results demonstrated that folate deficiency is practically inexistent in this population, two years after the initiation of folic acid fortification, in contrast to vitamin B12 and iron deficiency. The high prevalence of vitamin B12 deficiency in elderly and pregnant women is relevant due to health complications. Supplementation and measure of nutrients in some groups of the population should be indicated by Public Health's policies. Furthermore, hiperhomocysteinemia in elderly can be a risk factor or a marker of arterial disease, which is common in these individuals.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido fólico
Alb	Albumina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBM	Borda da membrana intestinal
BLM	Membrana basolateral
Cbl	Cobalamina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Dcytb	Ferroredutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DTM-1	Transportador de metal divalente-1
DTN	Defeitos do tubo neural
GCPII	Glutamato carboxipeptidase II
Hb	Hemoglobina
HCP-1	Proteína transportadora do heme-1
Hcy	Homocisteína
Fe	Ferro
HFE	Proteína da hemocromatose
IDR	Ingestão diária recomendada
IF	Fator intrínseco

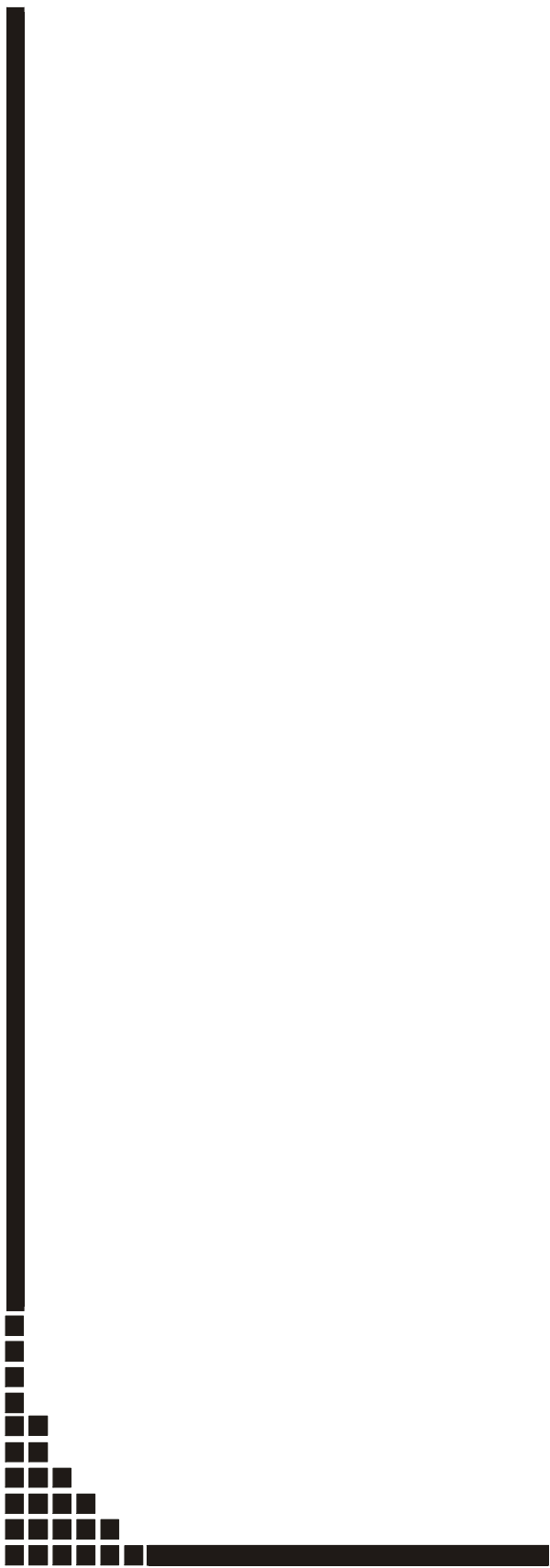
MMA	Ácido metilmalônico
MS	Metionina sintase
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
Nu	Núcleo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
P	Proteína P
pb	Par de base
PCFT	Transportador de folato acoplado a prótons
PTFM	Proteína transportadora de folato associado à membrana
R	Proteína R
RFC1	Carreador de folato reduzido
TC	Transcobalamina
TfR	Receptor da transferrina
THF	Tetrahidrofolato
UV	Luz ultravioleta
5-MTHF	5-metiltetrahidrofolato
5,10-MTHF	5,10-metilenotetrahidrofolato

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos do grupo de estudo. _____	83
Tabela 2. Níveis de folato, vitamina B12, homocisteína, ferritina e hemoglobina nos diferentes grupos de estudo. _____	84
Tabela 3. Prevalência das deficiências de folato e vitamina B12, e hiperhomocisteinemia nos diferentes grupos de estudo. _____	86
Tabela 4. Prevalência da deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva. _____	87
Tabela 5. Uso de suplementação e sua relação com níveis de folato, vitamina B12, ferritina e Hcy nos grupos de estudo. _____	89
Tabela 6. Prevalência dos genótipos para os polimorfismos nos genes RFC1 A80G, GCPII C1561T e MTHFR C677T. _____	91
Tabela 7. Níveis de folato, vitamina B12 e Hcy de acordo com o polimorfismo no gene RFC1 A80G em idosos, crianças, gestantes e lactantes. _____	93
Tabela 8. Níveis de folato, vitamina B12 e Hcy de acordo com o polimorfismo no gene GCPII C1561T em idosos, crianças, gestantes e lactantes. _____	94
Tabela 9. Níveis de folato, vitamina B12 e Hcy de acordo com o polimorfismo no gene MTHFR C677T em idosos, crianças, gestantes e lactantes. _____	95
Tabela 10. Associações entre as variáveis clínicas, bioquímicas e genéticas sobre os níveis de homocisteína em idosos, crianças e gestantes. _____	97

Figura 1. Metabolismo do folato e ácido fólico – aspectos fisiológicos _____	33
Figura 2. Metabolismo da vitamina B ₁₂ e as causas da deficiência _____	41
Figura 3. Interações metabólicas da glutamato carboxipeptidase II (GCP II), carreador de folato reduzido (RFC1), e metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) no intestino e no fígado _____	46
Figura 4. Mecanismo de absorção intestinal de ferro _____	49
Figura 5. Visualização da digestão dos produtos da PCR pela enzima <i>HhaI</i> em gel de agarose para o polimorfismo A80G no gene RFC1 _____	73
Figura 6. Visualização da digestão dos produtos da PCR pela enzima <i>AccI</i> em gel de agarose para o polimorfismo C1561T no gene GCP II _____	74
Figura 7. Visualização da digestão dos produtos da PCR pela enzima <i>HinfI</i> em gel de agarose para o polimorfismo C677T no gene MTHFR _____	76

1. Introdução	29
1.1. Ácido fólico e Folato	31
1.2. Vitamina B ₁₂	39
1.3. Interação gene-nutriente	45
1.4. Ferro	48
2. Justificativa	55
3. Objetivos	59
4. Materiais e Métodos	63
4.1. Causuística	65
4.1.1. Participantes do estudo	66
4.1.2. Critérios de Exclusão	66
4.2. Coleta de Sangue	66
4.3. Determinação de ácido fólico e vitamina B ₁₂	67
4.4. Determinação dos níveis de ferritina e hemoglobina	68
4.5. Determinação dos níveis de homocisteína	68
4.6. Extração de DNA de sangue periférico	69

4.7. Análise de polimorfismos	71
4.7.1. Polimorfismo A80G no gene da RFC1	72
4.7.2. Polimorfismo C1561T no gene da GCPII	73
4.7.3. Polimorfismo C677T no gene da MTHFR	75
4.8. Definição das variáveis	76
4.9. Análise Estatística	77
5. Resultados	79
6. Discussão	99
7. Conclusão	119
8. Referências	123
9. Anexos	139
10. Apêndice	143



1. INTRODUÇÃO

1.1. Ácido fólico e Folato

Folato (vitamina B₉), em termos gerais é uma vitamina solúvel em água, sendo encontrado naturalmente em vegetais, legumes, ovos, fígado e algumas frutas cítricas. O termo “ácido fólico” refere-se especificamente à forma mais estável da vitamina, a qual é utilizada em suplementos, multivitamínicos e alimentos fortificados, tais como, pães, massas, arroz e cereais. Biologicamente, o folato é uma vitamina essencial na biossíntese de DNA e RNA, e necessária para a síntese de metionina a partir da homocisteína (Hcy) [1-3].

O folato e o ácido fólico, quando ingeridos, são absorvidos no duodeno e jejuno, após a conversão do folato, um poliglutamato, pela enzima glutamato carboxipeptidase II (GCP II) em monoglutamato, pois o ácido fólico já é uma forma monoglutâmica. Ambos os micronutrientes compartilham a mesma via de absorção (mecanismo de transporte ativo, saturável e pH dependente). A absorção desta vitamina é mediada por duas proteínas expressas na membrana apical do enterócito: o carreador de folato reduzido (RFC) com funcionamento em pH neutro, e o transportador de folato acoplado a prótons (PCFT) – dependente de pH ácido (Figura 1) [4-6].

No plasma, a forma mais abundante do folato é o 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) que circula ligado à albumina. No entanto, o transporte do folato através dos tecidos ocorre via proteína transportadora de folato associado à membrana (PTFM) [6].

Após a absorção intestinal, o folato é transportado para o fígado, apresentando os seguintes destinos:

- ✓ Pode ser novamente convertido em poliglutamato para armazenamento nos hepatócitos;
- ✓ Pode ser secretado pela bile, retornando ao duodeno e jejuno, e subsequentemente ser reabsorvido, completando o ciclo entero-hepático;
- ✓ Os monoglutamatos podem ser distribuídos na circulação sistêmica para atender as exigências do organismo [4].

A biodisponibilidade (eficiência da absorção) do ácido fólico é maior do que a do folato proveniente dos alimentos. Quando consumido em suplementos, a biodisponibilidade do ácido fólico atinge 100%, mas quando consumido em alimentos fortificados a biodisponibilidade é de aproximadamente 85%. No entanto, a biodisponibilidade do folato presente nos alimentos naturais depende da forma em que ele está presente (monoglutamato ou poliglutamato) e da presença de fatores dietéticos e não dietéticos, mas em média, sua biodisponibilidade é de aproximadamente 50% [6, 7].

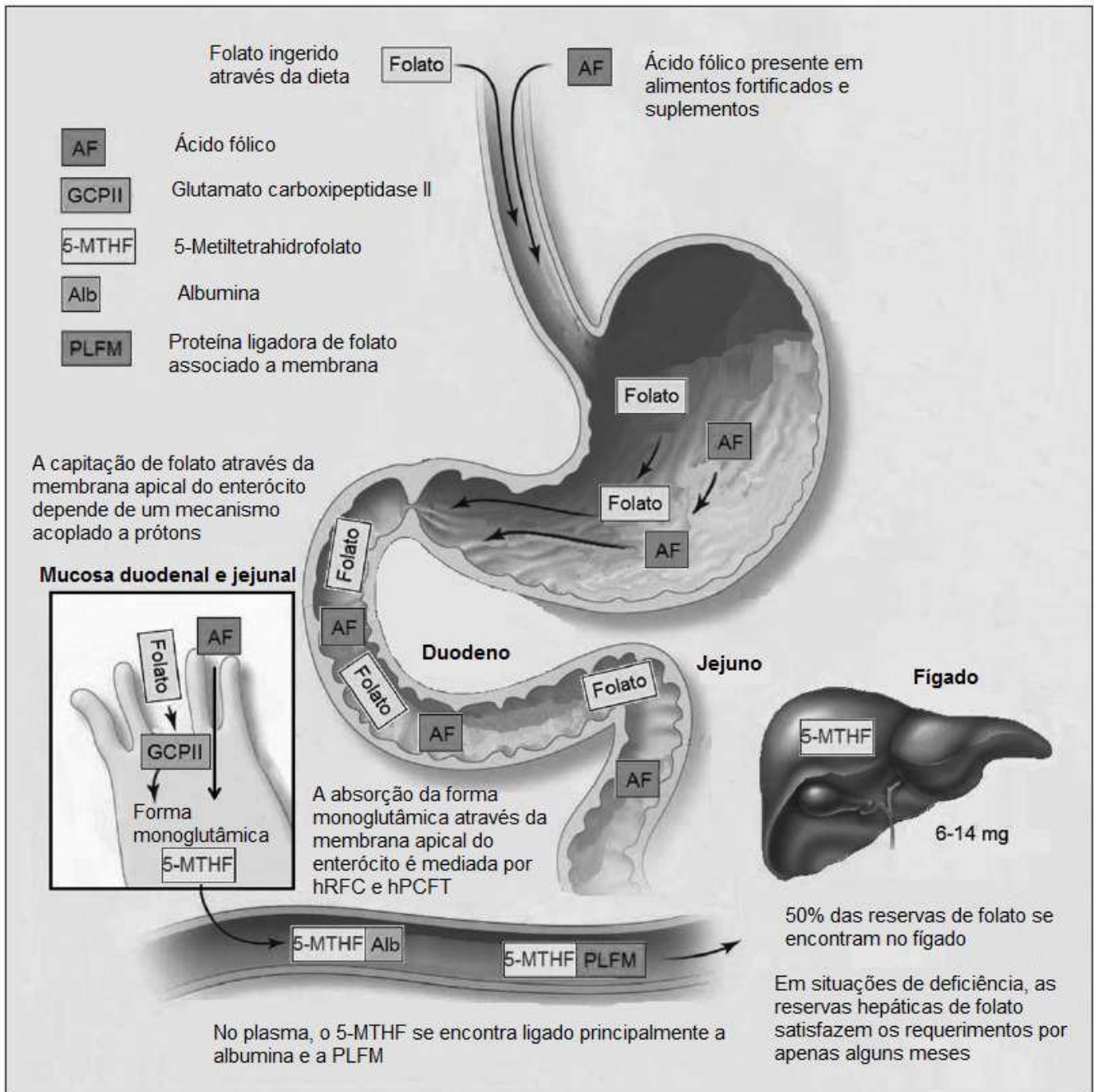


Figura 1. Metabolismo do folato e ácido fólico – aspectos fisiológicos. Adaptado de Brito A. *et al.*, 2012 [6].

A ingestão diária recomendada (IDR) de folato para adultos é de 400 µg/dia, e em crianças de 0,5 a 6 anos varia de 80 a 200 µg/dia. Entretanto para gestantes e lactantes a IDR é muito maior (600 e 500 µg/dia, respectivamente) [8].

Apesar de o folato ser armazenado principalmente no fígado, sua concentração pode ser mensurada na urina, soro, plasma ou nos eritrócitos [9]. No soro, a concentração de folato é um indicador confiável da ingestão recente e reflete a forma circulante de folato que é transportado para os tecidos, sendo esta a forma mais utilizada para avaliar a concentração de folato no sangue. Por outro lado, o folato presente nos eritrócitos reflete alterações na ingestão a longo prazo, pois os eritrócitos apresentam um tempo de vida de 120 dias e acumulam o folato apenas durante a eritropoiese [9, 10].

Ao longo da última década, o interesse sobre os benefícios do ácido fólico na saúde aumentou consideravelmente [5]. Uma vez que a deficiência desta vitamina pode causar graves consequências, tais como: anemia, doenças cardiovasculares, defeitos do tubo neural (DTN) e congênitos, complicações durante a gestação e disfunção cognitiva [6, 8, 11]. Por outro lado, estudos epidemiológicos sugerem que um efeito inverso está associado a alguns tipos de câncer: colorretal, cervical, pulmonar, esôfago, pâncreas e mama [12-15].

A principal causa da deficiência de folato é devido a uma dieta inadequada, sendo mais comum em países em desenvolvimento. Esta deficiência também pode ocorrer em situações nas quais a necessidade fisiológica está aumentada, incluindo, gestação e crescimento, bem como em populações nas quais a prevalência de anemia hemolítica é alta. Outras causas comuns são: má

absorção, idade avançada, uso de alguns medicamentos (antagonistas de folato e anticonvulsivantes), alcoolismo e defeitos genéticos [16, 17].

A dieta inadequada de folato primeiramente ocasiona uma diminuição do folato no soro, e em seguida, um decréscimo na concentração de folato nos eritrócitos, e conseqüentemente pode resultar num aumento nos níveis de Homocisteína (Hcy) [18].

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as concentrações que definem a deficiência de folato são: < 4 ng/mL para níveis de folato no soro, e < 151 ng/mL para níveis de folato nos eritrócitos [11]. O quadro 1 demonstra os principais indicadores da concentração de folato.

A prevalência desta deficiência continua incerta devido à falta de dados (quadro 2). Apenas alguns países têm dados nacionais ou regionais sobre os níveis de folato [19, 20].

Uma das estratégias adotadas para a prevenção da deficiência de folato é a fortificação de farinhas de trigo e milho com ácido fólico e ferro, que tornou-se obrigatória em alguns países. O principal objetivo dos programas de fortificação é reduzir a ocorrência de DTN. Entretanto, o benefício adicional para a população geral em reduzir o risco de doenças vasculares através da diminuição da concentração de Hcy também é relevante [21].

Quadro 1. Indicadores para avaliação da concentração de folato [19].

Indicador	Amostra	Grupo populacional	Cut-off para definir a deficiência de folato	Comentários
Folato	Soro	Aplicado para todos os grupos	< 4ng/mL	A concentração de folato no soro é o indicador mais utilizado para a avaliação do seu status
Folato	Eritrócitos	Aplicado para todos os grupos	< 151 ng/mL	A concentração de folato nos eritrócitos reflete o status de folato a longo prazo e o armazenamento de folato nos tecidos
Hcy	Plasma	Aplicado para todos os grupos	12 – 16 µmol/L	Hcy é um bom preditor da concentração de folato, e sua concentração está elevada quando os níveis de folato estão inadequados. Também pode ser influenciada pela idade, raça e insuficiência renal

Fonte: Adaptado de *Guidelines on Food fortification with micronutrients*.

Nos Estados Unidos a fortificação de alimentos com ácido fólico foi introduzida em 1998 e desde então, tem demonstrado um aumento significativo nas concentrações de folato na população americana, eliminando praticamente a deficiência desta vitamina. Além disso, a concentração de Hcy plasmática mostrou-se diminuída após a fortificação, e aproximadamente 80% da população apresentou concentrações desejáveis [22]. Contudo, de acordo Pfeiffer CM *et al.*, mesmo após o programa de fortificação, o monitoramento dos níveis de folato no

sangue continua extremamente importante, não apenas em gestantes e mulheres em idade reprodutiva, mas também em crianças e pessoas de todas as idades [22, 23].

No Brasil, a deficiência de folato foi avaliada em alguns grupos de indivíduos, principalmente gestantes e crianças. Os resultados demonstraram que nesses grupos específicos a deficiência de folato foi prevalente, sendo considerada um problema de Saúde Pública para a nossa população [23-28]. Assim, a ANVISA instituiu a obrigatoriedade da fortificação de farinhas de milho e trigo com ácido fólico e ferro (RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002), considerando as recomendações da OMS e da Organização Panamericana de Saúde (OPAS) [29]. Entretanto, a fortificação dos alimentos foi instituída na prática para consumo populacional a partir de 2004.

A fortificação de produtos derivados de grãos e cereais são de 150 µg de ácido fólico para cada 100 g. Este nível de ácido fólico adicionado é considerado como seguro e dificilmente resultará num consumo acima de 1000 µg/dia (limite máximo) em qualquer faixa etária, gênero ou fase da vida. Uma das grandes preocupações é que o consumo de ácido fólico acima deste valor pode mascarar a deficiência de vitamina B₁₂, que ocorre principalmente em pessoas acima de 60 anos [19, 29, 30].

Quadro 2. Deficiência de micronutrientes: prevalência, fatores de risco e consequências [19].

Micronutriente	Prevalência da deficiência	Fatores de risco	Consequências
Folato	Dados insuficientes	Baixa ingestão de frutas, vegetais, legumes e laticínios Má absorção e infecções intestinais por parasitas (<i>Giardia Lamblia</i>); Defeitos genéticos	Anemia megaloblástica; Defeitos de tubo neural e congênitos (fendas orofaciais, defeitos do coração) e complicações na gestação; Níveis elevados de Hcy; Função cognitiva prejudicada; Depressão
Vitamina B₁₂	Dados insuficientes	Baixa ingestão de alimentos de origem animal; Má absorção devido à atrofia gástrica induzida pelo <i>Helicobacter pylori</i> ; Defeitos genéticos	Anemia megaloblástica; A deficiência severa pode causar atraso do desenvolvimento, e disfunção neurológica; Defeitos do tubo neural; Níveis elevados de Hcy; Função cognitiva prejudicada
Ferro	2 bilhões de casos de anemia no mundo; Países em desenvolvimento: 50% em gestantes e crianças ≤ 2 anos e 25-55% em outras mulheres e crianças; Responsável por 50% de todos os casos de anemia; Um bilhão dos casos de anemia é devido à deficiência de ferro	Baixa ingestão de carne/peixe/aves e ingestão aumentada de cereais e legumes; Parto prematuro e baixo peso ao nascimento; Gravidez e adolescência (período onde o requerimento de ferro é elevado); Grandes perdas menstruais; Infecções por parasitas (ancilostomose, esquistossomose, ascaridíase)	Redução da cognição; Metabolismo da vitamina A prejudicado; Anemia; Aumento no risco de mortalidade maternal e infantil

Fonte: Adaptado de *Guidelines on Food fortification with micronutrients*.

O nível de fortificação adotado, não é suficiente para proteger as gestantes do risco de DTN. Neste caso, a quantidade adequada de ácido fólico nos produtos

fortificados seria de 350 µg para cada 100 g. Este nível de fortificação exigiria um monitoramento cuidadoso entre os idosos já que está próximo ao limite máximo de segurança para este grupo [31], e por isso, não é adotado. Assim, durante a gestação é indicada a suplementação com ácido fólico.

No Brasil após um período mínimo da introdução da fortificação dos alimentos com ácido fólico e ferro, poucos estudos avaliaram a concentração de folato, sendo que alguns deles investigaram apenas a ingestão de folato pré e/ou pós-fortificação [32-35].

1.2. Vitamina B₁₂

A vitamina B₁₂ (cobalamina) é uma vitamina essencial solúvel em água, que atua como coenzima na conversão de Hcy à metionina (reação dependente de folato), e na conversão de L-metilmalonil-coenzima A a succinil-CoA. Esta vitamina também é necessária para a síntese de DNA através de sua interação com o metabolismo do folato [36].

Muitos micro-organismos, incluindo algas e bactérias, sintetizam vitamina B₁₂, e constituem a única fonte da vitamina. A vitamina B₁₂ sintetizada por esses micro-organismos é absorvida e incorporada aos tecidos animais, tendo como principais fontes o leite, carne e ovos [8].

O metabolismo da vitamina B₁₂ nos humanos é complexo e requer muitos processos. Entretanto, defeitos em qualquer um deles podem levar a deficiência desta vitamina [37-39].

A vitamina B₁₂ obtida de alimentos de origem animal se encontra ligada a proteína P. Ao alcançar o estômago sofre ação da pepsina e do ácido clorídrico (HCl), os quais promovem a liberação da vitamina B₁₂ da proteína P. Este processo resulta na forma livre da vitamina B₁₂, a qual se liga imediatamente a haptocorrina ou proteína R, que é produzida pelas células salivares e parietais. A proteína R tem como função proteger a vitamina B₁₂ da desnaturação química no estômago. Além disso, as células parietais do estômago também produzem o fator intrínseco (IF); no entanto, sua ligação à vitamina B₁₂ é fraca na presença da proteína R. No duodeno, a proteína R é parcialmente digerida por proteases pancreáticas em pH alcalino, promovendo a liberação da vitamina B₁₂. A vitamina B₁₂, então, se liga ao IF formando o complexo vitamina B₁₂-IF, sendo subsequentemente absorvido por meio de ligações específicas a receptores (cubilina) na mucosa do íleo. Em seguida, a vitamina B₁₂ é transportada via sistema porta através de proteínas de transporte que são conhecidas como transcobalamina I, II e III (TCI, TCII e TCIII). Nas células, o complexo TCII-vitamina B₁₂ é internalizado por endocitose, liberando a vitamina B₁₂ que é convertida enzimaticamente em duas coenzimas: metilcobalamina e adenosilcobalamina (figura 2) [6, 8, 17, 39].

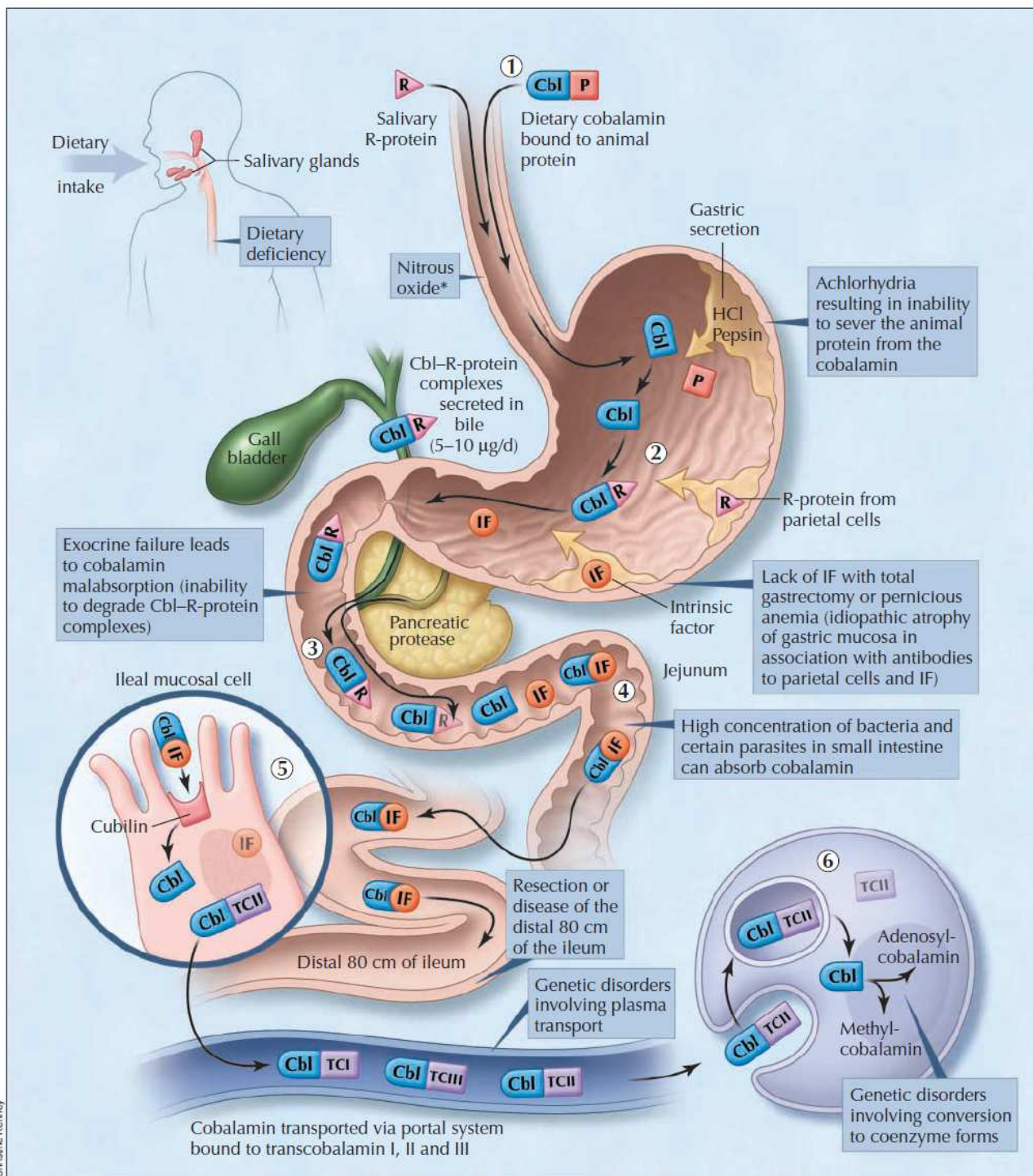


Figura 2. Metabolismo da vitamina B₁₂ e as causas da deficiência. Adaptado de *Andrès et al., 2004 [39]*.

A vitamina B₁₂ é armazenada principalmente no fígado (2 – 3 mg) sob a forma de 5'-deoxiadenosilcobalamina ligada à metilmalonilCoA mutase, enquanto que no plasma a maior parte se encontra sob a forma de metilcobalamina [40].

A biodisponibilidade da vitamina B₁₂ é de aproximadamente 50% a partir de uma dieta normal. Porém, a vitamina B₁₂ sintética (cianocobalamina) que também é encontrada em suplementos e alimentos fortificados, é mais eficientemente absorvida (aproximadamente 60% em baixas doses) [8, 17].

A IDR baseada na quantidade necessária para manter níveis normais de vitamina B₁₂ em adultos é de 2,4 a 2,8 µg/dia dependendo da idade e da condição fisiológica (gravidez e lactação); para crianças e jovens de 1 a 18 anos, a IDR varia de 0,9 a 2,4 µg/dia [8].

A concentração de vitamina B₁₂ é mais comumente avaliada no soro ou plasma. Entretanto, a dosagem de ácido metilmalônico (MMA) na urina ou no plasma é mais específica e sensível, sendo um bom indicador da deficiência desta vitamina. Porém, esta análise é mais difícil e cara em relação à dosagem de vitamina B₁₂. Além do MMA, a Hcy também constitui um bom indicador [19].

A concentração sugerida pela OMS para definir a deficiência de vitamina B₁₂ é de 203 pg/mL [11]. No quadro 3 estão demonstrados os principais indicadores da concentração de vitamina B₁₂.

Dados sobre a prevalência da deficiência de vitamina B₁₂ são insuficientes devido a grande variabilidade nas concentrações usadas para definir a deficiência (quadro 2). Além disso, não existem evidências de que esta deficiência varia entre países e regiões [19]. Entretanto, poucos estudos realizados no Brasil avaliaram

os níveis de vitamina B₁₂ após a fortificação de alimentos com ácido fólico e ferro [33, 35].

Quadro 3. Indicadores para avaliação da concentração de vitamina B₁₂ [19].

Indicador	Amostra	Grupo populacional	Cut-off para definir a deficiência de B ₁₂	Comentários
Vitamina B ₁₂	Soro ou plasma	Aplicado para todos os grupos	< 203 pg/mL	Reflete tanto a ingestão recente como a vitamina armazenada Valores acima do <i>cut-off</i> não necessariamente indicam um estado adequado Em caso de valores marginais, a análise do MMA é indicada
Ácido metilmalônico (MMA)	Soro ou plasma	Aplicado para todos os grupos	> 271 nmol/mL	Aumentado quando o fornecimento de vitamina B ₁₂ está baixo
Hcy	Plasma	Aplicado para todos os grupos	12 – 16 µmol/L	Hcy é um bom preditor da concentração de vitamina B ₁₂ , e sua concentração está elevada quando os níveis de vitamina B ₁₂ estão inadequados Também pode ser influenciada pela idade, raça e insuficiência renal

Fonte: Adaptado de *Guidelines on Food fortification with micronutrients*.

As causas mais comuns da deficiência de vitamina B₁₂ são a dieta inadequada e a má absorção (quadro 3) [17, 19]. Entre as causas de má absorção podemos citar a anemia perniciosa e atrofia gástrica que prejudicam a secreção

de pepsina, ácido clorídrico e fator intrínseco. Além destas causas, defeitos genéticos e o uso de alguns medicamentos também resultam na deficiência desta vitamina [6, 17].

A dieta inadequada é observada em muitos grupos da população, os quais geralmente apresentam uma situação econômica desfavorável [17, 19]. Os adultos representam o grupo de maior risco devido à atrofia gástrica que ocorre principalmente em idosos [6]. Porém, a baixa ingestão da vitamina em lactantes também pode levar a quantidades inadequadas de vitamina B₁₂ no leite materno, e subsequentemente à deficiência da vitamina na criança [19]. Além desses grupos, os vegetarianos também representam um grupo de alto risco em desenvolver a deficiência [6].

As consequências da deficiência de vitamina B₁₂ incluem: anemia megaloblástica e a desmielinização do sistema nervoso central que resulta em alterações neurológicas [19]. Estudos têm demonstrado que a deficiência de vitamina B₁₂ também pode estar associada à DTN [41, 42]. Assim, a identificação e o tratamento nos estágios iniciais da deficiência são de extrema importância, particularmente em pacientes com sintomas neurológicos, pois eles podem não responder ao tratamento tardio. Além disso, a deficiência pode resultar em sintomas neurológicos sem alterações hematológicas, e deve ser sempre lembrada em pacientes com alterações neurológicas inexplicadas [43-45].

Apesar dos benefícios da fortificação de alimentos com ácido fólico, um grande número de argumentos contra a fortificação tem sido proposto, pois quantidades adicionais de ácido fólico para aqueles que não necessitam pode

acelerar o dano neurológico e mascarar a anemia causada pela deficiência de vitamina B₁₂ [45].

1.3. Interação gene nutriente

Influência dos polimorfismos genéticos C1561T no gene da GCPII, A80G no gene da RFC1 e C677T no gene MTHFR sobre a concentração de folato, vitamina B₁₂ e homocisteína

Estudos sugerem que variações na concentração de folato, vitamina B₁₂ e Hcy podem ser atribuídas a fatores genéticos. Entre os fatores de risco genéticos, dois polimorfismos localizados em genes que codificam a glutamato carboxipeptidase II (GCPII C1561T) e o carreador de folato reduzido (RFC1 A80G) foram associados a alterações no metabolismo do folato e da Hcy em indivíduos saudáveis [46, 47].

Como já citado anteriormente, a enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII) catalisa a hidrólise de resíduos de poliglutamato do folato na borda da membrana intestinal, permitindo sua absorção (figura 5) [48]. Devlin *et al.*, identificaram o polimorfismo C1561T no gene da GCPII, o qual foi relacionado com uma redução de 53% na atividade enzimática, e com os níveis de folato e Hcy [46]. Este polimorfismo está localizado no exon 13 e consiste na troca de um C por T na posição 1561, levando a troca de histidina por tirosina na posição 475 da enzima (H475Y) [49].

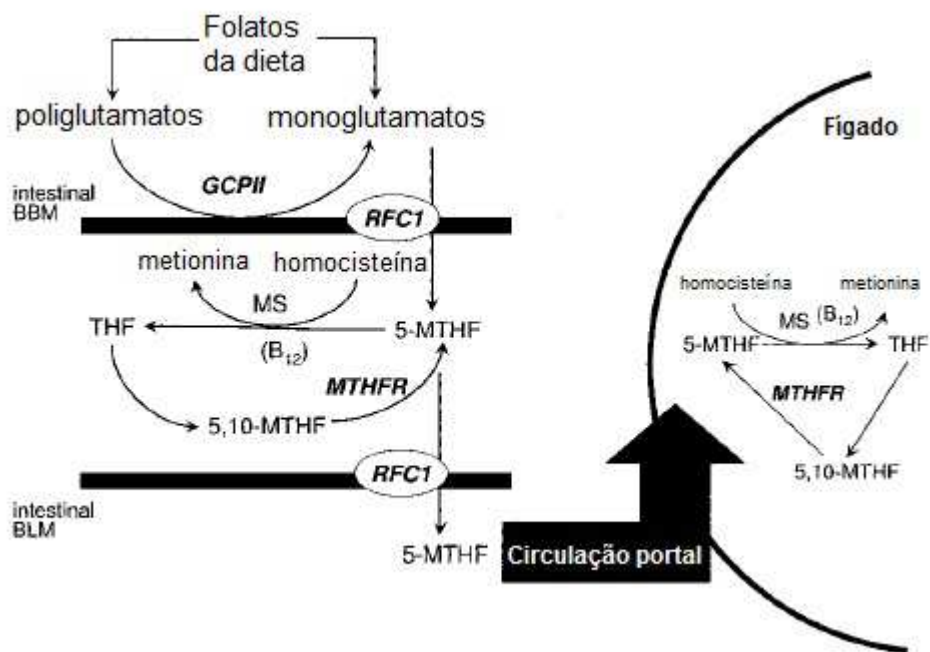


Figura 3. Interações metabólicas da glutamato carboxipeptidase II (GCP II), carreador de folato reduzido (RFC1), e metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR) no intestino e no fígado. Legendas: B₁₂ – vitamina B₁₂; BBM – borda da membrana intestinal; BLM – membrana basolateral; MS – metionina sintase; 5-MTHF – 5-metil tetrahydrofolato; 5,10-MTHF – 5,10-metileno tetrahydrofolato; THF – tetrahydrofolato. Adaptado de Devlin *et al.*, 2006 [48].

No processo de absorção do ácido fólico, a proteína carregadora de folato reduzido (RFC1) situada na membrana da célula da mucosa intestinal é responsável pelo transporte do monoglutamato (figura 5) [48, 49]. O polimorfismo A80G no gene RFC1 foi associado a uma redução no transporte de folato através da membrana celular, prejudicando sua absorção. Este polimorfismo consiste na

troca de A por G na posição 80, resultando na substituição de histidina por arginina na posição 27 da proteína [47, 50].

A relação entre o polimorfismo A80G no gene RFC1 com o metabolismo do folato e Hcy continua incerta e alguns estudos têm relatado uma associação entre este polimorfismo em combinação com o C677T no gene da MTHFR com os níveis de folato e Hcy [47, 48, 51].

Em 1995, Frosst *et al.*, identificaram o polimorfismo C677T no gene MTHFR, sendo responsável pela redução da atividade enzimática da MTHFR em 50% [52]. Este polimorfismo foi associado a níveis elevados de Hcy no plasma e baixos níveis de folato e vitamina B₁₂ [52-54]. A MTHFR sintetiza o 5-MTHF, que serve como doador de um grupo metil para a remetilação da Hcy à metionina, cuja reação é dependente de vitamina B₁₂ como cofator (figura 5). O polimorfismo C677T no gene MTHFR consiste na troca de C por T na posição 677, substituindo alanina por valina [52].

Os estudos dos polimorfismos nos genes GCPII, RFC1 e MTHFR e suas associações com os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy precisam ser confirmados em outras populações, pois podem contribuir para o conhecimento de consequências à saúde. Isto se torna mais importante nas populações com deficiências nutricionais, fato que pode ser comum no Brasil.

1.4. Ferro

O ferro é vital para muitas funções metabólicas, dentre elas o transporte de oxigênio através da hemoglobina. Também é um importante componente de várias enzimas necessárias para a geração de energia [8].

Nos alimentos, o ferro está presente sob duas formas: heme e não heme. O ferro heme deriva da hemoglobina, mioglobina e outras proteínas presentes em alimentos de origem animal. O ferro não heme pode ser encontrado em vegetais, frutas e cereais. Além disso, o ferro existe em dois estados: férrico (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+}). Porém, a maioria do ferro não heme está presente na forma oxidada [55, 56].

O ferro proveniente da dieta é absorvido no intestino delgado, principalmente no duodeno. Entretanto, a absorção do ferro heme e do ferro não heme é distinta. A absorção do ferro heme ocorre via proteína transportadora do heme-1 (HCP-1). Já a absorção do ferro não heme ocorre após a redução do estado férrico para ferroso pela enzima ferroredutase (Dcytb). Assim, ele pode ser transportado através da membrana apical do enterócito pelo transportador de metal divalente-1 (DMT-1) [56-58].

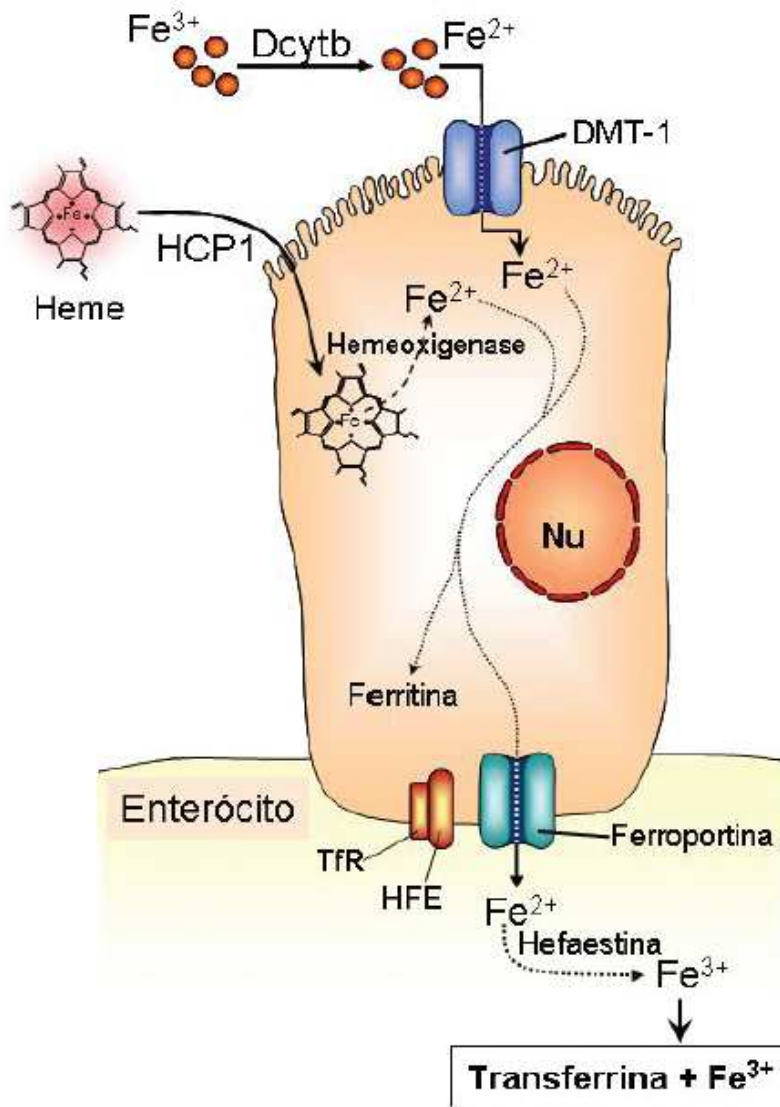


Figura 4. Mecanismo de absorção intestinal de ferro. Legendas: Dcytb, ferroredutase; HCP-1, proteína transportadora do heme-1; DMT-1, transportador de metal divalente 1; Nu, núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TFR: receptor da transferrina. Adaptado de Grotto, 2008 [58].

No enterócito, o ferro pode ser armazenado intracelularmente como ferritina, podendo ser excretado nas fezes quando a célula senescente é descartada, ou exportado através da membrana basolateral do enterócito pela ferroportina para o plasma. O ferro liberado na circulação sofre ação da hefaestina transformando o Fe^{2+} na forma férrica novamente, o qual se liga a transferrina. Assim, o Fe^{3+} pode ser transportado para sítios de uso e/ou armazenamento (figura 6). A transferrina ligada ao ferro, por sua vez, interage com a transferrina 2 nos hepatócitos aumentando a expressão de hepcidina. Este peptídeo é, então, secretado na circulação para regular a absorção e a transferência de ferro pelos enterócitos [56-58].

A quantidade de ferro na dieta é bastante variável e alguns fatores podem influenciar a sua absorção. A absorção do ferro é influenciada pela presença de fitatos, oxalatos e fosfatos, enquanto que o ácido ascórbico, frutose e cisteína facilitam a sua absorção [8, 59].

O consumo médio de ferro num adulto varia de 10 a 20 mg, dos quais apenas 1 a 2 mg serão absorvidos e o restante é eliminado nas fezes [55]. Entretanto, a IDR para crianças (0,5 a 6 anos) varia de 6,3 a 9,3 mg/dia, para lactantes é de 15 mg/dia, e para homens e mulheres (>18 anos) é de 13,7 e 29,4 mg/dia, respectivamente (considerando uma biodisponibilidade de ferro de 10%) [8].

O ferro é armazenado principalmente no fígado como ferritina e hemossiderina, compreendendo 20% do ferro corporal total. Por outro lado, 80% do ferro funcional são encontrados na hemoglobina, mioglobina e enzimas [59,

60]. Portanto, os níveis de ferritina no sangue constituem um bom indicador da adequação de ferro no organismo, pois refletem perturbações na homeostase ou metabolismo de ferro a nível celular [55, 60, 61].

Segundo a OMS, as concentrações de ferritina no soro que refletem a depleção do depósito de ferro são: < 12 ng/mL para crianças menores que 5 anos e < 15 ng/mL para maiores de 5 anos. Os principais indicadores da adequação de ferro no organismo estão demonstrados no quadro 4 [66].

A deficiência de ferro ocorre quando a necessidade do nutriente é maior que a quantidade oferecida e absorvida na dieta, sendo insuficiente para suprir as necessidades do organismo. É a deficiência nutricional mais comum no mundo e a principal causa de anemia, ocasionando graves consequências à saúde, bem como, para o desenvolvimento socioeconômico [63, 64]. O quadro 2 demonstra os dados da prevalência, causas e consequências da deficiência de ferro, incluindo a deficiência de folato e vitamina B₁₂, divulgados pela OMS.

Os principais fatores de risco para a deficiência de ferro são: baixa ingestão de ferro, má absorção, aumento da demanda ou perda hemorrágica (quadro 2) [63, 64].

Dentre todos os grupos da população, as crianças, adolescentes, mulheres em idade fértil, gestantes e lactantes apresentam maiores risco em desenvolver esta deficiência [8].

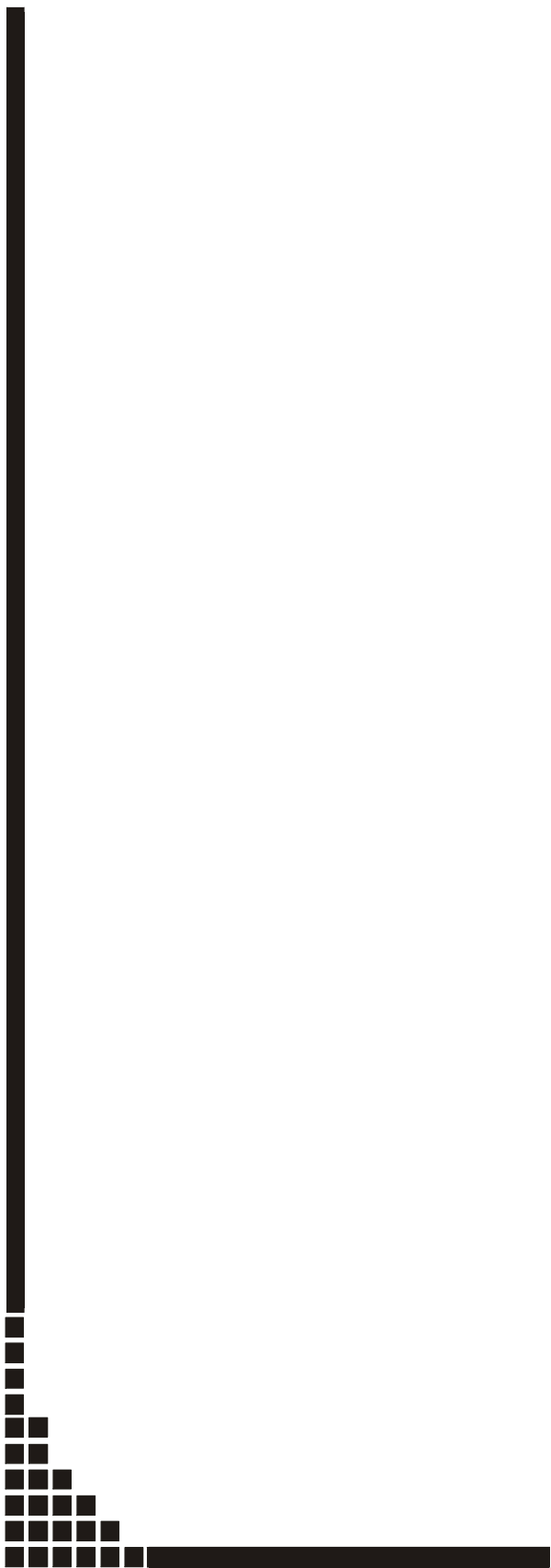
Quadro 4. Indicadores para avaliação da adequação de ferro [19].

Indicador	Amostra	Grupo populacional	Cut-off para definir a deficiência	Comentários
Hemoglobina	Sangue	Crianças 6 – 59 meses	11 g/dL	Primeiro indicador de anemia, mas também pode fornecer informações sobre a adequação de ferro
		Crianças 5 – 11 anos	11,5 g/dL	
		Homens > 15 anos	13 g/dL	
		Mulheres > 15 anos	12 g/dL	
		Gestantes	11 g/dL	
Ferritina	Soro ou plasma	< 5 anos	< 12 ng/mL	Indicador da adequação de ferro Reflete o estoque de ferro no organismo Está diminuído em indivíduos deficientes Elevado na presença de infecção
		> 5 anos	< 15 ng/mL	
Receptores de transferrina	Soro	Aplicado para todos os grupos	Depende do método utilizado	Indicador da adequação de ferro Pode ser usado em combinação com a dosagem de ferritina em casos de infecção
Saturação de transferrina	Soro	Aplicado para todos os grupos	Não definido	Apresenta variação diurna e não é muito específica Elevada na presença de infecção

Fonte: Adaptado de *Guidelines on Food fortification with micronutrients*.

As atuais políticas para a prevenção da anemia ferropriva e deficiência de ferro consistem na suplementação medicamentosa profilática para gestantes, lactantes e lactentes, e na fortificação de farinhas com ferro, onde cada 100 g de farinha devem conter 4,2 mg de ferro [29].

Devido à alta prevalência da deficiência de ferro, em especial em alguns grupos da população, e suas consequências para a saúde, sua prevenção é de extrema importância [59].



2. JUSTIFICATIVA

O programa de fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro, instituído pela ANVISA desde 2004 mostra-se um importante passo na prevenção tanto da deficiência de folato e ferro como na prevenção de hiperhomocisteinemia na população brasileira. Contudo, existem poucos dados se essa prática resultou satisfatória, especialmente em alguns grupos da população, os quais apresentam necessidades distintas.

A interação entre fatores genéticos e adquiridos também pode contribuir para a concentração de folato, vitamina B₁₂ e Hcy.



3. OBJETIVOS

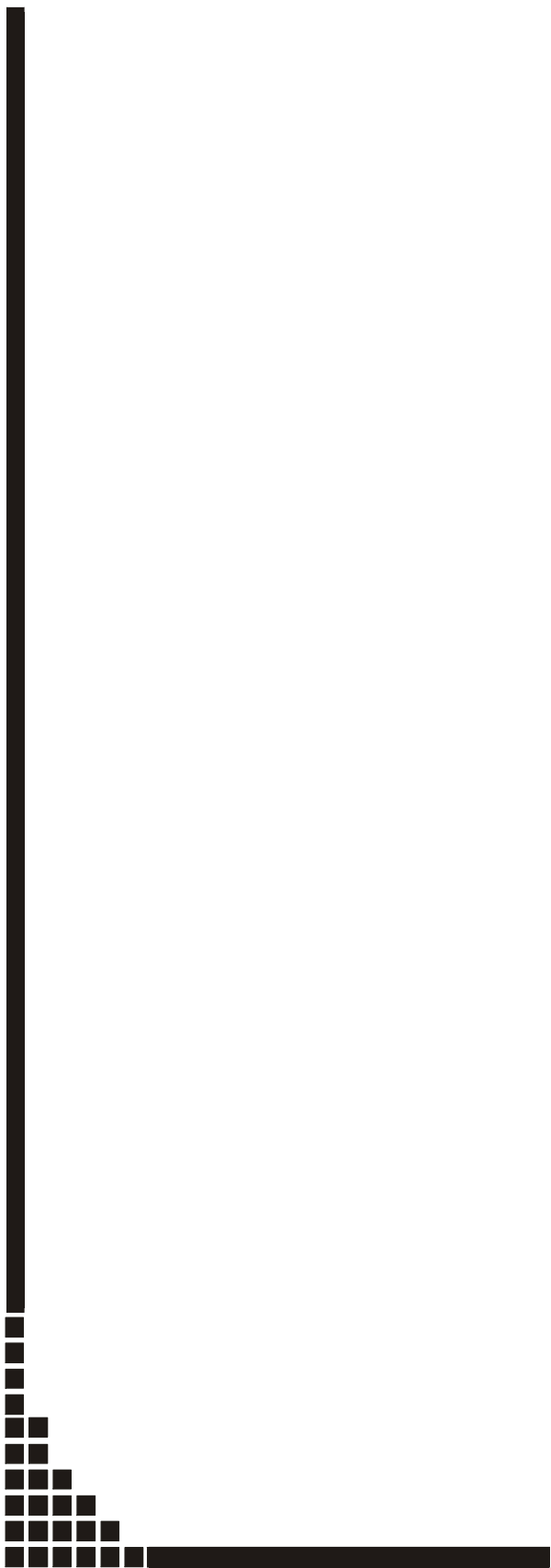
3.1. Objetivo geral:

Determinar a prevalência das deficiências de folato, vitamina B₁₂ e ferro, após a fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro; e a influência dos polimorfismos nos genes RFC1 A80G, GCPII C1561T e MTHFR C677T, ao metabolismo de folato, vitamina B₁₂ e Hcy em diversos grupos de uma população brasileira.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar em idosos, crianças, gestantes e lactantes:

- ✓ As concentrações de folato, vitamina B₁₂, Hcy, ferritina e hemoglobina;
- ✓ A frequência de hiperhomocisteinemia;
- ✓ A prevalência dos polimorfismos A80G no gene da RFC1, C1561T no gene da GCPII e C677T no gene da MTHFR.



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Causuística

Os indivíduos foram recrutados do Centro de Saúde Barão Geraldo e no Serviço de Coleta do Hospital de Clínicas da Unicamp, Distrito de Barão Geraldo, no município de Campinas, São Paulo. Estes Centros de Saúde atendem indivíduos de quase todas as classes sociais (maior exceção classe A). Os indivíduos foram incluídos no estudo no período de abril de 2006 a maio de 2007.

Após esclarecimentos sobre o conteúdo e os objetivos da pesquisa, os indivíduos que em princípio poderiam ser incluídos assinaram o termo de consentimento para a participação na pesquisa, ou o seu responsável (Apêndice 1).

Todos os participantes da pesquisa responderam a um questionário sobre o uso de suplementos, história pregressa ou atual de doenças, e dados demográficos (Apêndice 2). Após a análise pelo questionário, os indivíduos que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão faziam a coleta de sangue.

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP sob o parecer número 057/2006 (Anexo 1).

4.1.1. Participantes do estudo

O grupo de estudo foi composto por idosos, crianças, gestantes e lactantes. Os critérios de inclusão foram: crianças de ambos os gêneros com idade entre 0,5 a 6 anos; idosos de ambos os gêneros com idade \geq 60 anos; gestantes; e mulheres em amamentação. Todas as gestantes e lactantes que aceitaram participar do estudo foram incluídas, independentemente da idade.

Quase que a totalidade de crianças, gestantes e lactantes foi recrutada no Serviço de Coleta do Hospital de Clínicas da Unicamp, onde compareciam para realização de exames laboratoriais e os idosos foram recrutados no Centro de Saúde de Barão Geraldo.

4.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos os participantes portadores de doença renal e/ou hepática, hipotireoidismo, neoplasia, HIV ou doença crônica. Além disso, também foram excluídos do estudo indivíduos que faziam uso de medicamentos anticonvulsivantes, e também antidepressivos tricíclicos, por estarem associados à deficiência de folato.

4.2. Coleta de sangue

O sangue dos voluntários foi coletado por punção venosa periférica após jejum de 8 horas. Para as lactantes foi estabelecido um período de jejum de 6 horas. O sangue foi distribuído nos seguintes tubos:

- 4 mL de sangue em tubo seco protegido da luz para a dosagem de ácido fólico e vitamina B₁₂;
- 4 mL de sangue em tubo seco para a dosagem de ferritina;
- 4 mL de sangue em tubo contendo EDTA para a realização do hemograma;
- 4 mL de sangue em tubo contendo EDTA para a dosagem de Hcy;

Obs.: Para a extração de DNA foram utilizados os tubos empregados para o hemograma e dosagem de Hcy.

4.3. Determinação de ácido fólico e vitamina B₁₂

A análise de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram realizadas pela técnica quantitativa de eletroquimioluminescência, através dos Kits Elecsys[®] Folato Imunoensaio e Elecsys[®] B₁₂ Imunoensaio (Roche, Mannheim, Germany).

As dosagens foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Hospital de Clínicas, da Unicamp.

Valor de referência para ácido fólico: ≥ 4 ng/mL.

Valor de referência para vitamina B₁₂: ≥ 203 pg/mL.

Estes valores de referência são aplicados tanto para crianças como para adultos.

4.4. Determinação dos níveis de ferritina e hemoglobina

A análise de ferritina sérica foi realizada pela técnica quantitativa de eletroquimioluminescência, utilizando o aparelho Elecsys 2010 da Roche. O princípio do teste é a técnica de *sandwich*.

Para a análise da hemoglobina foi realizado o hemograma utilizando-se o aparelho Sysnese SE-9500 e XE 2100 (Roche).

A dosagem de ferritina e o hemograma foram realizados pelo laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Valor de referência para ferritina: ≥ 12 ng/mL para crianças; ≥ 15 ng/mL para adultos.

Valor de referência para hemoglobina: ≥ 11 g/dL para crianças (0,5 a 6 anos) e gestantes; ≥ 12 g/dL para mulheres não gestantes acima de 15 anos; ≥ 13 g/dL para homens acima de 15 anos.

4.5. Determinação dos níveis de homocisteína

A amostra utilizada na dosagem de Hcy plasmática foi colocada em banho de gelo até a centrifugação. O material foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm e uma alíquota do plasma (aproximadamente 1 mL) foi armazenada a -80° C até a realização das análises.

A dosagem de Hcy foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no equipamento da Shimadzu, com eluição isocrática e detecção por fluorescência nos comprimento de onda de excitação de 385 nm e emissão de 515 nm [67].

Para a realização desta técnica a amostra de plasma foi preparada antes da análise. O procedimento compreendeu três etapas:

1. Redução: procedimento que permite a redução dos tióis e desacoplamento da Hcy de proteínas presentes no plasma;
2. Precipitação de proteínas;
3. Derivatização.

4.6. Extração de DNA de sangue periférico

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido em nosso laboratório, descrito a seguir:

As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente, e o plasma desprezado em seguida. Para a lise das hemácias acrescentou-se 5 vezes o volume de células de cloreto de amônio (144 mM) e bicarbonato de amônio (10 mM), sendo misturados por inversão. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.200 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o procedimento descrito anteriormente foi repetido. Após a segunda lise, foi adicionado ao sedimento obtido 5 mL de tampão TKM1 (Tris-HCl 10mM, pH 7,6, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0,2 mM) e 125

μL de Triton-X10 (Sigma). Esta mistura foi homogeneizada até a dissolução completa do Triton-X10 e centrifugada por 15 minutos a 2200 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento lavado com 1 mL de tampão TKM1, e centrifugado novamente por 5 minutos na mesma rotação. O sedimento obtido foi transferido para um tubo tipo *ependorf*, ao qual foi adicionado 1 mL de tampão TKM2 (NaCl 400 mM, KCl 10 mM, pH 7,6, MgCl_2 10 mM) e 25 μL de SDS a 10% (dodecil sulfato de sódio). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante 30 minutos. Após esse período acrescentou-se 180 μL de NaCl 5M, e realizada a homogeneização por inversão, com a finalidade de precipitar as proteínas. Nesta etapa as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, uma nova centrifugação foi realizada durante 5 minutos a 12.000 rpm.

O sobrenadante recolhido contendo o DNA foi submetido à extração através da adição de 450 μL de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v) e adicionados 450 μL de fenol bidestilado saturado com Tris-HCl (pH 8,0). Esta solução foi homogeneizada, seguida de uma centrifugação durante 5 minutos a 12.000 rpm. Este procedimento foi repetido após a adição de 1 mL de clorofórmio/álcool isoamílico. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 1 mL de etanol a 100% e 30 μL de acetato de sódio 3M para precipitação do DNA. A amostra foi rigorosamente agitada para a precipitação do DNA e centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol resfriado a 70%, e outra centrifugação foi

realizada. O sobrenadante foi novamente descartado e o DNA precipitado deixado à temperatura ambiente para secar. Posteriormente, o DNA foi ressuspensão 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.

4.7. Análise de polimorfismos

A amplificação do DNA genômico para a identificação dos polimorfismos foi realizada em um aparelho termociclador automático, através da reação com 0,5 µg de DNA, 2 mM de MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0,33 mM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), 0,1 pmol de cada *primer* (Sense e Anti-sense), e duas unidades de Taq polimerase (Invitrogen).

A digestão enzimática foi realizada com 8 µL do produto amplificado, utilizando-se 1,5 U da enzima de restrição e uma solução contendo 5 mM de KCl, 1 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,01 mM de EDTA, 0,1 mM de DTT, por 12 horas, em banho-maria a 37°C.

Os fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose 3% em tampão de corrida TBE (Tris-EDTA-Borato), visualizados sob luz ultravioleta (UV) após coloração com brometo de etídio, e fotografados.

4.7.1. Polimorfismo A80G no gene da RFC1

A região onde está localizado o polimorfismo A80G no gene da RFC1 foi amplificada pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificar o fragmento de 230 pb.

Os parâmetros da PCR utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 96°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 96°C, 1 minuto para anelamento dos *primers* a (Sense: AGTGTCACCTTCGTCCC e Antisense: TCCCGCGTGAAGTTCTTG) 55°C, 1 minuto para a extensão do DNA complementar a 72°C para ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à digestão enzimática, empregando-se a enzima *Hha I*; separados por eletroforese em gel de agarose e tampão TBE e identificados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo. A migração eletroforética dos fragmentos foi comparada com a de marcadores de tamanho molecular de DNA (100 pb).

Na presença do alelo mutante (G), observam-se os fragmentos de 125, 68 e 37 pb. Quando o alelo normal (A) está presente observam-se os fragmentos de 162 e 68 pb. A presença de quatro fragmentos (162, 125, 69 e 37 pb) é verificada em indivíduos heterozigotos (AG) (figura 5).

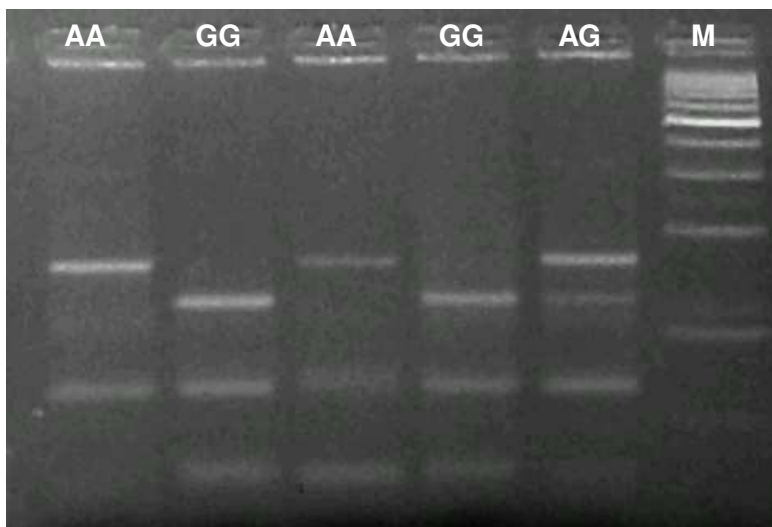


Figura 5. Visualização da digestão dos produtos da PCR pela enzima *HhaI* em gel de agarose para o polimorfismo A80G no gene RFC1. M – Marcador molecular, AA – Homozigoto normal, AG – Heterozigoto e GG – Homozigoto mutante.

4.7.2. Polimorfismo C1561T no gene da GCPII

A região onde está localizado o polimorfismo C1561T no gene da GCPII foi amplificada pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificar o fragmento de 244 pb.

Os parâmetros da PCR utilizados foram os seguintes: desnaturação inicial com duração de 5 minutos a 96°C, seguidos por 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação do DNA a 96°C, 1 minuto para anelamento dos *primers* (Sense: CATTCTGGTAGGAATTTAGCA e Antisense: AAACACCACCTATGTTTAACA) a

60°C, 1 minuto para a extensão do DNA complementar a 72°C para ação da Taq polimerase e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto da PCR foi submetido à digestão enzimática, empregando-se a enzima *AccI*.

Para a genotipagem do polimorfismo C1561T no gene GCP11, os produtos de PCR e de restrição enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose e tampão TBE, e identificados sob luz UV, após coloração com brometo de etídeo. A migração eletroforética dos fragmentos foi comparada com a de marcadores de tamanho molecular de DNA (100 pb).

Na presença do alelo mutante (T), observam-se os fragmentos de 141 e 103 pb. Quando o alelo normal (C) está presente não há clivagem do sítio pela enzima, e o fragmento é de 244 pb. A presença de três fragmentos (244, 141 e 103 pb) é verificada em indivíduos heterozigotos (CT) (figura 6).

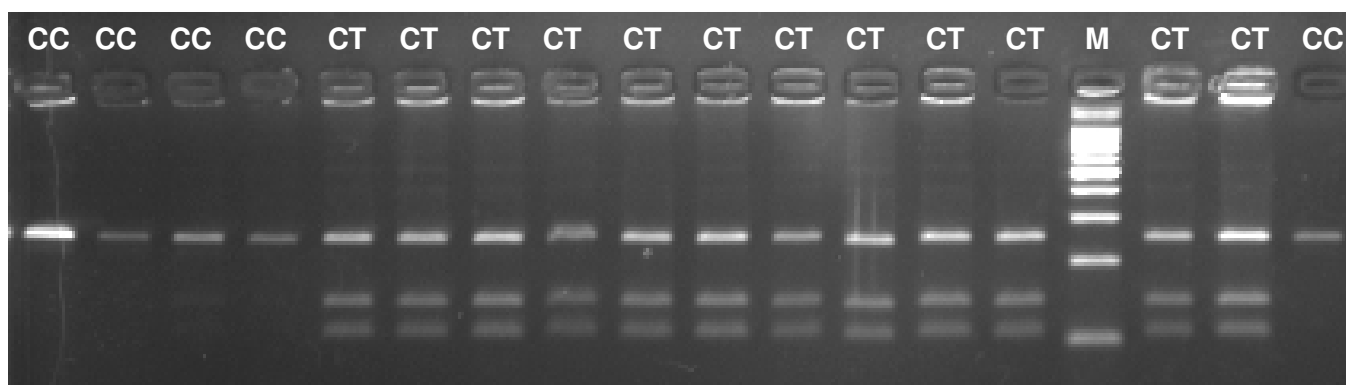


Figura 6. Visualização da digestão dos produtos da PCR pela enzima *AccI* em gel de agarose para o polimorfismo C1561T no gene GCP11. M – Marcador molecular, CC – Homozigoto normal, CT – Heterozigoto.

4.7.3. Polimorfismo C677T no gene da MTHFR

A região onde está localizado o polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi amplificada pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificar o fragmento de 198 pb.

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* (Sense: TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA e Antisense: AGGACGGTGCGGTGAGAGTG) a 60°C, 1 minuto para a extensão do DNA complementar a 72°C para ação da Taq polimerase, e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O produto da PCR foi submetido à digestão enzimática, empregando-se a enzima *Hinfl*.

Após a digestão do produto amplificado, os fragmentos foram observados através de eletroforese em gel de agarose e tampão de corrida TBE, visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio e fotografados.

Na presença do alelo mutante (T), observou-se um fragmento de 175 pb. O fragmento menor de 23 pb é perdido no decorrer da eletroforese. Quando o alelo normal (C) está presente não há clivagem do sítio pela enzima e o fragmento é de 198 pb. A presença dos dois fragmentos (175 e 198 pb) é verificada em indivíduos heterozigotos (CT) (figura 7).

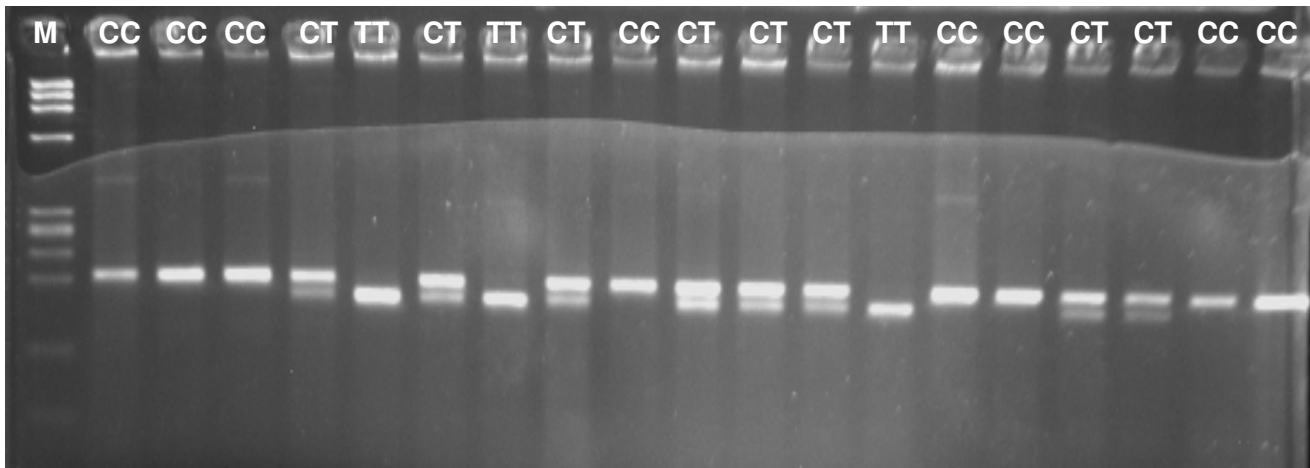


Figura 7. Visualização da digestão dos produtos da PCR pela enzima *HinfI* em gel de agarose para o polimorfismo C677T no gene MTHFR. M – Marcador molecular, CC – Homozigoto normal, CT – Heterozigoto, TT – Homozigoto mutante.

4.8. Definição das variáveis

As deficiências de folato e vitamina B₁₂ foram consideradas quando os níveis estavam abaixo de 4 ng/mL e 200 pg/mL, respectivamente. Níveis de vitamina B₁₂ entre 200 – 300 pg/mL foram considerados como níveis marginais [9, 11].

A hiperhomocisteinemia foi considerada quando os níveis de Hcy estavam acima de 15 µmol/L para idosos e lactantes. Para gestantes e crianças a

hiperhomocisteinemia foi considerada quando os níveis de Hcy estavam acima de 10,8 e 10,4 $\mu\text{mol/L}$ (P97,5), respectivamente.

A deficiência de ferro foi definida quando os níveis de ferritina estavam abaixo de 12 ng/mL e a anemia quando os níveis de hemoglobina estavam abaixo dos valores de referência para cada grupo.

Anemia ferropriva foi definida quando o paciente apresentava níveis de hemoglobina abaixo dos valores de referência e ferritina abaixo de 12 ng/mL [63, 65, 66].

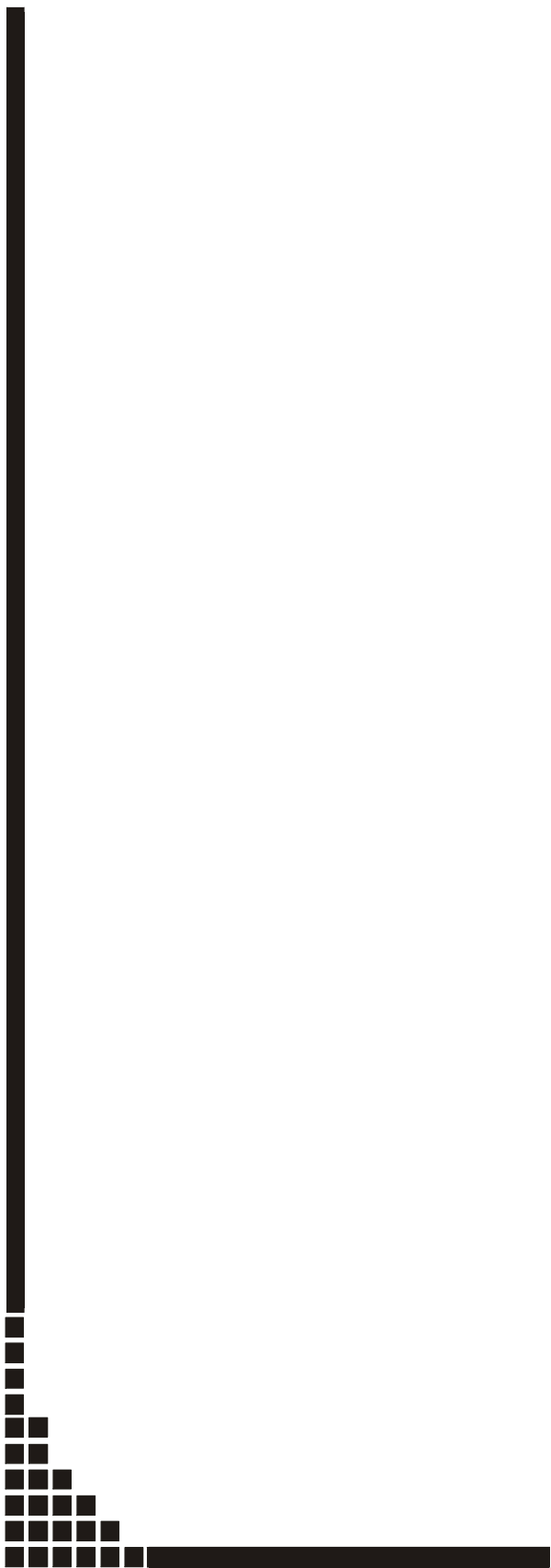
Anemia por deficiência de folato foi definida na presença de níveis de hemoglobina abaixo dos valores de referência e folato abaixo de 4 ng/mL.

Anemia por deficiência de B₁₂ foi definida na presença de níveis de hemoglobina abaixo dos valores de referência e vitamina B₁₂ abaixo de 200 pg/mL.

4.9. Análise Estatística

Para os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram calculados a mediana e os percentis 25 e 75. Também foi realizada uma análise descritiva através de tabelas de frequências para variáveis categóricas. A comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*. A análise de regressão linear múltipla com critério de seleção de variáveis *stepwise* foi realizada, tendo como variável dependente a Hcy e como variáveis independentes: idade (anos),

gênero (masculino e feminino), tabagismo, hipertensão, diabetes, dislipidemia, IMC, polimorfismos, folato e vitamina B₁₂. Para esta análise foi aplicada a transformação por postos na variável dependente devido à ausência de normalidade. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi determinado para todos os polimorfismos usando o teste de Qui-quadrado. As análises foram realizadas através do programa SAS for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2, SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5% ($p < 0,05$).



5. RESULTADOS

5.1. Características Clínicas do grupo de estudo

Setecentos e dezenove indivíduos atendidos no Centro de Saúde de Barão Geraldo ou no Hospital de Clínicas da UNICAMP foram incluídos no estudo. O grupo de estudo foi composto por 262 idosos (36,5%), 106 crianças (14,7%), 291 gestantes (40,5%) e 60 lactantes (8,3%). No total foram feitas coletas em 216 dias, no período de abril/2006 a maio/2007.

Os participantes do estudo foram inclusos na ocasião da visita ao Centro de Saúde para a realização de consulta médica ou no Hospital das Clínicas para coleta de exame laboratorial. As gestantes estavam no acompanhamento do pré-natal, as crianças em consulta pediátrica de rotina, as lactantes eram mães de crianças que faziam acompanhamento pediátrico, e os idosos faziam acompanhamento médico devido à hipertensão, diabetes, ou por outro motivo que não os excluíram do estudo.

A proposta inicial do estudo era a inclusão de 250 indivíduos por grupo. Contudo, houve muita dificuldade na inclusão de crianças, pois a maior parte das mães não aprovava a participação de seus filhos. Apesar dessas crianças já estarem sendo submetidas à coleta de sangue, a quantidade de sangue necessária para o estudo foi o maior fator limitante. Quanto às lactantes, o índice de absenteísmo era elevado, e havia poucas mulheres nessas condições que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão, que puderam ser convidadas a participar do estudo. Nesse sentido, pelo tempo disponível para realização das coletas, não foi possível obter o número inicial proposto para esses dois grupos do estudo.

A tabela 1 demonstra as principais características clínicas e demográficas do grupo de estudo.

Os idosos apresentaram idades entre 60 a 91 anos, as crianças entre 0,5 a 6 anos, as gestantes entre 14 a 43 anos, e as lactantes entre 14 a 40 anos. Dentre os idosos e as crianças, 43,5% e 50,9% eram do gênero masculino, respectivamente.

O grupo de crianças foi constituído por 70 (66%) crianças com idades entre 0,5 a 3 anos, e 36 (34%) crianças com idades entre 4 a 6 anos.

As alterações intestinais, como diarreia, foram observadas em apenas um idoso e três crianças.

Nota-se que todos os grupos apresentaram alguns indivíduos que faziam o uso de suplementação, principalmente as gestantes. Além disso, a presença de hipertensão, diabetes e dislipidemia foram mais frequentes em idosos. Porém, 19,2% das gestantes também apresentaram esses problemas de saúde durante a gestação, e apenas três crianças eram diabéticas.

No grupo de gestantes, 18,4% estavam no primeiro trimestre de gestação, 33,3% no segundo trimestre e 48,3% no terceiro trimestre.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos do grupo de estudo.

	Idosos (n=262)	Crianças (n=106)	Gestantes (n=291)	Lactantes (n=60)
Idade (anos) ¹	67,0 (63,0, 74,0)	3 (1,9, 4,0)	26 (21,0, 31,0)	26,5 (20,2, 32,0)
Gênero [M ² (n)]	114	54	-	-
IMC ¹	26,7 (23,9, 29,9)	15,9 (14,8, 17,9)	26,4 (23,4, 30,7)	23,4 (21,5, 26,4)
Suplementação ³	43 (16,4)	22 (16,6)	138 (47,4)	10 (16,6)
Tabagismo [n (%)] ⁴	20 (7,6)	-	27 (9,3)	8 (13,3)
Hipertensão [n (%)]	158 (60,3)	-	42 (14,4)	5 (8,3)
Diabetes [n (%)]	65 (24,8)	3 (2,8)	12 (4,1)	1 (1,6)
Dislipidemia [n (%)]	65 (24,8)	-	2 (0,7)	-
Escolaridade [n (%)]				
Analfabeto	45 (17,2)	-	2 (0,7)	-
Fundamental	173 (66,3)	-	117 (40,5)	26 (44,8)
Médio	30 (11,5)	-	143 (49,5)	28 (48,3)
Superior	9 (3,5)	-	23 (7,9)	4 (6,9)
Outros ⁵	4 (1,5)	-	4 (1,4)	-

¹ Valores expressos como mediana e percentil (P25, P75)

² M, masculino

³ Usuários de multivitamínicos, ácido fólico ou ferro

⁴ Valores expressos como número e porcentagem entre parênteses

⁵ Nível técnico ou pós-graduação

5.2. Resultados dos níveis de folato, vitamina B₁₂, homocisteína, ferritina e hemoglobina

A tabela 2 mostra a mediana e os percentis 25 e 75 dos níveis de folato, vitamina B₁₂, Hcy, ferritina e hemoglobina do grupo de estudo. Podemos observar concentração maior de folato e vitamina B₁₂ em crianças, e valores mais baixos de vitamina B₁₂ nas gestantes, em relação aos outros grupos. Com relação aos níveis de Hcy, estes estavam mais elevados nos idosos. Os níveis de ferritina foram menores em gestantes e os níveis de hemoglobina foram praticamente semelhantes em todos os grupos. É importante ressaltar que a dosagem de folato e vitamina B₁₂ não foram realizadas em 9 indivíduos, e os níveis de Hcy não foi avaliados em apenas um indivíduo.

Tabela 2. Níveis de folato, vitamina B₁₂, homocisteína, ferritina e hemoglobina nos diferentes grupos de estudo.

Grupos	Folato (ng/mL)	Vitamina B₁₂ (pg/mL)	Hcy (μmol/L)	Ferritina (ng/mL)	Hemoglobina (g/dL)
Idosos	11,2 (8,7, 13,6) n= 262	443,0 (333,0, 620,2) n= 262	13,5 (11,1, 17,1) n= 262	170,5 (97,0, 268,2) n= 262	14,5 (13,7, 15,4) n= 258
Crianças	12,4 (9,4, 14,6) n= 103	853,0 (611,0, 1188,0) n= 103	6,2 (5,2, 7,3) n= 105	32,0 (20,8, 60,2) n= 101	12,3 (11,7, 13,4) n=103
Gestantes	10,7 (8,3, 14,1) n= 291	325,0 (257,0, 424,0) n= 291	6,4 (5,3, 7,5) n= 291	26,2 (11,9, 59,0) n= 291	12,3 (11,4, 12,9) n= 288
Lactantes	9,8 (7,6, 12,2) n= 54	523,0 (415,7, 641,5) n= 54	9,2 (7,6, 10,8) n= 60	51,8 (34,2, 74,9) n= 54	13,5 (12,8, 14,0) n= 59

5.3. Prevalência das deficiências de folato e vitamina B₁₂, e hiperhomocisteinemia no grupo de estudo

A deficiência de folato e vitamina B₁₂ estiveram presentes em 0,3% e 5,3% na população geral estudada, respectivamente, conforme demonstrado na tabela 3.

A deficiência de folato foi rara e identificada em apenas um idoso (0,4%) e uma gestante (0,3%), que de forma inusitada fazia uso de suplementação.

A deficiência destas vitaminas não foi observada em crianças, e apenas 1% apresentou níveis considerados como marginais de vitamina B₁₂ (200 – 300 pg/mL).

Com relação à deficiência de vitamina B₁₂, foi prevalente em gestantes (8,9%), seguida pelos idosos (4,2%). Apenas uma (1,8%) lactante apresentava esta deficiência. Níveis marginais desta vitamina apresentaram padrão de distribuição semelhante: 32,7% em gestantes, 14,1% em idosos e 7,5% em lactantes.

A hiperhomocisteinemia foi muito prevalente no grupo de idosos (34,3%). Enquanto que, a prevalência nos outros grupos de estudo variou entre 2% e 5%.

Tabela 3. Prevalência das deficiências de folato e vitamina B₁₂, e a frequência de hiperhomocisteinemia nos diferentes grupos de estudo.

Grupos	Folato	Vitamina B ₁₂		Homocisteína
	< 4 ng/mL	< 200 pg/mL	200 – 300 pg/mL	> 10,4 ¹ µmol/L > 10,8 ² µmol/L > 15,0 ³ µmol/L
Idosos	1 (0,4)	11 (4,2)	37 (14,1)	88 (34,3)
Crianças	-	-	1 (1,0)	2 (2,0)
Gestantes	1 (0,3)	26 (8,9)	95 (32,7)	8 (2,7)
Lactantes	-	1 (1,8)	4 (7,5)	3 (5,0)
Total	2 (0,3)	38 (5,3)	137 (19,3)	101 (14,2)

Valores expressos como número e porcentagem em parênteses

¹Valores definidos para crianças (P97,5)

²Valores definidos para gestantes (P97,5)

³Valores definidos para idosos e lactantes

Níveis de folato < 4 ng/mL não estiveram presentes em nenhum dos grupos com hiperhomocisteinemia. Por outro lado, níveis de vitamina B₁₂ < 200 pg/mL estiveram presentes em 8 idosos e 5 gestantes com hiperhomocisteinemia.

5.4. Prevalência da deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva

A prevalência da deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva na população estudada foi de 12,6%, 9,4% e 3,7%, respectivamente (tabela 4). Dentre os grupos de estudo, as gestantes foram as que apresentaram maior prevalência de deficiência de ferro (25,1%) e anemia ferropriva (5,5%). Por outro lado, a anemia (Hb < 11 g/dL), independente da etiologia, foi mais prevalente em

crianças (13,6%). Além disso, apenas as crianças de 0,5 a 3 anos apresentaram deficiência de ferro e anemia.

Não houve diferença na prevalência de anemia entre homens e mulheres idosos (7,8% e 6%, respectivamente).

A deficiência de ferro sem anemia esteve presente em um (0,4%) idoso, 5 (4,8%) crianças, e 53 (18,2%) gestantes.

Tabela 4. Prevalência da deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva.

Grupos	Ferritina	Hemoglobina	Ferritina
	< 12 ng/mL	< 11 ¹ , < 12 ² ou < 13 ³ g/dL	< 12 ng/mL + Hemoglobina < 11 ¹ , < 12 ² ou < 13 ³ g/dL
	n (%)	n (%)	n (%)
Idosos	4 (1,5)	18 (6,9)	3 (1,2)
Crianças	10 (9,9)	14 (13,6)	5 (4,9)
Gestantes	73 (25,1)	32 (11,1)	16 (5,5)
Lactantes	2 (3,7)	3 (5,1)	2 (3,7)
Total	89 (12,6)	67 (9,4)	26 (3,7)

Valores expressos como número e porcentagem entre parênteses

¹ Valor definido para crianças e gestantes

² Valor definido para mulheres

³ Valor definido para homens

Observou-se que a deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva estiveram presentes principalmente nas gestantes com idade gestacional entre a 20^a e 40^a semana.

Neste estudo, a anemia ferropriva coexistiu apenas com a deficiência de vitamina B₁₂ em um idoso e três gestantes.

Dos 67 casos de anemia, 38,8% foram devido à deficiência de ferro e 11,9% foram decorrentes da deficiência de vitamina B₁₂. Nos idosos, 16,6% das anemias foram devido à deficiência de ferro e 16,6% devido à deficiência de vitamina B₁₂. Nas crianças, 35,7% da anemia foram devido à deficiência de ferro. Nas gestantes, 50% dos casos de anemia foram devido à deficiência de ferro e 15,6% devido à deficiência de vitamina B₁₂. Nas lactantes, 66,6% da anemia foram devido à deficiência de ferro.

5.5. Níveis de folato, vitamina B₁₂, ferritina e Hcy em relação ao uso de suplementação

Na tabela 5 demonstramos dados sobre o uso de suplementação e sua relação com os níveis de folato, vitamina B₁₂, ferritina e Hcy.

Houve diferença estatisticamente significativa no grupo de gestantes entre o uso ou não suplementação com os níveis de folato e ferritina ($p < 0,001$ e $p = 0,026$, respectivamente).

Tabela 5. Uso de suplementação e sua relação com níveis de folato, vitamina B₁₂, ferritina e Hcy nos grupos de estudo.

Variáveis	GRUPOS	Suplementação		P ¹
		Não	Sim	
Folato (ng/mL)	Idosos	11,2 (8,7, 13,4) n= 219	11,5 (8,4, 14,8) n= 43	0,472
	Crianças	12,1 (9,4, 14,5) n= 81	13,2 (8,8, 15,1) n= 22	0,875
	Gestantes	9,5 (8,0, 11,5) n= 153	12,7 (8,8, 17,3) n= 138	< 0,001
	Lactantes	9,9 (8,0, 12,3) n= 50	9,8 (5,2, 12,8) n= 10	0,444
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Idosos	443,0 (333,0, 620,0) n= 219	433,0 (329,0, 648,0) n= 43	0,992
	Crianças	830,0 (594,5, 1163,5) n= 81	919,0 (636,5, 1191,0) n= 22	0,809
	Gestantes	321,0 (254,0, 411,5) n= 153	335,5 (257,0, 436,0) n= 138	0,209
	Lactantes	529,0 (416,5, 646,0) n= 50	465,0 (368,6, 678,5) n= 10	0,719
Ferritina (ng/mL)	Idosos	177,0 (101,0, 273,0) n= 219	129,0 (75,0, 214,0) n= 43	0,054
	Crianças	31,6 (21,8, 56,3) n= 81	37,4 (20,0, 74,0) n= 22	0,509
	Gestantes	19,5 (10,5, 59,2) n= 153	32,8 (17,5, 57,2) n= 138	0,026
	Lactantes	49,0 (32,5, 70,9) n= 50	77,7 (39,7, 109,3) n= 10	0,076
Hcy (µmol/L)	Idosos	13,5 (11,3, 17,1) n= 219	13,4 (10,6, 16,2) n= 43	0,488
	Crianças	6,1 (5,2, 7,2) n= 81	6,5 (5,3, 8,3) n= 22	0,333
	Gestantes	6,4 (5,3, 7,5) n= 153	6,4 (5,4, 7,5) n= 138	0,854
	Lactantes	9,1 (7,5, 10,6) n= 50	10,2 (8,0, 12,2) n= 10	0,226

Valores expressos como mediana e percentis 25 e 75

¹Teste de *Mann-Whitney*

As concentrações de folato e ferritina foram menores nas gestantes que não faziam uso de suplementação. Entretanto, 18,8% das gestantes que faziam uso de suplementação tinham deficiência de ferro.

Nos outros grupos não foram observadas diferenças entre uso ou não de suplementação com os níveis de folato, vitamina B₁₂, ferritina e Hcy.

5.6. Prevalência dos polimorfismos nos genes RFC1 (A80G), GCPII (C1561T) e MTHFR (C677T)

Neste estudo, investigou-se a presença de polimorfismos associados com os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy. Na tabela 6 estão descritas as prevalências desses polimorfismos no grupo de estudo. Os polimorfismos nos genes RFC1 (A80G), GCPII (C1561T) e MTHFR (C677T) não foram realizados em 11, 56 e 30 indivíduos, respectivamente.

As distribuições genotípicas dos polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Observou-se que o polimorfismo mais prevalente foi o A80G no gene RFC1 (77,7%). Nenhum indivíduo da população estudada apresentou o polimorfismo C1561T no gene GCPII em homozigose, e apenas 6,6% dos indivíduos eram heterozigotos.

Tabela 6. Prevalência dos genótipos para os polimorfismos nos genes RFC1 A80G, GCPII C1561T e MTHFR C677T.

Polimorfismos	Genótipos	Grupo de estudo	
		n	%
RFC1 A80G ¹	AA	158	22,3
	AG	343	48,4
	GG	207	29,3
GCPII C1561T ²	CC	619	93,4
	CT	44	6,6
MTHFR C677T ³	CC	326	47,3
	CT	286	41,5
	TT	77	11,2

¹AA, wild type; AG, heterozigoto; e GG homozigoto mutante para o polimorfismo RFC1 A80G

²CC, wild type; e CT, heterozigoto para o polimorfismo GCPII C1561T

³CC, wild type; CT, heterozigoto; e TT, homozigoto mutante para o polimorfismo MTHFR C677T

5.7. Efeito dos polimorfismos nos genes RFC1 (A80G), GCPII (C1561T) e MTHFR (C677T) sobre os níveis de folato, vitamina B₁₂ e homocisteína

A influência dos polimorfismos sobre as concentrações de folato, vitamina B₁₂ e Hcy foram avaliadas através do teste de *Mann-Whitney* (tabelas 7, 8 e 9).

O polimorfismo no gene RFC1 (A80G) não demonstrou associação com os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy no grupo de estudo. Entretanto, observou-se uma possível influência deste polimorfismo sobre os níveis de Hcy em gestantes (p=0,052).

Não se observou nenhuma associação entre o polimorfismo no gene GCPII (C1561T) e os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy em idosos, crianças, gestantes e lactantes.

Dentre os polimorfismos investigados, apenas o polimorfismo no gene MTHFR (C677T) mostrou influência sobre os níveis de folato, no grupo de gestantes (p=0,030).

Tabela 7. Níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy de acordo com o polimorfismo no gene RFC1 A80G em idosos, crianças, gestantes e lactantes.

Variáveis	GRUPOS	RFC1 A80G ²		P ¹
		AA	AG+GG	
Folato (ng/mL)	Idosos	11,2 (8,4, 13,2) n=49	11,2 (8,8, 13,7) n=211	0,762
	Crianças	12,5 (8,2, 16,1) n= 20	12,0 (9,5, 14,6) n= 80	0,737
	Gestantes	9,8 (8,0, 13,6) n= 74	10,9 (8,5, 14,5) n= 212	0,224
	Lactantes	10,6 (9,4, 12,7) n= 12	9,5 (7,2, 11,9) n= 42	0,121
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Idosos	418,0 (310, 687,5) n=49	443,0 (339,0, 617,0) n=211	0,878
	Crianças	827,0 (638,5, 1047,5) n= 20	861,0 (598,2, 1201,2) n= 80	0,799
	Gestantes	341,5 (267,7, 462,0) n= 74	323,5 (252,2, 414,2) n= 212	0,092
	Lactantes	563,0 (470,0, 648,0) n= 12	486,5 (408,7, 642,0) n= 42	0,204
Hcy (µmol/L)	Idosos	14,1 (11,7, 17,9) n=49	13,2 (10,9, 16,8) n=211	0,122
	Crianças	6,0 (5,3, 6,7) n= 20	6,4 (5,1, 7,4) n=80	0,500
	Gestantes	5,9 (5,1, 7,6) n= 74	6,4 (5,4, 7,5) n= 212	0,052
	Lactantes	9,4 (8,2, 10,4) n= 12	8,9 (7,5, 11,2) n= 80	0,999

Valores expressos como mediana e percentil (P25, P75)

¹Teste de *Mann-Whitney*

²AA, wild type; AG, heterozigoto; e GG homozigoto

Tabela 8. Níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy de acordo com o polimorfismo no gene GCPII C1561T em idosos, crianças, gestantes e lactantes.

Variáveis	GRUPOS	GCPII C1651T ²		P ¹
		CC	CT	
Folato (ng/mL)	Idosos	11,0 (8,5, 13,7) n=241	12,2 (11,1, 13,0) n=14	0,252
	Crianças	12,0 (9,4, 15,1) n=79	11,5 (8,2, 18,3) n=6	0,932
	Gestantes	10,8 (8,2, 14,3) n=250	11,5 (8,5, 13,3) n=21	0,927
	Lactantes	9,8 (7,7, 12,0) n=49	12,6 (7,5, 14,3) n=3	0,429
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Idosos	444,0 (333,0, 616,5) n=241	373,5 (288,2, 647,7) n=14	0,317
	Crianças	901,0 (611,0, 1204,0) n=79	772,5 (518,7, 1000,5) n=6	0,359
	Gestantes	322,0 (253,7, 424,0) n=250	324,0 (263,5, 399,5) n=21	0,738
	Lactantes	488,0 (414,0, 622,5) n=49	627,0 (576,0, 699,0) n=3	0,094
Hcy (µmol/L)	Idosos	13,5 (11,2, 17,1) n=241	13,3 (10,7, 18,4) n=14	0,896
	Crianças	6,2 (5,2, 7,1) n=78	5,9 (5,2, 8,4) n=6	0,876
	Gestantes	6,4 (5,4, 7,5) n=250	6,2 (5,1, 7,8) n=21	0,710
	Lactantes	9,4 (7,5, 10,8) n=49	12,6 (8,9, 12,6) n=3	0,193

Valores expressos como mediana e percentil (P25, P75)

¹Teste de *Mann-Whitney*

²CC, wild type; e CT, heterozigoto

Tabela 9. Níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy de acordo com o polimorfismo no gene MTHFR C677T em idosos, crianças, gestantes e lactantes.

GRUPOS	MTHFR C677T ²		P ¹	
	CC	CT+TT		
Folato (ng/mL)	Idosos	11,2 (8,6, 13,3) n= 103	11 (8,6, 14,0) n= 154	0,976
	Crianças	12,0 (9,3, 14,4) n= 51	12,8 (9,5, 15,2) n= 43	0,516
	Gestantes	11,2 (9,0, 15,0) n= 139	9,7 (7,6, 13,9) n= 139	0,030
	Lactantes	10,0 (9,1, 12,5) n= 27	9,7 (7,1, 12,2) n= 25	0,447
Vitamina B ₁₂ (pg/mL)	Idosos	463,0 (345,0, 594,0) n= 103	426,0 (316,5) n= 154	0,335
	Crianças	790,0 (572,0, 1109,0) n= 51	901,0 (658,0, 1188,0) n= 43	0,428
	Gestantes	321,0 (249,0, 420,0) n= 139	330,0 (257,0, 426,0) n= 139	0,550
	Lactantes	488,0 (437,0, 627,0) n= 27	517,0 (391,5, 605,5) n= 25	0,527
Hcy (µmol/L)	Idosos	13,2 (10,9, 15,7) n= 103	13,6 (11,3, 17,8) n= 154	0,239
	Crianças	6,2 (5,4, 7,2) n= 51	6,0 (5,0, 7,7) n= 43	0,956
	Gestantes	6,2 (5,4, 7,4) n= 139	6,4 (5,3, 7,6) n= 139	0,287
	Lactantes	9,4 (7,6, 10,7) n= 27	9,5 (7,5, 11,9) n= 26	0,677

Valores expressos como mediana e percentil (P25, P75)

¹Teste de *Mann-Whitney*

²CC, wild type; CT, heterozigoto; e TT, homozigoto

5.8. Determinantes clínicos, bioquímicos e genéticos para os níveis de Hcy no grupo de estudo

Os resultados da análise de regressão linear múltipla com critério de seleção de variáveis *stepwise* estão descritos na tabela 10.

Através dessa análise pode-se observar que folato, vitamina B₁₂, gênero (masculino), idade e o polimorfismo no gene RFC1 A80G (genótipo AA) foram as variáveis que explicaram as alterações nos níveis de Hcy nos idosos. Em crianças e gestantes, as variáveis que influenciaram a concentração de Hcy foram vitamina B₁₂ e folato, respectivamente. Por outro lado, observamos que nenhuma das variáveis influenciou os níveis de Hcy em lactantes.

Tabela 10. Associações entre as variáveis clínicas, bioquímicas e genéticas sobre os níveis de Hcy em idosos, crianças e gestantes.

Grupos	Variáveis independentes	Beta	Erro padrão beta	R²	P*
Idosos	Folato	-4,594	1,183	0,044	<0,001
	Vitamina B ₁₂	-0,044	0,012	0,032	<0,001
	Gênero (M) ¹	52,785	8,325	0,162	<0,001
	Idade (anos)	3,219	0,594	0,071	<0,001
	RFC1 (genótipo AA x AG)	-26,995	10,625	0,019	0,011
	(genótipo AA x GG)	-11,736	11,338		
Crianças	Vitamina B ₁₂	-0,023	0,009	0,0782	0,011
Gestantes	Folato	-3,743	1,198	0,0355	0,002

Variáveis independentes: idade, gênero (M x F), tabagismo, hipertensão, diabetes, dislipidemia, IMC, polimorfismos (RFC1 A80G, GCPII C1561T e MTHFR C677T), folato e vitamina B₁₂.

¹M, masculino



6. DISCUSSÃO

As deficiências de folato, vitamina B₁₂ e ferro representam um grande problema de Saúde Pública e são prevalentes entre todas as faixas etárias no Brasil e em outros países. Um problema na prática clínica é que às vezes essas deficiências somente são identificadas quando já ocorreram complicações graves, como por exemplo, o DTN. Assim, a prevenção dessas deficiências torna-se um grande desafio para a saúde no mundo. No Brasil, desde 2004 foi instituída a fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro, objetivando suprir as necessidades mínimas diárias, e conseqüentemente evitando a deficiência através de um método de fácil execução.

Apesar de alguns estudos publicados no Brasil, que avaliaram a repercussão dessa medida sobre a prevalência da deficiência de ferro e anemia ferropriva, praticamente não há estudos relacionados à deficiência de folato e vitamina B₁₂.

A deficiência de folato e vitamina B₁₂, e alguns polimorfismos genéticos podem estar associados à hiperhomocisteinemia, que tem sido avaliada como um marcador de doenças vasculares, consideradas a maior causa de morbimortalidade populacional. Portanto, medidas que possam diminuir a ocorrência de hiperhomocisteinemia na população geral podem também contribuir para menor incidência das doenças vasculares.

Neste estudo, foram avaliadas a prevalência das deficiências de folato, vitamina B₁₂ e ferro, bem como, a presença de hiperhomocisteinemia e polimorfismos que potencialmente afetam os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy,

em diversos grupos de uma amostra da população brasileira, após o programa de fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro, adotado pela ANVISA.

6.1. Deficiências de folato e vitamina B₁₂

O presente estudo demonstrou níveis adequados de folato na população geral estudada, pois apenas 0,3% apresentaram a deficiência desta vitamina. A análise de vitamina B₁₂ demonstrou uma prevalência desta deficiência de 5,3%. Um estudo realizado em uma população dessa mesma região mostrou ausência de deficiência de folato e deficiência de vitamina B₁₂ em 6% dos adultos [35].

Em países desenvolvidos, a deficiência de folato é incomum, apesar de poder ser encontrada em alguns países em desenvolvimento [68]. Além disso, as diferentes prevalências encontradas entre os estudos, que pode variar de 2 a 20%, pode ser decorrente do método laboratorial empregado e do nível de vitamina B₁₂, definido como deficiência [68, 69].

Consideramos que nossos resultados representam o perfil dessas vitaminas nessa população, pois a dosagem foi realizada em uma casuística de 719 indivíduos, de várias faixas etárias e em diversas condições clínicas, e por métodos laboratoriais validados e considerados adequados para a análise. Além disso, como discutiremos à frente, a avaliação de acordo com os grupos, também se torna importante, pois permite que se identifiquem indivíduos expostos a situações associadas a um maior risco de desenvolvimento dessas deficiências, e que necessitam de maiores cuidados para sua prevenção.

Sabe-se que a deficiência de folato pode ocorrer em todas as idades, principalmente em indivíduos com uma dieta inadequada ou que sofrem de má absorção intestinal [70]. A associação com condições que aumentem suas necessidades diárias também podem ter um papel nessa deficiência. Na gestação essa situação é mais evidente no terceiro trimestre, quando as necessidades aumentam muito e a dieta pode ser inadequada para suprir essa situação [55].

Os níveis de vitamina B₁₂ também diminuem com a idade devido à má absorção, sendo mais comum em idosos [36]. Estima-se que aproximadamente 10% dos idosos apresentam níveis reduzidos de vitamina B₁₂, e sua prevalência aumenta com a idade, de 5% aos 65 anos a 20% aos 80 anos [69, 71].

Em nosso estudo, em idosos com uma mediana de idade de 67 anos, a deficiência de folato esteve presente apenas em um indivíduo, mas 11 (4,2%) deles apresentaram deficiência de vitamina B₁₂, e 37 (14%) demonstraram níveis marginais (200 – 300 pg/mL). Coussirat *et al.* avaliaram 545 idosos (≥ 60 anos) atendidos em um Hospital Universitário de Porto Alegre e verificaram que 0,5% tinham deficiência de folato, 5,5% tinham deficiência de vitamina B₁₂, e 23,3% apresentavam níveis marginais [72]. O estudo realizado por Xavier *et al.* mostrou que 7,2% dos idosos eram deficientes de vitamina B₁₂, e o estudo Framingham mostrou que esta deficiência estava presente em 12% dos idosos [35, 73, 74].

Nossos resultados sugerem que a fortificação de farinhas com ácido fólico foi eficaz na prevenção da deficiência de folato, mas evidencia uma situação que muitas vezes pode passar despercebida nos idosos, que é a deficiência de

vitamina B₁₂. A atrofia da mucosa gástrica, decorrente da presença de anticorpos contra o fator intrínseco (muitas vezes não diagnosticado), ou pela presença do *H. Pylori* podem ter um papel como fator etiológico da deficiência de vitamina B₁₂ nessa faixa etária.

Quase a totalidade desses indivíduos não apresenta anemia, e os sintomas como depressão, demência e função cognitiva prejudicada, que têm sido associados com essa deficiência, podem ser interpretados erroneamente como decorrentes da idade ou de outras comorbidades [75-77]. Assim, pode haver piora do quadro clínico pela falta do diagnóstico adequado e tratamento. Nesse sentido nossos achados tem grande relevância na prática clínica, sugerindo que a dosagem dessa vitamina deve fazer parte da rotina diagnóstica de pacientes a partir dos 60 anos, mesmo sem qualquer queixa aparente. A elevada prevalência de idosos com níveis marginais de vitamina B₁₂ é outro dado importante, pois as complicações neurológicas irreversíveis que podem ocorrer na deficiência dessa vitamina ainda não estão presentes, e medidas terapêuticas podem logo ser empregadas.

As crianças (0,5 a 6 anos) incluídas em nosso estudo não apresentaram deficiências de folato e vitamina B₁₂. Vários estudos realizados em países em desenvolvimento, como a Colômbia e a Índia, tem descrito uma prevalência muito baixa de deficiência dessas vitaminas [78, 79]. No Brasil, um estudo que incluiu 1111 crianças amazonenses descreveu que a deficiência de folato e vitamina B₁₂ foram de 2,5 e 3,7%, respectivamente [33]. Outro estudo realizado com 167

crianças do estado do Acre demonstrou que a deficiência de folato e vitamina B₁₂ estiveram presentes em 2,2 e 11,7%, respectivamente. Vale ressaltar que este último estudo incluiu apenas crianças até 2 anos de idade, que permaneciam sob aleitamento materno ou não ingeriam hortaliças, frutas e derivados animais até mais de 1 ano de vida, o que pode ter contribuído para a elevada deficiência de vitamina B₁₂ [80].

Shakur *et al.* relataram que desde a fortificação de alimentos com ácido fólico, a deficiência desta vitamina reduziu a praticamente zero em crianças com idades entre 1 a 14 anos [81]. Estes resultados sugerem que não há aparentemente nenhuma vantagem adicional da suplementação com ácido fólico em países onde os alimentos são fortificados [82].

Os nossos resultados sugerem que a fortificação foi adequada para a prevenção de deficiência de folato nessas crianças, e que a dieta supriu as necessidades de vitamina B₁₂. Como as necessidades diárias dessa vitamina são ínfimas, a carência de origem alimentar é excepcional, e apesar de se tratarem de crianças, devem consumir alimentos que contém esse nutriente. De forma diferente dos idosos, em que a ocorrência de situações associadas à má absorção são comuns, essas crianças não tinham história sugestiva de alterações intestinais.

Durante a gestação, folato e vitamina B₁₂ são cruciais para o desenvolvimento normal do feto, pois as necessidades fisiológicas destes nutrientes aumentam muito e, portanto, uma ingestão inadequada aumenta o risco

de anormalidades do desenvolvimento, dentre elas, DTN [83, 84]. Os resultados do presente estudo mostraram que a mediana dos níveis de folato (10,7 ng/mL) e de vitamina B₁₂ (325,0 pg/mL) foram maiores que a mediana relatada por Guerra-Shinohara *et al.* em 2002 (5,6 ng/mL e 181,1 pg/mL, respectivamente), quando ainda não era realizada a fortificação de alimentos [23].

Podemos, portanto, destacar que a deficiência de folato foi praticamente inexistente em nosso estudo (apenas uma gestante com deficiência), e que os níveis de folato foram maiores em gestantes que faziam uso de suplementação. De acordo com alguns estudos, a fortificação obrigatória de farinhas com ácido fólico resultou não apenas em uma melhora no aporte e nos níveis de folato no sangue, mas também numa redução da ocorrência de DTN [85-87]. Nossos resultados favorecem a eficácia desse programa, pois mesmo sem suplementação observou-se níveis normais de folato. Contudo, não podemos excluir que a suplementação possa ter contribuído para obtenção de níveis adequados de folato em quase todas as gestantes.

A prevalência de deficiência de vitamina B₁₂ (8,9%) e de níveis marginais (32,7%) foi mais prevalente no grupo de gestantes. Uma alta prevalência dessa deficiência em gestantes também tem sido descrita em outras populações [88]. Ray *et al.* descrevem que uma em cada 20 gestantes canadenses podem ser deficientes de vitamina B₁₂, durante o período crítico de fechamento do tubo neural [89]. Outros estudos também tem associado a deficiência de vitamina B₁₂ com o

aumento no risco de DTN, especialmente após a fortificação de farinhas com ácido fólico [41, 42].

Nossos dados evidenciam que a deficiência de vitamina B₁₂ deve ser investigada em gestantes, principalmente pela associação com complicações importantes, particularmente o DTN, e pelo fato de ser facilmente diagnosticada, e poder ser tratada com eficácia.

Também é interessante ressaltar o elevado número de gestantes com níveis marginais de vitamina B₁₂, e que talvez constitua um grupo de alerta, em que a suplementação possa ser indicada profilaticamente. Molloy *et al.* demonstraram que níveis de vitamina B₁₂ abaixo de 300 pg/mL já estão associados a um aumento do risco de DTN [90].

Também não podemos descartar o efeito da hemodiluição sobre os níveis de vitamina B₁₂, pois todas as pacientes com deficiência estavam no último trimestre da gestação, exceto uma paciente com 16 semanas de gestação.

Neste estudo, não observamos deficiência de folato em lactantes, e a deficiência de vitamina B₁₂ esteve presente em apenas 1,8% das pacientes. Apesar desse período ainda ter uma necessidade aumentada de nutrientes, uma dieta balanceada parece ser suficiente para suprir a demanda. Este dado é interessante, no sentido de que essas alterações poderiam comprometer a qualidade do leite materno, e conseqüentemente favorecer a deficiências no lactente [82].

6.2. Hiperhomocisteinemia e Polimorfismos nos genes RFC1 A80G, GCPII C1561T e MTHFR C677T

Apesar do objetivo principal da fortificação de farinhas com ácido fólico ser a redução de DTN, o potencial benefício para a população geral em diminuir o risco de doenças cardiovasculares via redução dos níveis de Hcy também é relevante [21].

A hiperhomocisteinemia tem sido considerada um fator de risco para doenças vasculares. O aumento de Hcy está relacionado à deficiência de folato, vitamina B₁₂ e polimorfismos genéticos.

Alguns estudos de base populacional sugerem que o declínio na mortalidade relacionada ao acidente vascular cerebral (AVC) coincidiu com a introdução da fortificação com ácido fólico nos Estados Unidos e Canadá [91]. Contudo, algumas meta-análises que avaliaram o risco de doença cardiovascular ou mortes de qualquer etiologia, em pacientes com ou sem doença prévia, não conseguiram mostrar um efeito benéfico dessa estratégia. Parece que em alguns subgrupos de pacientes, como aqueles com doença renal, a suplementação pode ter um efeito benéfico [92, 93].

Nossos resultados mostraram uma prevalência bastante elevada de hiperhomocisteinemia no grupo de idosos (34,3%). Além disso, a análise multivariada mostrou que nesse grupo, houve uma influência dos níveis de folato e vitamina B₁₂, além da idade, gênero (masculino) e o polimorfismo RFC1 (genótipo AA) sobre os níveis deste aminoácido. A hiperhomocisteinemia pode ser

consequência do aumento de *stress* oxidativo, mais comum com o envelhecimento, e na presença de fatores como hipertensão arterial, diabetes e dislipidemia. Estes fatores foram muito comuns neste grupo de indivíduos e talvez possam justificar a prevalência tão elevada desta condição. Nossos resultados corroboram com outros estudos que também consideram a diminuição dessas vitaminas e o aumento da idade como fatores relacionados a esta condição [74, 94].

Nas crianças incluídas neste estudo, a hiperhomocisteinemia foi rara e a análise multivariada demonstrou efeito dos níveis de vitamina B₁₂. Um estudo realizado com 207 crianças da região de Campinas demonstrou que os fatores adquiridos, vitamina B₁₂ e folato, foram os mais importantes na definição dos níveis de Hcy plasmática [95].

Com relação ao grupo de gestantes, os níveis de Hcy estavam dentro da normalidade na maioria dos casos, e apenas 8 delas tinham um leve aumento (mediana 13,6 µmol/L). A análise multivariada mostrou que o folato teve um papel sobre os níveis de Hcy.

Sabe-se que os níveis de Hcy em gestantes são mais baixos que em mulheres não gestantes [96, 97]. Estudos relatam que níveis elevados de Hcy (> 15,33 µmol/L) foram observados em mães de recém-nascidos com DTN [98, 99]. Diversos estudos também têm associado níveis elevados de Hcy a uma variedade de efeitos adversos durante a gestação, tais como, descolamento de placenta, restrição do crescimento intrauterino, abortos recorrentes, abortos

espontâneos e pré-eclampsia [100-102]. Apesar de não termos dados sobre o desfecho das gestações, os níveis de Hcy não apontam para uma possível complicação relacionada a esse aminoácido.

Neste estudo, 5% das lactantes apresentaram níveis de Hcy acima de 15 $\mu\text{mol/L}$. Ramlau-Hansen *et al.* mostraram que lactantes que não faziam uso de suplementos com ácido fólico tinham uma alta frequência de hiperhomocisteinemia, quando comparadas com lactantes que faziam uso de suplementação, e com uma população controle [103]. Apesar da relação entre folato e hiperhomocisteinemia em lactantes, nossos resultados não evidenciaram, na análise multivariada, nenhum fator que pudesse interferir com os níveis de Hcy.

Em nosso estudo, as frequências dos genótipos dos polimorfismos nos genes RFC1 e MTHFR foram semelhantes às relatadas em outras populações [47, 48, 104], enquanto que as frequências do genótipo do polimorfismo no gene GCP11 foram diferentes das descritas por outros estudos [46, 49].

Dentre os polimorfismos investigados, apenas o polimorfismo no gene MTHFR (C677T) foi significativamente associado com os níveis de folato, em gestantes. Está bem estabelecido na literatura que os níveis reduzidos de folato podem ser cruciais para o desenvolvimento de hiperhomocisteinemia em indivíduos com este polimorfismo [105, 106]. Por outro lado, os níveis de Hcy tendem a ser independentes do genótipo, em populações com alta frequência do alelo T ($\geq 20\%$) [107, 108].

Diversos estudos não têm demonstrado que o polimorfismo no gene RFC1 (A80G) influencia os níveis de folato e Hcy [48, 109, 110], porém nossos resultados demonstraram uma tendência em gestantes com relação aos níveis de Hcy. Em uma população não selecionada, indivíduos homozigotos para ambos os polimorfismos nos gene RFC1 (A80G) e MTHFR (C677T) tinham níveis de Hcy moderadamente elevados [47]. Lopreato *et al.* também observaram em gestantes homozigotas para estes mesmos polimorfismos uma redução nos níveis de folato, e um aumento nos níveis de Hcy foi observado em gestantes carreadoras dos alelos TT/AG [51]. Com relação ao polimorfismo no gene GCPII (C1561T), nenhuma associação com folato, vitamina B₁₂ e Hcy foi observada no grupo de estudo. De acordo com Devlin *et al.*, carreadores do alelo T tiveram níveis de folato significativamente mais baixos e níveis elevados de Hcy [46]. Entretanto, estes achados não foram confirmados por outro estudo realizado pelo mesmo autor [48].

Em resumo, diversos fatores confundidores podem interferir com os efeitos dos polimorfismos sobre os níveis de folato, vitamina B₁₂ e Hcy, pela interação com outros polimorfismos ou com fatores ambientais [48].

6.3. Deficiência de ferro

A deficiência de ferro é a alteração nutricional mais prevalente no mundo, e atualmente é reconhecida pela OMS como um dos 10 maiores riscos para a saúde global [111, 112]. A anemia afeta cerca de 2 bilhões de pessoas no mundo inteiro

e metade dos casos de anemia são causadas pela deficiência de ferro [111]. Apesar da fortificação de farinhas com ferro ser obrigatória no Brasil desde 2004, observamos neste estudo, que a prevalência da deficiência de ferro foi de 12,6%, e da anemia ferropriva de 3,7%. A anemia esteve presente em 9,4% dos casos, e a principal causa foi a deficiência de ferro (38,8%).

Neste estudo a prevalência de anemia nos idosos foi de aproximadamente 7%, e em apenas 16,6% dos casos foi decorrente da deficiência de ferro, semelhante à deficiência de vitamina B₁₂. Portanto, a prevalência de anemia ferropriva foi de 1,2%. Os resultados são muito semelhantes aos descritos por Fleming *et al.*: 9% de anemia , 2,7% de deficiência de ferro, e 1,2% de anemia ferropriva, em idosos com uma média de idade de 76,3±5,0 anos [113].

Os níveis de hemoglobina tendem a diminuir com a idade, e a anemia é considerada como o problema de saúde mais importante entre os idosos, mas estima-se que a prevalência desta condição varia substancialmente devido à etnia, estado de saúde e circunstâncias de vida [114]. Alguns sintomas típicos da anemia, tais como, fadiga, fraqueza e dispneia não são específicos, e em idosos tendem a ser atribuído à idade avançada, mascarando o diagnóstico [115]. Por outro lado, a anemia em idosos, apesar de normalmente ser leve, está associada ao mau desempenho físico [116, 117], aumento da susceptibilidade a queda [118], fragilidade [119], disfunção cognitiva [120] e morte [121].

Aproximadamente um terço da anemia nos idosos é devido à presença de doenças crônicas e um terço apresenta anemia inexplicada. A deficiência de ferro

isoladamente ou em combinação com as deficiências de folato e vitamina B₁₂, também é responsável por um terço das anemias [122].

Em países industrializados, a anemia ferropriva raramente é resultado de uma dieta inadequada [123]. Na maioria das vezes, a anemia ferropriva é decorrente da perda de sangue por alterações gastrointestinais crônicas [115].

Nossos resultados sugerem que a fortificação de farinhas com ferro foi eficaz para os idosos deste estudo, pois dos 262 idosos avaliados apenas 4 indivíduos (1,5%) apresentaram deficiência de ferro e 3 (1,2%) deles tinham anemia ferropriva. Também corroboram com o descrito na literatura, em que um terço da anemia em idosos é devido à deficiência de nutrientes, neste caso ferro e vitamina B₁₂. Além disso, a identificação da anemia e dos fatores causais é de extrema importância nessa faixa etária, uma vez que alguns sintomas podem ser confundidos devido a idade.

Na infância, a deficiência de ferro e a anemia ferropriva podem resultar em atraso no desenvolvimento, alterações de comportamento e comprometimento na capacidade de aprendizagem [124]. Embora a anemia ferropriva possa ser tratada, as alterações no desempenho cognitivo podem não ser corrigidas [125]. Portanto, a detecção da deficiência de ferro antes que a anemia progrida é crucial para prevenir deficiências neurocognitivas em crianças em situação de risco [126].

Em nosso estudo, no grupo de crianças de 0,5 a 6 anos, 13,6% apresentavam anemia, sendo que a anemia ferropriva estava presente em 4,9%, e a deficiência de ferro em 9,9%.

Crianças de 1 a 3 anos de idade são mais vulneráveis à deficiência de ferro, uma vez que as reservas de ferro materno estão esgotadas durante o período de crescimento acelerado [127, 128]. Como observado em nosso estudo, apenas as crianças menores de 3 anos apresentaram deficiência de ferro, mostrando que nessa faixa etária as necessidades nutricionais estão realmente aumentadas.

De acordo com o estudo NHANES III, a prevalência da deficiência de ferro e anemia ferropriva em crianças de 12 a 30 meses de idade é de 9 e 3%, respectivamente [127]. Bogen *et al.* relatou que em crianças de 9 a 30 meses de idade a prevalência da anemia (35%), deficiência de ferro (7%) e anemia ferropriva (8%) não variou significativamente com a idade [129]. Entretanto, estudos mostram em crianças de 1 a 3 anos uma prevalência da deficiência de ferro de 15% [130].

Um estudo realizado em crianças (< 6 anos) da região Sul do Brasil relatou que a deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva esteve presente em 39,5, 15,8 e 18,4%, respectivamente. Este estudo demonstrou que a falta de impacto do programa de fortificação pode ser atribuído à adição de ferro reduzido ou mesmo em quantidades inadequadas aos grãos, ocasionando baixa biodisponibilidade, além da má qualidade da alimentação das crianças, culminando com aumento na prevalência da anemia, principalmente em crianças menores de 2 anos [131]. Bortolini *et al.* demonstraram que a deficiência de ferro é a principal causa de anemia em crianças menores de 2 anos, e considera que a anemia em crianças com idade entre 3 a 4 anos seja devido a outras causas [132].

Consideramos que mesmo após o programa de fortificação, a deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva continuam presentes principalmente em crianças menores de 3 anos, nas quais as necessidades de ferro se encontram elevadas. Devido a importância de um consumo de ferro adequado à demanda necessária, nossos resultados corroboram com a indicação da suplementação com ferro, principalmente em crianças menores de 2 anos, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde e pela Sociedade Brasileira de Pediatria.

Em gestantes, a adequação de ferro é importante para garantir uma gestação sem complicações, bem como, o desenvolvimento normal do feto [133]. A OMS estima que 25,1% das gestantes desenvolvem anemia ferropriva, com uma prevalência maior de mulheres deficientes de ferro sem anemia [63].

O presente estudo mostrou que no grupo de gestantes a prevalência da deficiência de ferro foi de 25,1%, que a anemia esteve presente em 11,1%, e a anemia ferropriva em 5,5%. Portanto, 50% dos casos de anemia foram devido à deficiência de ferro. Nossos resultados corroboram com a estimativa da OMS de que a prevalência da deficiência de ferro sem anemia (18,2%) é maior que a anemia ferropriva.

A prevalência global da anemia em gestantes é de 4,8%, e nas Américas esta prevalência é de 24% [63]. Antes da implantação da fortificação no Brasil, a causa da anemia em gestantes era principalmente decorrente da deficiência de ferro (46,7%) e ácido fólico (44,4%) [28]. Após a fortificação alguns estudos demonstraram uma diminuição nessa prevalência [134, 135]. Fujimori *et al.* (2011)

demonstraram que a prevalência da anemia em gestantes diminuiu de 25 para 20%, tendo maior impacto nas regiões norte e nordeste. Contudo, a prevalência nessas regiões ainda continua elevada. Por outro lado, Sato *et al.* não observaram estes achados em gestantes do Estado de São Paulo após a fortificação [136]. Esses dados sugerem que além da alimentação, outros fatores importantes, como nível socioeconômico, educacional, e aqueles relacionados à própria gestação, tem também um papel importante na etiologia da anemia gestacional.

Durante a gestação, o aumento das necessidades fisiológicas de ferro está associado com a expansão da massa eritrocitária, desenvolvimento de órgãos e crescimento do feto, da placenta e cordão umbilical [133]. Isto implica num maior risco para a deficiência de ferro nestas pacientes, e que pode justificar a alta prevalência da deficiência de ferro observada em nosso estudo.

De fato, os níveis de ferritina e hemoglobina em gestantes foram menores, principalmente entre 20^a a 40^a semana de gestação. Um estudo realizado em gestantes do estado de São Paulo observou uma redução nos níveis de ferritina, ferro sérico e saturação de transferrina ao longo da gravidez [137]. Assim como este estudo, podemos sugerir que esses achados podem estar relacionados à hemodiluição fisiológica, e associados a uma dieta inadequada às necessidades de ferro [138].

Nossos resultados evidenciam que somente a fortificação de farinhas com ferro não supre as necessidades durante a gestação. Também podemos destacar que a suplementação com ferro durante a gestação, apesar de aumentar a

ferritina significativamente, em comparação às gestantes sem suplementação, não foi suficiente para erradicar a deficiência. Isto é evidente ao notarmos que 18,8% das gestantes com suplementação ainda apresentavam deficiência de ferro. Estes dados reforçam a obrigatoriedade do uso de suplementação durante este período, talvez indicando para um controle da ferritina sérica e aumento da dose quando necessário [139].

O estado nutricional das lactantes é um importante problema de saúde, e a manutenção dos nutrientes de forma inadequada pode ter consequências deletérias [140, 141]. Entretanto, os fatores que regulam a concentração de ferro no leite materno ainda não são totalmente elucidados [142].

Um estudo sugere que a concentração de ferro no leite materno é altamente regulada, e que não é determinada pelos níveis de hemoglobina, ferro sérico e ferritina das lactantes [142].

Em lactantes do Japão a prevalência de anemia (11,1%) foi relativamente mais baixa em comparação com as gestantes (22,9%). Apesar deste estudo não ter avaliado a concentração de ferritina, sugeriu que a deficiência grave de ferro possa não ser prevalente nesta população [143].

Stuetz *et al.* encontraram uma alta prevalência da deficiência de ferro em lactantes (21%), e atribuiu este fato a uma dieta inadequada e a baixa aceitação da suplementação [144].

Como observado em nosso estudo, a prevalência da deficiência de ferro, anemia e anemia ferropriva nas lactantes foi de 3,7%, 5,1%, e 3,7%, respectivamente. Um fator limitante deste grupo é o pequeno número de mulheres que foram incluídas. O que fica evidente é que a deficiência de ferro foi muito menor nas lactantes, em relação às gestantes. Isso deve ser decorrente da necessidade diária de ferro muito menor nesse período, e que a fortificação dos grãos é relativamente capaz de suprir.

É importante ressaltar que mais de 50% dos casos de anemia no nosso estudo não foram decorrentes da deficiência de ferro, vitamina B₁₂, ou folato, evidenciando que outros fatores transitórios, como no caso da hemodiluição em gestantes, podem ter um papel importante. Também fica claro que as crianças tem uma alta prevalência de anemia, que na maioria dos casos não foi decorrente da deficiência dos nutrientes investigados neste estudo.



7. CONCLUSÃO

1. A deficiência de folato foi praticamente inexistente nos diversos grupos avaliados após a fortificação de farinhas com ácido fólico e ferro;
2. A deficiência de vitamina B₁₂ foi prevalente em gestantes e idosos, alertando para uma avaliação cuidadosa dessa condição nesses indivíduos, que constituem um grupo de maior risco, por provável aumento de demanda, má absorção, ou hemodiluição especificamente nas gestantes;
3. A deficiência de ferro foi prevalente em crianças e gestantes. Apesar da fortificação, os resultados deste estudo demonstram que alguns grupos populacionais apresentam uma necessidade diária de ferro superior à obtida com a fortificação;
4. Medidas como suplementação e a dosagem desses nutrientes em grupos populacionais de risco devem ser implementados em políticas de Saúde Pública. Além disso, a qualidade da fortificação deve ser sempre avaliada pelos órgãos competentes;
5. A hiperhomocisteinemia foi frequente em idosos, podendo ser um marcador ou estar relacionada à etiologia da doença arterial, comum nessa faixa etária;
6. Apenas o polimorfismo no gene MTHFR (C677T) mostrou influências sobre os níveis de folato em gestantes, evidenciando que os fatores adquiridos são os mais importantes;

7. Os níveis de folato e vitamina B₁₂ foram os determinantes mais importantes da concentração de Hcy no plasma.



8. REFERÊNCIAS

- [1] Kamen B. Folate and antifolate pharmacology. *Seminars in oncology*. 1997 Oct;24(5 Suppl 18):S18-30-S18-39.
- [2] Ly A, Hoyt L, Crowell J, Kim YI. Folate and DNA methylation. *Antioxidants & redox signaling*. 2012 Jul 15;17(2):302-26.
- [3] Tam C, O'Connor D, Koren G. Circulating unmetabolized folic Acid: relationship to folate status and effect of supplementation. *Obstetrics and gynecology international*. 2012;2012:485179.
- [4] Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert reviews in molecular medicine*. 2009;11:e4.
- [5] Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular genetics and metabolism*. 2000 Sep-Oct;71(1-2):121-38.
- [6] Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitan D, Sanchez H, Allen LH, et al. Folate, vitamin B12 and human health. *Revista medica de Chile*. 2012 Nov;140(11):1464-75.
- [7] Food and Nutrition Board Institute of Medicine. Folate in dietary reference intakes of thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline: The National Academies Press, Washington, DC, USA 1998.
- [8] WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2004.
- [9] WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Geneva, World Health Organization, 2012.
- [10] Lamers Y. Indicators and methods for folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status assessment in humans. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2011 Sep;14(5):445-54.
- [11] de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food and nutrition bulletin*. 2008 Jun;29(2 Suppl):S238-44.
- [12] Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Apr;13(4):511-9.

- [13] Mason JB, Levesque T. Folate: effects on carcinogenesis and the potential for cancer chemoprevention. *Oncology* (Williston Park, NY. 1996 Nov;10(11):1727-36, 42-3; discussion 43-4.
- [14] Choi SW, Mason JB. Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *The Journal of nutrition*. 2000 Feb;130(2):129-32.
- [15] Zhang S, Hunter DJ, Hankinson SE, Giovannucci EL, Rosner BA, Colditz GA, et al. A prospective study of folate intake and the risk of breast cancer. *Jama*. 1999 May 5;281(17):1632-7.
- [16] Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Aug;94(2):666S-72S.
- [17] Allen LH. Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food and nutrition bulletin*. 2008 Jun;29(2 Suppl):S20-34; discussion S5-7.
- [18] Food and Nutrition Board Institute Medicine. Folate in dietary reference intakes of thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline: The National Academies Press, Washington, DC, USA 1998.
- [19] Allen LH, de Benoist, B., Dary, O., Hurrell, R. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization and Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2006.
- [20] McLean E, de Benoist B, Allen LH. Review of the magnitude of folate and vitamin B12 deficiencies worldwide. *Food and nutrition bulletin*. 2008 Jun;29(2 Suppl):S38-51.
- [21] Hoey L, McNulty H, Askin N, Dunne A, Ward M, Pentieva K, et al. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition*. 2007 Nov;86(5):1405-13.
- [22] Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *The American journal of clinical nutrition*. 2005 Aug;82(2):442-50.
- [23] Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. *Bjog*. 2002 Jul;109(7):784-91.

[24] Nogueira NN, Parente, J.V., Cozzolino, S.M.F. Mudanças na concentração plasmática de zinco e ácido fólico em adolescentes grávidas submetidas a diferentes esquemas de suplementação. *Cad Saude Publica* 2003;19:155-60.

[25] Fonseca VM, Sichieri R., Basilio, L., Ribeiro, L.V.C. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. *Rev Bras Epidemiol* 2003;6:319-27.

[26] Guerra-Shinohara EM, Morita OE, Peres S, Pagliusi RA, Sampaio Neto LF, D'Almeida V, et al. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Nov;80(5):1312-21.

[27] Barros DC, Pereira, R.A., Gama, S.G.N., Leal, M.C. O consumo alimentar de gestantes adolescentes no município do Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica*. 2004;20:121-9.

[28] Guerra EM, Barretto OC, Pinto AV, Castellao KG. [The prevalence of iron deficiency in pregnant women at their first consultation in health centers in a metropolitan area, Brazil. Etiology of anemia]. *Revista de saude publica*. 1992 Apr;26(2):88-95.

[29] Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA). Resolução RDC nº 344, 13 dezembro 2002.

[30] Martinez-de Villarreal LE, Limon-Benavides C, Valdez-Leal R, Sanchez-Pena MA, Villarreal-Perez JZ. Efecto de la administración de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. *Salud publica de Mexico*. 2001;43:103-7.

[31] Brent RL, Oakley GP, Jr., Mattison DR. The unnecessary epidemic of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Pediatrics*. 2000 Oct;106(4):825-7.

[32] Marchioni DML, Verly-Jr E, Steluti J, Cesar CLG, Fisberg RM. Ingestão de folato nos períodos pré e pósfortificação mandatória: estudo de base populacional em São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2013;29(10):2083-92.

[33] Cardoso MA, Scopel KK, Muniz PT, Villamor E, Ferreira MU. Underlying factors associated with anemia in Amazonian children: a population-based, cross-sectional study. *PLoS one*. 2012;7(5):e36341.

[34] Bueno MB, Fisberg RM, Maximino P, Rodrigues Gde P, Fisberg M. Nutritional risk among Brazilian children 2 to 6 years old: a multicenter study. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2013 Feb;29(2):405-10.

[35] Xavier JM, Costa FF, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST. High frequency of vitamin B12 deficiency in a Brazilian population. *Public health nutrition*. 2010 Aug;13(8):1191-7.

[36] MacFarlane AJ, Greene-Finestone LS, Shi Y. Vitamin B-12 and homocysteine status in a folate-replete population: results from the Canadian Health Measures Survey. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Oct;94(4):1079-87.

[37] Carmel R. Current concepts in cobalamin deficiency. *Annual review of medicine*. 2000;51:357-75.

[38] Nicolas JP, Gueant JL. [Absorption, distribution and excretion of vitamin B12]. *Annales de gastroenterologie et d'hepatologie*. 1994 Nov-Dec;30(6):270-6, 81; discussion 81-2.

[39] Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Cmaj*. 2004 Aug 3;171(3):251-9.

[40] Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: overview and interaction with riboflavin, vitamin B6, and polymorphisms. *Food and nutrition bulletin*. 2008 Jun;29(2 Suppl):S5-16; discussion S7-9.

[41] Ray JG, Blom HJ. Vitamin B12 insufficiency and the risk of fetal neural tube defects. *Qjm*. 2003 Apr;96(4):289-95.

[42] Ray JG, Wyatt PR, Thompson MD, Vermeulen MJ, Meier C, Wong PY, et al. Vitamin B12 and the risk of neural tube defects in a folic-acid-fortified population. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2007 May;18(3):362-6.

[43] Bjorkegren K, Svardsudd K. A population-based intervention study on elevated serum levels of methylmalonic acid and total homocysteine in elderly people: results after 36 months of follow-up. *Journal of internal medicine*. 2004 Nov;256(5):446-52.

[44] Healton EB, Savage DG, Brust JC, Garrett TJ, Lindenbaum J. Neurologic aspects of cobalamin deficiency. *Medicine*. 1991 Jul;70(4):229-45.

[45] Cuskelly GJ, Mooney KM, Young IS. Folate and vitamin B12: friendly or enemy nutrients for the elderly. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2007 Nov;66(4):548-58.

[46] Devlin AM, Ling EH, Peerson JM, Fernando S, Clarke R, Smith AD, et al. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of

serum folate and hyperhomocysteinemia. *Human molecular genetics*. 2000 Nov 22;9(19):2837-44.

[47] Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Molecular genetics and metabolism*. 2000 Aug;70(4):310-5.

[48] Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Mar;83(3):708-13.

[49] Vargas-Martinez C, Ordovas JM, Wilson PW, Selhub J. The glutamate carboxypeptidase gene II (C>T) polymorphism does not affect folate status in the Framingham Offspring cohort. *The Journal of nutrition*. 2002 Jun;132(6):1176-9.

[50] Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H, Baker MW, Neri E, Finnell RH. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *American journal of medical genetics*. 2002 Feb 15;108(1):1-6.

[51] Lopreato FR, Stabler SP, Carvalho FR, Hirata RD, Hirata MH, Robi DL, et al. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008 Dec;398(1-2):134-9.

[52] Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*. 1995 May;10(1):111-3.

[53] Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998 Dec 8;98(23):2520-6.

[54] D'Angelo A, Coppola A, Madonna P, Fermo I, Pagano A, Mazzola G, et al. The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombotic events. *Thrombosis and haemostasis*. 2000 Apr;83(4):563-70.

[55] Zago MC, Falcão RP, Pasquini R. *Tratado de Hematologia*. Editora Atheneu: São Paulo. 2013.

[56] Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *The New England journal of medicine*. 2005 Apr 28;352(17):1741-4.

[57] Fleming RE. Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. *Current opinion in gastroenterology*. 2005 Mar;21(2):201-6.

[58] Grotto HZW. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(5):309-97.

[59] Anemia carencial ferropriva. Departamento Científico de Nutrologia da Sociedade Brasileira de Pediatria, 2007.

[60] Cotran RS, Kumar, V., Robbins, S.L. *Pathologic Basis of Disease*: Philadelphia 1994.

[61] Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. *Blood reviews*. 2009 May;23(3):95-104.

[62] Liu K, Kaffes AJ. Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and management. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2012 Feb;24(2):109-16.

[63] McLean E, Cogswell M, Egli I, Wojdyla D, de Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia, WHO Vitamin and Mineral Nutrition Information System, 1993-2005. *Public health nutrition*. 2009 Apr;12(4):444-54.

[64] Miller JL. Iron deficiency anemia: a common and curable disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013 Jul;3(7).

[65] WHO. Hemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. *Vitamin and Mineral Nutrition Information System*. Geneva, World Health Organization, 2011.

[66] WHO. Serum ferritin concentrations for the assessment of iron status and iron deficiency in populations. *Vitamin and Mineral Nutrition Information System*. Geneva, World Health Organization, 2011.

[67] Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clinical chemistry*. 1999 Feb;45(2):290-2.

[68] Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B12 or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. *Food and nutrition bulletin*. 2008 Jun;29(2 Suppl):S74-85.

[69] Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, Nexo E, Bates C, Fletcher A, et al. Vitamin B12 and folate deficiency in later life. *Age and ageing*. 2004 Jan;33(1):34-41.

[70] Lindenbaum J, Allen LH. *Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency. Folate in health and disease*: New York 1995.

[71] Clarke R, Refsum H, Birks J, Evans JG, Johnston C, Sherliker P, et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *The American journal of clinical nutrition*. 2003 May;77(5):1241-7.

[72] Coussirat C. Prevalência de deficiência de vitamina B12 e ácido fólico e sua associação com anemia em idosos atendidos em um Hospital Universitário. [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010.

[73] Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *The American journal of clinical nutrition*. 1994 Jul;60(1):2-11.

[74] Nurk E, Tell GS, Vollset SE, Nygard O, Refsum H, Nilsen RM, et al. Changes in lifestyle and plasma total homocysteine: the Hordaland Homocysteine Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 May;79(5):812-9.

[75] Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *The American journal of psychiatry*. 2002 Dec;159(12):2099-101.

[76] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 2002 Feb 14;346(7):476-83.

[77] Hin H, Clarke R, Sherliker P, Atoyebi W, Emmens K, Birks J, et al. Clinical relevance of low serum vitamin B12 concentrations in older people: the Banbury B12 study. *Age and ageing*. 2006 Jul;35(4):416-22.

[78] Villamor E, Mora-Plazas M, Forero Y, Lopez-Arana S, Baylin A. Vitamin B-12 status is associated with socioeconomic level and adherence to an animal food dietary pattern in Colombian school children. *The Journal of nutrition*. 2008 Jul;138(7):1391-8.

[79] Pasricha SR, Shet AS, Black JF, Sudarshan H, Prashanth NS, Biggs BA. Vitamin B-12, folate, iron, and vitamin A concentrations in rural Indian children are associated with continued breastfeeding, complementary diet, and maternal nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 2011 Nov;94(5):1358-70.

[80] Garcia MT, Granado FS, Cardoso MA. [Complementary feeding and nutritional status of 6-24-month-old children in Acrelandia, Acre State, Western Brazilian Amazon]. *Cad Saude Publica*. 2011 Feb;27(2):305-16.

[81] Shakur YA, Garriguet D, Corey P, O'Connor DL. Folic acid fortification above mandated levels results in a low prevalence of folate inadequacy among Canadians. *The American journal of clinical nutrition*. 2010 Oct;92(4):818-25.

[82] Lamers Y. Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. *Annals of nutrition & metabolism*. 2011;59(1):32-7.

[83] Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *The New England journal of medicine*. 1999 Nov 11;341(20):1509-19.

[84] van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ. 2001 Apr;226(4):243-70.

[85] Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *Jama*. 2001 Jun 20;285(23):2981-6.

[86] Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss S, Wyatt PR, Cole DE. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *Lancet*. 2002 Dec 21-28;360(9350):2047-8.

[87] Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra Mda G, Nazer-Herrera J. Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet A*. 2003 Dec 1;123A(2):123-8.

[88] Garcia-Casal MN, Osorio C, Landaeta M, Leets I, Matus P, Fazzino F, et al. High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *European journal of clinical nutrition*. 2005 Sep;59(9):1064-70.

[89] Ray JG, Goodman J, O'Mahoney PR, Mamdani MM, Jiang D. High rate of maternal vitamin B12 deficiency nearly a decade after Canadian folic acid flour fortification. *Qjm*. 2008 Jun;101(6):475-7.

- [90] Molloy AM, Kirke PN, Troendle JF, Burke H, Sutton M, Brody LC, et al. Maternal vitamin B12 status and risk of neural tube defects in a population with high neural tube defect prevalence and no folic Acid fortification. *Pediatrics*. 2009 Mar;123(3):917-23.
- [91] Yang Q, Botto LD, Erickson JD, Berry RJ, Sambell C, Johansen H, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002. *Circulation*. 2006 Mar 14;113(10):1335-43.
- [92] Bazzano LA, Reynolds K, Holder KN, He J. Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama*. 2006 Dec 13;296(22):2720-6.
- [93] Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality: Meta-analysis of 8 randomized trials involving 37 485 individuals. *Archives of internal medicine*. 2010 Oct 11;170(18):1622-31.
- [94] Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *Jama*. 1993 Dec 8;270(22):2693-8.
- [95] Alessio AC, Annichino-Bizzacchi JM, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Hoehr NF. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Genet A*. 2004 Jul 30;128A(3):256-60.
- [96] Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1992 Jun;30(6):377-9.
- [97] Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1999 Mar;180(3 Pt 1):660-4.
- [98] Ubbink JB. Is an elevated circulating maternal homocysteine concentration a risk factor for neural tube defects? *Nutrition reviews*. 1995 Jun;53(6):173-5.
- [99] Zhang T, Xin R, Gu X, Wang F, Pei L, Lin L, et al. Maternal serum vitamin B12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public health nutrition*. 2009 May;12(5):680-6.
- [100] Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta*. 1999 Sep;20(7):519-29.

- [101] Daly S, Cotter A, Molloy AE, Scott J. Homocysteine and folic acid: implications for pregnancy. *Seminars in vascular medicine*. 2005 May;5(2):190-200.
- [102] Mignini LE, Latthe PM, Villar J, Kilby MD, Carroli G, Khan KS. Mapping the theories of preeclampsia: the role of homocysteine. *Obstetrics and gynecology*. 2005 Feb;105(2):411-25.
- [103] Ramlau-Hansen CH, Moller UK, Moller J, Thulstrup AM. [Lactation--a risk factor for elevated plasma homocysteine?]. *Ugeskrift for laeger*. 2003 Jul 7;165(28):2819-23.
- [104] Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *American journal of medical genetics*. 1999 May 21;84(2):151-7.
- [105] Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *American journal of human genetics*. 1988 Oct;43(4):414-21.
- [106] Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 1996 Jan 1;93(1):7-9.
- [107] Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki JP, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *The American journal of clinical nutrition*. 2006 Mar;83(3):701-7.
- [108] Yang QH, Botto LD, Gallagher M, Friedman JM, Sanders CL, Koontz D, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *The American journal of clinical nutrition*. 2008 Jul;88(1):232-46.
- [109] Winkelmayr WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney international*. 2003 Jun;63(6):2280-5.

[110] Yates Z, Lucock M. G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. *Life sciences*. 2005 Oct 14;77(22):2735-42.

[111] Administrative Committee on Coordination, Nutrition. Subcommittee on Nutrition. Fourth report on the world nutrition situation. Geneva, Switzerland ACC/SCN. 2000.

[112] WHO. The world Health report: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2002.

[113] Fleming DJ, Jacques PF, Tucker KL, Massaro JM, D'Agostino RB Sr, Wilson PW, WoodRJ. Iron status of the free-living, elderly Framingham Heart Study cohort: an iron replete population with a high prevalence of elevated iron stores. *Am J Clin Nutr*. 2001 Mar;73(3):638-46.

[114] Ershler WB, Sheng S, McKelvey J, Artz AS, Denduluri N, Tecson J, et al. Serum erythropoietin and aging: a longitudinal analysis. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005 Aug;53(8):1360-5.

[115] Smith DL. Anemia in the elderly. *American family physician*. 2000 Oct 1;62(7):1565-72.

[116] Penninx BW, Pahor M, Cesari M, Corsi AM, Woodman RC, Bandinelli S, et al. Anemia is associated with disability and decreased physical performance and muscle strength in the elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2004 May;52(5):719-24.

[117] Penninx BW, Guralnik JM, Onder G, Ferrucci L, Wallace RB, Pahor M. Anemia and decline in physical performance among older persons. *The American journal of medicine*. 2003 Aug 1;115(2):104-10.

[118] Penninx BW, Pluijm SM, Lips P, Woodman R, Miedema K, Guralnik JM, et al. Late-life anemia is associated with increased risk of recurrent falls. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2005 Dec;53(12):2106-11.

[119] Chaves PH, Semba RD, Leng SX, Woodman RC, Ferrucci L, Guralnik JM, et al. Impact of anemia and cardiovascular disease on frailty status of community-dwelling older women: the Women's Health and Aging Studies I and II. *The journals of gerontology*. 2005 Jun;60(6):729-35.

[120] Chaves PH, Carlson MC, Ferrucci L, Guralnik JM, Semba R, Fried LP. Association between mild anemia and executive function impairment in community-

dwelling older women: The Women's Health and Aging Study II. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2006 Sep;54(9):1429-35.

[121] Denny SD, Kuchibhatla MN, Cohen HJ. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. *The American journal of medicine*. 2006 Apr;119(4):327-34.

[122] Guralnik JM, Eisenstaedt RS, Ferrucci L, Klein HG, Woodman RC. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2263-8.

[123] Rimon E, Levy S, Sapir A, Gelzer G, Peled R, Ergas D, et al. Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly by transferrin receptor-ferritin index. *Archives of internal medicine*. 2002 Feb 25;162(4):445-9.

[124] DeMayer EM. Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care: a guide for health administrators and programme managers. Geneva, World Health Organization. 1989.

[125] Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *The New England journal of medicine*. 1991 Sep 5;325(10):687-94.

[126] Huang SC, Yang YJ, Cheng CN, Chen JS, Lin CH. The etiology and treatment outcome of iron deficiency and iron deficiency anemia in children. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2010 May;32(4):282-5.

[127] National Center of Health Statistics. Plan and Operation of the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 1994.

[128] Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *Jama*. 1997 Mar 26;277(12):973-6.

[129] Bogen DL, Duggan AK, Dover GJ, Wilson MH. Screening for iron deficiency anemia by dietary history in a high-risk population. *Pediatrics*. 2000 Jun;105(6):1254-9.

[130] Third report on nutrition monitoring in the US. MD: Federation of American Societies for Experimental Biology, Life Sciences Research Office. 1995.

[131] Assunção MC, Santos IS, Barros AJ, Gigante DP, Victora CG. Flour fortification with iron has no impact on anaemia in urban Brazilian children. *Public health nutrition*. 2012 Oct;15(10):1796-801.

- [132] Bortolini GA, Vitolo MR. Relação entre deficiência de ferro e anemia em crianças de até 4 anos de idade. *J Pediatr*. 2010;86(6):488-92.
- [133] Milman N. Prepartum anaemia: prevention and treatment. *Annals of hematology*. 2008 Dec;87(12):949-59.
- [134] Fujimori E, Sato AP, Szarfarc SC, Veiga GV, Oliveira VA, Colli C, et al. Anemia in Brazilian pregnant women before and after flour fortification with iron. *Revista de saude publica*. 2011 Dec;45(6):1027-35.
- [135] da Silva CL, Saunders C, Szarfarc SC, Fujimori E, da Veiga GV. Anaemia in pregnant women before and after the mandatory fortification of wheat and corn flours with iron. *Public health nutrition*. 2012 Oct;15(10):1802-9.
- [136] Sato APS, Fujimori E, Szarfarc SC. Prevalência de anemia em gestantes e a fortificação de farinhas com ferro. *Enferm*. 2008;17:474-81.
- [137] Cruz RD. Avaliação da deficiência de ferro durante o processo gestacional e sua relação com o consumo alimentar e a suplementação com ferro. [Dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2009.
- [138] Milman N. Iron and pregnancy--a delicate balance. *Annals of hematology*. 2006 Sep;85(9):559-65.
- [139] Sloan NL, Jordan E, Winikoff B. Effects of iron supplementation on maternal hematologic status in pregnancy. *American journal of public health*. 2002 Feb;92(2):288-93.
- [140] Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early human development*. 1997 Oct 29;49 Suppl:S7-28.
- [141] Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc National Academy of Sciences Institute of Medicine Food and Nutrition Board. 2001.
- [142] Shashiraj, Faridi MM, Singh O, Rusia U. Mother's iron status, breastmilk iron and lactoferrin--are they related? *European journal of clinical nutrition*. 2006 Jul;60(7):903-8.
- [143] Takimoto H, Yoshiike N, Katagiri A, Ishida H, Abe S. Nutritional status of pregnant and lactating women in Japan: a comparison with non-pregnant/non-lactating controls in the National Nutrition Survey. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2003 Apr;29(2):96-103.

[144] Stuetz W, Carrara VI, McGready R, Lee SJ, Erhardt JG, Breuer J, et al. Micronutrient status in lactating mothers before and after introduction of fortified flour: cross-sectional surveys in Maela refugee camp. *European journal of nutrition*. 2012 Jun;51(4):425-34.



9. ANEXO

Anexo 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/11/13.
(Grupo III)

2ª VIA

PARECER PROJETO: N° 057/2006 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0036.0.146.000-06

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PREVALÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE ÁCIDO FÓLICO E VITAMINA B12 EM DIVERSOS GRUPOS DA POPULAÇÃO BRASILEIRA, APÓS O PROGRAMA DE FORTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO ADOTADO PELA ANVISA”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

INSTITUIÇÃO: HEMOCENTRO/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/02/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/03/07 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar se o programa de fortificação adotado pela ANVISA é eficiente; determinar a prevalência de anemia ferropriva e das deficiências de ácido fólico e vitamina B12 após a implantação do programa; verificar a associação de anemia ferropriva com as deficiências de ácido fólico e vitamina B12; monitorar a situação nutricional e alimentar da população estudada; determinar a prevalência dos polimorfismos A80G no gene da RFC1 e C1561T no gene da GCP2 na população brasileira e a relação desses polimorfismos com as concentrações de folato e de vitamina B12.

III - SUMÁRIO

Serão avaliados 1000 indivíduos separados em 4 grupos de 250 participantes nos principais grupos de risco para deficiência de folato e vitamina B12: idosos, gestantes, nutrizes e lactante; além do estudo dos polimorfismos citados nos objetivos e da associação de anemia ferropriva. Os participantes serão indivíduos saudáveis atendidos no Centro de Saúde de Barão Geraldo e São Quirino em Campinas. Será realizada uma coleta de sangue e aplicado um questionário.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O grupo de pesquisadores alertou a ANVISA em um trabalho posterior sobre a importância da suplementação de folato e vitamina B12, e este estudo é de extrema importância para avaliar o impacto do programa instituído por este órgão. Além disso, pelo estudo de polimorfismos permitirá conhecer a especificidade de alguns subgrupos populacionais, com necessidades diferentes e até contra-indicação para o excesso de folato.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3788-8936
FAX (019) 3788-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

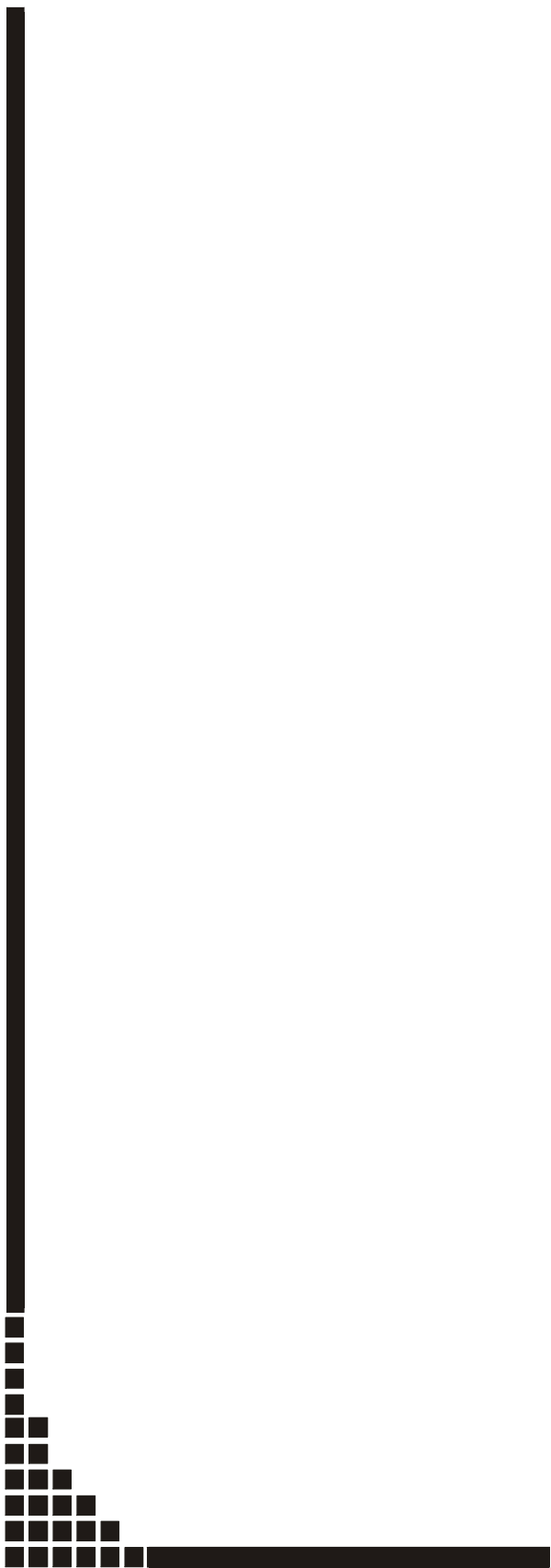
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de março de 2006.


Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



10. APÊNDICE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: Prevalência da deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ em diversos grupos da população brasileira, após o programa de fortificação de ácido fólico adotado pela ANVISA

Pesquisadores: Profa Dra Joyce Maria Annichino-Bizzacchi
Profa Dra Nelci Fenalti Höehr

Eu, _____, idade: _____
RG: _____, residente à Rua/Av.: _____

Concordo em participar do presente estudo, após estar absolutamente esclarecido(a) dos propósitos do mesmo.

Responsável pelo sujeito da pesquisa: _____
idade: _____, RG: _____, grau de parentesco:
_____ Residente à Rua/Av.: _____

Trata-se de uma pesquisa que tem como objetivo determinar a prevalência da deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ assim como da anemia ferropriva em diversos grupos da população brasileira, após a prática de Saúde Pública adotada pela ANVISA de fortificação de ácido fólico e ferro nas farinhas de trigo e de milho. Além disso, será determinada a prevalência dos polimorfismos A80G no gene da *RFC1* e C1561T no gene da *GCP2*.

Poderá haver benefícios imediatos para os sujeitos da pesquisa, visto que poderá ocorrer intervenções na conduta médica após a obtenção dos resultados dos exames laboratoriais.

Os procedimentos que o participante será submetido serão coleta de sangue e entrevista. Eventualmente, o senhor (a) poderá ser reconvocato a comparecer ao Centro

de Saúde, para nova coleta de material, com a finalidade de confirmar os resultados do exame. Os riscos a que o voluntário estará sujeito ao participar do estudo são hematoma (mancha roxa) e/ou pequena dor no local da punção venosa. Este estudo não oferecerá ao participante outros riscos importantes.

Outras informações:

1. Haverá reembolso de gastos com transporte, em consequência de convocação para comparecimento ao Centro de Saúde, exclusivamente para a pesquisa.
2. O participante estará livre para desistir do estudo a qualquer tempo, mesmo que inicialmente tenha concordado em fazê-lo.
3. O participante 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.
5. A sua discordância em participar do estudo não lhe acarretará nenhum prejuízo em qualquer outro tratamento ou procedimento que possa necessitar futuramente neste Centro de Saúde.
6. O material colhido neste estudo será utilizado somente para os objetivos propostos e gostaríamos de saber se o senhor (a) concorda que este material possa ser armazenado.
7. Caso seja realizado um outro estudo com este material, o senhor (a) será devidamente informado e questionado se concorda na participação de um outro estudo. Este novo estudo deverá ser novamente submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Quaisquer outras dúvidas de sua parte poderão ser dirigidas ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM-UNICAMP (FONE: 3521 8936)

Campinas ____ / ____ / _____

Assinatura do participante

Profa Dra Joyce M. Annichino-Bizzacchi

Tel.: (19) 3521 8755

Profa Dra Nelci Fenalti Höehr

Tel.: (19) 3521 9455

Questionário

Data da entrevista: _____ HC: _____

Nome: _____

Idade: _____ Data de Nascimento: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Peso: _____ Altura: _____ Estado civil: _____

Cor: _____ Descendentes até 3ª geração: _____

Escolaridade: _____ Quantas pessoas na família: _____

Faz suplementação vitamínica (dose e quanto tempo): _____

Tem doença de tireóide (qual tratamento): _____

Tem problema de estômago (qual tratamento): _____

Tem problema de coração (qual tratamento): _____

Problema de circulação:

Venosa (varizes, trombose venosa) _____

Arterial (problema para andar) _____

(qual tratamento) _____

Tem problema de rim (qual tratamento), urina todo dia: _____

Tem pressão alta: _____ Tem diabetes: _____

Tem dislipidemia (colesterol alto): _____

Tabagismo:

() Nunca fumou

() Fumante (quantos cigarros por dia) _____

() Ex-fumante (quantos cigarros fumava por dia e parou a quanto tempo) _____

Faz uso de algum medicamento: _____ (qual) _____

Faz uso de metotrexate, trimetropina, fenitoína ou outros medicamentos anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos (critério de exclusão): _____

Tem alguma doença e se faz tratamento: _____

Folate, vitamin B-12 and homocysteine status in the post folic acid fortification era in Brazil: a population-based study¹⁻³

Aline Barnabé¹, Ana Cláudia Aléssio², Luis Fernando Bittar², Bruna de Moraes Mazetto², Angélica M. Bicudo Zeferino³, Erich V. de Paula¹, Joyce M. Annichino-Bizzacchi², Nelci Fenalti Höehr¹

¹Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil; ²Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas, Brazil; ³Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

Conflict of interest: None of authors had a conflict of interest.

Source of funding: This study was supported by grant from National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), project n° 402257/2005-7. The funder had no role in the design, analysis and writing this article.

Authorship: The authors' responsibilities were as follows – AB: responsible for laboratory analysis, statistical analysis, interpretation of results and writing the manuscript; ACA: responsible for study design and conducting research; LFB: contributed to subject recruitment and collection data; BMM: responsible for polymorphisms analysis; AMBZ, NFH: responsible for study supervision; EVP, JMAB: responsible for interpretation of results and critically reviewed the manuscript; and all authors: read and approved the final manuscript.

Ethics statement: The study was approved by the Ethics Committee of Faculty of Medical Science.

Hemocentro, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brazil, Rua Carlos Chagas, 480, 13083-878.

Email: abarnabe@fcm.unicamp.br

Keywords: folate, vitamin B12, homocysteine, reduced folate carrier, glutamate carboxypeptidase II, methylenetetrahydrofolate reductase

ABSTRACT

Objective: The aims of this study were to assess folate and vitamin B-12 status and the frequency of elevated levels of Hcy in distinct Brazilian populations including elderly, children, pregnant and lactating women, after the initiation of folic acid fortification by Brazilian authorities. We also investigated the effects of RFC1 80G>A, GCPII 1561C>T and MTHFR 677C>T polymorphisms on folate, vitamin B-12 and Hcy levels in these individuals.

Design: Folate, vitamin B-12 and levels were measured by chemiluminescence immunoassays, and Hcy levels were determined by high-performance liquid chromatography. Genotype analyses of RFC1 A80G, GCPII C1561T and MTHFR C677T polymorphisms were performed by PCR-RFLP.

Setting: The individuals were recruited from primary care centers in Campinas – Brazil, between 2006 - 2007.

Subjects: In total 719 individuals, including elderly (262), children (106), pregnant women (291) and lactating women (60) were recruited.

Results: The overall prevalence of low folate and vitamin B-12 status was 0.3% and 5.3%, respectively. Low folate status was observed only in elderly and pregnant women, whereas vitamin B-12 deficiency was more frequent in pregnant women. Plasma Hcy concentrations was significantly higher in the elderly. Pregnant women carrying the MTHFR 677T allele (CT+TT) showed lower serum folate levels ($p=0.030$), but none of the polymorphisms investigated in this study affected folate, vitamin B-12 and Hcy levels in elderly, children and lactating women. After a multivariate analysis, Hcy levels were predicted by variables such as folate, vitamin B-12, gender and age, according to the subgroup studied.

Conclusion: Our results suggest that low folate status is practically inexistent in the post folic acid fortification era in Brazil. However, screening for vitamin B-12 deficiency may be particularly relevant in our population.

INTRODUCTION

Folate and vitamin B-12 are essential nutrients, and their deficiencies represent public health problems worldwide, affecting all age groups and leading to complications such as anemia, birth defects and neurological disorders (1, 2). Low concentrations of folate and vitamin B-12 are also associated with high homocysteine (Hcy) levels, considered a risk factor of cardiovascular disease, cognitive decline and adverse pregnancy outcomes (2-4).

Folate deficiency can be caused by inadequate dietary intake, medications (methotrexate and anticonvulsants), alcoholism and conditions associated with increased cell turnover. In addition, a few genetic polymorphisms have been shown to influence folate levels. On the other hand, vitamin B-12 deficiency results mainly from gastrointestinal conditions leading to vitamin B-12 malabsorption, and less frequently from intestinal parasitosis and genetic polymorphisms (5). Genetic polymorphisms such as reduced folate carrier (RFC1) 80G>A and glutamate carboxypeptidase II (GCPII) 1561C>T have also been shown to impair folate transport and absorption, respectively, thus affecting the bioavailability of the dietary folate (6, 7). The methylenetetrahydrofolate reductase MTHFR 677C>T polymorphism is associated with elevated Hcy levels and reduced folate and vitamin B-12 levels (8, 9).

Fortification of white flour with folic acid is mandatory in several countries and has shown to be a successful public health intervention. Although the major purpose of folic acid fortification is to reduce the occurrence of neural tube defects in pregnancy, an additional potential benefit is a potential protection against chronic diseases, through its association with lower Hcy levels (10, 11). In Brazil, this strategy has been applied since 2004 by the National Health Surveillance Agency, ANVISA (12). These measures are based on the importance of providing an adequate intake of folate mainly to vulnerable populations such as pregnant and lactating women, children and the elderly (13, 14).

In this context, the aims of this study were: (1) to assess folate and vitamin B-12 status, as well as the frequency of elevated Hcy levels among children, elderly, and pregnant and lactating women in the post folic acid fortification era; and (2) to investigate the

effect of RFC1 A80G, GCPII C1561T and MTHFR C677 polymorphisms on folate, vitamin B-12 and Hcy levels in the same study groups.

METHODS

Study population

Our study population consisted of 719 individuals enrolled between April 2006 and May 2007, divided into the following subgroups: 262 elderly individuals (aged 60–91 years-old), 106 children (aged 0.5 – 6 years), 291 pregnant women (aged 14 – 43 years) and 60 lactating women (aged 14 – 40 years). All individuals were recruited from primary care centers in Campinas, Brazil. We excluded individuals who had hypothyroidism, renal and hepatic disease, and those using agents that affect B vitamin metabolism such as methotrexate and anticonvulsants. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institution Review Board from University of Campinas. A written informed consent was obtained from all individuals prior to any study procedure.

Blood collection

Blood samples were collected from all participants after 12h overnight fast in tubes without anticoagulant for measurement of folate and vitamin B-12, and tubes containing EDTA to measure Hcy and for the genetic analyses (RFC1 A80G, GCPII C1561T and MTHFR C677T). Serum and plasma samples were processed within 3 h after the collection and stored below -80°C until the analyses.

Laboratory assays

Serum levels of folate and vitamin B-12 were determined using chemiluminescence immunoassays (Elecsys/Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Hcy in plasma was

assessed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (15). Genomic DNA was isolated from whole blood by standard methods. The analyses of RFC1 80G>A, GCPII 1561C>T and MTHFR 677C>T polymorphisms were accomplished by PCR-RFLP. The amplified fragments were digested by restriction enzymes (Hinfl, Hhal and Accl, respectively), as previously described (6, 16, 17). We separated folate, vitamin B-12 and Hcy levels in categories, based on the reference values used in our service. For folate levels, categories were: <4 ng/ml, 4 – 8 ng/ml, >8 ng/ml; for vitamin B-12: <200 pg/ml, 200 – 300 pg/ml, 300 – 400 pg/ml, >400 pg/ml; and for Hcy levels, these categories were: <10 µmol/l, 10 – 15 µmol/l, >15 µmol/l. Individuals with levels of folate below 4 ng/ml and vitamin B-12 below 200 pg/ml were categorized as low status. Vitamin B-12 levels between 200 – 300 pg/mL were considered as marginal status (5, 14). Levels of Hcy above 15 µmol/l were considered elevated (18). Of note, the reference values used to describe low status of folate and vitamin B-12 are similar those cited by WHO (19).

Statistical analysis

Data are expressed as means ± SD, median, minimum, maximum, number and percentages. Medians were compared using the Mann-Whitney test for 2-group comparisons. Hardy-Weinberg equilibrium test was performed for all genotypes using chi-square test. Stepwise linear regression analyses were performed for Hcy as the dependent variable and folate, vitamin B-12, polymorphisms, age, gender, body mass index, hypertension, diabetes, smoking as the independent variables. Statistical tests were performed using SPSS software with the level of significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

In total, 719 individuals were included in our study. The demographic characteristics of the study population are summarized in table 1.

Folate, vitamin B-12 and homocysteine levels

For all individuals included in this study, the overall mean \pm SD of folate, vitamin B-12 and Hcy levels were 11.41 \pm 3.78, 505.54 \pm 307.13 and 10.25 \pm 9.07, respectively. Among the distinct study groups, children had higher folate and vitamin B-12, whereas elderly had higher Hcy levels (table 2). Folate and vitamin B-12 levels were not performed in 9 individuals, and Hcy levels were not measured in 1 individual.

The overall prevalence of low folate and vitamin B-12 status was estimated to be 0.3% and 5.3% respectively (table 3). Interestingly, we did not observe low folate or B₁₂ levels in children included in our study, and only 1% presented marginal vitamin B-12 levels. Low folate status could be identified in 0.4% of elderly and 0.3% of pregnant women. Levels of folate between 4 – 8 ng/mL were more prevalent in lactating women (27.2%). Pregnant women were the group who presented a higher frequency of low vitamin B-12 status (8.9%), followed by the elderly (4.2%) and lactating women (1.8%). Marginal status of vitamin B-12 was observed in 14.1% of elderly, 32.7% of pregnant women and 7.5% of lactating women. The prevalence of elevated Hcy levels was observed mainly in elderly (34.3%). Among pregnant and lactating women, the prevalence of elevated Hcy levels was 0.7 and 5.0%, respectively.

Frequencies and effects of polymorphisms RFC1 80G>A, GCPII 1561C>T and MTHFR 677C>T in the study population

Table 4 summarizes the frequencies of genotypes for each polymorphism studied.

Genotype distributions of RFC1 80A>G, GCPII 1561C>T and MTHFR 677C>T were in

Hardy-Weinberg equilibrium. The RFC1 80A>G, GCPII 1561C>T and MTHFR 677C>T polymorphisms were not performed in 11, 56 and 30 individuals, respectively.

We compared the medians of folate, vitamin B-12 and Hcy levels according to these polymorphisms (table 5). Folate, vitamin B-12 and Hcy concentrations were not affected by the RFC1 80G>A, GCPII 1561C>T and MTHFR 677C>T polymorphisms in elderly, children and lactating women. Homozygosity for the GCPII 1561C>T polymorphism was not found in our population. Pregnant women carrying the MTHFR 677T allele (CT+TT genotypes) showed lower serum folate levels ($p=0.030$), but vitamin B-12 and Hcy levels were not affected by this polymorphism. A possible effect of the RFC1 80G>A polymorphism on Hcy levels was observed in pregnant women. However, no correlation with levels of folate and vitamin B-12 were found for this polymorphism.

Impact of clinical and laboratory parameters on Hcy levels

We next evaluated the impact of clinical and laboratorial parameters in Hcy levels (table 6). Using a multiple linear regression analysis with stepwise criteria, variables that were independently associated with Hcy levels were: folate, vitamin B-12, gender, age and the polymorphism RFC1 80A>G (genotype AA) in elderly; vitamin B-12 in children; and folate in pregnant women. None of the variables evaluated showed any impact on Hcy levels in lactating women.

DISCUSSION

In this study, we present data about folate, vitamin B-12 and Hcy levels, as well as polymorphisms potentially affecting these levels, in different groups of populations from Brazil in the post folic acid fortification era.

We demonstrated adequate folate in all studied population, with only 0.3% showing low status of this vitamin. A previous study performed by Xavier *et al.* (21) showed vitamin B-12 deficiency among Brazilian adults reaching over 6%. Similarly, the reported prevalence of a Canadian population of vitamin B-12 deficiency is approximately 5%, whereas folate deficiency is practically nonexistent (11). Our results corroborate these findings, as 5.3% of individuals in our study showed low vitamin B-12 status. In developed countries, folate deficiency is uncommon, but in some developing countries this deficiency can be still observed (22). In addition, it is important to note that the prevalence of folate and vitamin B-12 deficiencies is different between studies due to assay differences employed (13).

As described previously, folate deficiency may occur at all ages, mostly in individuals ingesting a poor diet or suffering from intestinal malabsorption (23). In addition, vitamin B-12 stores frequently decreases with age because of malabsorption of vitamin B-12 from food, which is more common in the elderly (11). It is estimated that about 10% of elderly present reduced levels of vitamin B-12, with this prevalence increasing from around 5% at age 65 years to 20% at age 85 years (13, 18). In our study, we identified 4.2% of elderly with low status of vitamin B-12 and about 14% showed marginal status. In contrast, low folate status was practically inexistent. Furthermore, our study showed a prevalence of 34.3% of elevated Hcy levels. The Framingham study showed a prevalence of vitamin B-12 deficiency of 12% among elderly (24), and according to Nurk *et al.* (25), Hcy concentration also increases with the age. Moreover, clinical manifestations, including, depression, dementia and cognitive impairment have been associated with folate and vitamin B-12 deficiencies in these individuals (26-28). These

data highlight the importance of assessing folate, vitamin B-12, and Hcy levels in population-based studies that include older individuals.

Children aged 0.5 – 6 years included in our study did not exhibit low folate and vitamin B-12 status. In addition, Hcy levels were within the normal, corroborating our previous data (29). A study performed in Mexican children younger than 6 years showed a prevalence of 3.2% for folate deficiency and 7.7% for vitamin B-12 deficiency (30).

Shakur *et al.* (31) showed that since food fortification with folic acid, folate deficiency has been reduced to practically 0% in children aged 1 – 14 years. These results suggest that there is apparently no additional advantage of supplementation with folic acid in countries where food products are folic acid-fortified (14).

During pregnancy, folate and vitamin B-12 are essential for normal fetal development. In addition, pregnant women have an increased physiological need of these nutrients, and their inadequate intake increases the risk of developmental abnormalities, including neural tube defects (32, 33). The results of the present study showed that mean of folate (11.0 ng/mL) and vitamin B-12 (258.0 pg/mL) in pregnant women were higher than those reported by Guerra-Shinohara *et al.* (6.0 ng/mL and 154.0 pg/mL, respectively) (34), and low folate status was practically inexistent in this subgroup. However, we observed a high prevalence of low vitamin B-12 status in pregnant women of 8.9% and a marginal status was found in 32.7%. Vitamin B-12 decreases significantly through gestation, as observed in previous studies, most likely due to an increase in fetal requirements for the vitamin (34-36). In Venezuelans pregnant women the prevalence of folate and vitamin B-12 deficiencies reached 36.3 and 61.3%, respectively (37). Ray *et al.* (38) suggest that 1 in 20 Canadian pregnant women may be vitamin B-12 deficient in

the critical period of closing of the embryonic neural tube. Increased risk of neural tube defect has also been associated with vitamin B-12 deficiency (39, 40).

In our study, the prevalence of high of Hcy levels was relatively low in pregnant women. In previous studies, elevated Hcy levels were observed in mothers of neonates with neural tube defects (41, 42). Plasma Hcy levels in pregnant women usually are lower than nonpregnant women (43, 44). In addition, several studies have associated high Hcy levels with a variety of adverse outcomes in pregnancy, including abruption placentae, intrauterine growth restriction, recurrent pregnancy loss, spontaneous abortion, and preeclampsia (45-47). However, we do not have data on the outcome of these pregnancies.

In lactating women, a higher folate intake is required. Folate concentration in human milk is strongly regulated and not affected by the maternal folate status, except in clinically folate-deficient mothers (14). Maternal vitamin B-12 levels have been also correlated with milk vitamin B-12, and infant urinary methylmalonic acid levels, inversely related to milk vitamin B-12 levels. However, in breast-fed infants the deficiency may become clear because of the low milk concentration of vitamin B-12 (48, 49). In this study, we did not observe low folate status in lactating women, but 1.8% showed low vitamin B-12 status. Moreover, 5% of lactating women showed elevated levels of Hcy. Ramlau-Hansen *et al.* (50) demonstrated that breastfeeding mothers who did not take folic acid supplements had a higher prevalence of elevated Hcy compared to breastfeeding mothers taking folic acid supplements and to a control population.

In our study, the frequencies of MTHFR and RCF1 genotypes were similar to those reported in others populations (17, 51, 52), whereas genotype frequencies of the GCPII

1561C>T polymorphism were different from those described in other studies (6, 7). Among these polymorphisms, only the MTHFR 677C>T was significantly associated with low folate levels in pregnant women. It is well-known that folate status might play a crucial role in the development of hyperhomocysteinemia in individuals with this polymorphism (53, 54). Furthermore, Hcy levels tend to be independent of the genotype in populations having high T allele frequency ($\geq 20\%$) (55, 56).

Several studies have reported that the RFC1 80A>G polymorphism influences Hcy levels (52, 57, 58). In fact, we observed a trend toward elevated Hcy levels in pregnant women in our study. In an unselected population, subjects who were doubly homozygous GG for RFC1 polymorphism and TT for the MTHFR polymorphism had moderately elevated Hcy levels (17). Lopreato *et al.* (59) also observed in pregnant women that MTHFR 677TT and RFC1 80GG and AG combined genotypes were associated with reduced folate or increased Hcy levels. Regarding GCPII 1561C>T polymorphism, no association with folate, vitamin B-12 and Hcy levels was observed in our study group. According to Devlin *et al.* (6), carriers of the GCPII T allele had significantly lower serum folate levels and higher Hcy levels, but these findings were not confirmed in another study performed by the same author (52). In summary, the effects of polymorphisms on folate-metabolizing genes on Hcy levels may be confounded by the interaction with other polymorphisms or with environmental factors that influence folate status (52).

Finally, we were able to demonstrate that Hcy levels are influenced by folate, vitamin B-12, gender and age. Plasma Hcy may serve as an indicator of status and perhaps of the intake of vitamins such as folate, vitamin B-12 and vitamin B₆ (60). These results

corroborate with previous findings where acquired factors contribute more to hyperhomocysteinemia than genetic factors (29).

Some limitations of this study could be observed, such as: the small number of children and lactating women included; the lack of data about food-intake to correlate with folate and vitamin B-12 levels; and the lack of some blood sample to complete the analyses, mainly the polymorphisms investigation. Moreover, we not performed the measurements of red blood cell folate and methylmalonic acid. Despite, our study was the first to evaluate the frequency of folate and vitamin B-12 status in elderly, children, pregnant women and lactating women in post folic acid fortification era in Brazil.

In conclusion, our results suggest that low status of folate is practically inexistent in the subgroups evaluated in this study, in the post folic acid fortification era. However, our study also suggests that screening for vitamin B-12 deficiency may be particularly relevant in our population, and that the impact of the relatively high frequency of this deficiency in the overall health of our population deserves additional studies. In regard to the influence of genetic polymorphisms on levels of these nutrients, we did not observe any evidence that RFC1 80A>G and GCPII 1561C>T polymorphisms influence folate, vitamin B-12 and Hcy. Finally, we confirmed that folate and vitamin B-12 are important determinants of Hcy levels.

Table 1. Characteristics of the study population.

	Elderly (n=262)	Children (n=106)	Pregnant women (n=291)	Lactating women (n=60)
Age (y) ¹	68.8±6.5 (60 – 91)	2.9±1.6 (0.5 – 6)	26.5±6.8 (14 – 43)	26.3±6.2 (14 – 40)
Gender (male:female)	114:148	54:52	0:291	0:60
BMI (mean±SD)	26.8±4.5	16.7±3.9	27.7±6.1	24.5±4.4
Supplementation ²	43 (16.4)	22 (16.6)	138 (47.4)	10 (16.6)
Smoking [n (%)]	20 (7.6)	-	27 (9.3)	8 (13.3)
Hypertension [n (%)]	158 (60.3)	-	42 (14.4)	5 (8.3)
Diabetes [n (%)]	65 (24.8)	3 (2.8)	12 (4.1)	1 (1.6)
Dyslipidemia [n (%)]	65 (24.8)	-	2 (0.7)	-

¹ Values expressed as mean±SD and range in parentheses

²Users of multivitamins or folic acid supplements

Table 2. Folate, vitamin B12, and Hcy levels in different study groups¹.

Groups	Folate (ng/mL)	Vitamin B12 (pg/mL)	Hcy² (μ mol/L)
Elderly	11.3 \pm 3.5 n=262	523.7 \pm 319.0 n=262	15.9 \pm 12.8 n=262
Children	12.2 \pm 3.6 n=103	886.6 \pm 339.2 n=103	6.4 \pm 1.6 n=105
Pregnant women	11.4 \pm 4.1 n=291	351.1 \pm 132.7 n=291	6.6 \pm 1.9 n=291
Lactating women	9.9 \pm 2.9 n=54	522.5 \pm 166.7 n=54	9.6 \pm 2.9 n=60
TOTAL	11.4 \pm 3.7 n=710	505.5 \pm 307.1 n=710	10.2 \pm 9.1 n=718

¹All values are expressed as means \pm SD

²Hcy, homocysteine

Table 3. Folate, vitamin B-12 and Hcy status according to cut-off values.

	Cut-off values	All n, %	Elderly n, %	Children n, %	Pregnant women n, %	Lactating women n, %
Folate	< 4 ng/mL	2, 0.3	1, 0.4	-	1, 0.3	-
	4 - 8 ng/mL	137, 19.3	48, 18.3	13, 12.6	61, 21.0	15, 27.8
	8 - 20 ng/mL	571, 80.4	213, 81.3	90, 87.4	229, 78.7	39, 72.2
Vitamin B-12	< 200 pg/mL	38, 5.3	11, 4.2	-	26, 8.9	1, 1.8
	200 - 300 pg/mL	137, 19.3	37, 14.1	1, 1.0	95, 32.7	4, 7.5
	300 - 400 pg/mL	154, 21.7	64, 24.4	3, 2.9	81, 27.8	6, 11.1
	> 400 pg/mL	381, 53.7	150, 57.3	99, 96.1	89, 30.6	43, 79.6
Homocysteine	< 10 µmol/L	448, 63.1	34, 13.2	101, 98,1	274, 94.5	37, 61.7
	10 - 15 µmol/L	169, 23.8	135, 52.5	2, 1.9	14, 4.8	20, 33.3
	> 15 µmol/L	93, 13.1	88, 34.3	-	2, 0.7	3, 5.0

Table 4. Overall genotype frequencies of RFC1 80G>A, GPCII 1561C>T and MTHFR 677C>T polymorphisms.

Polymorphisms	Genotypes	Study groups	
		n	%
RFC1 80G>A ¹	AA	158	22.3
	AG	343	48.4
	GG	207	29.3
GPCII 1561C>T ²	CC	619	93.4
	CT	44	6.6
MTHFR 677C>T ³	CC	326	47.3
	CT	286	41.5
	TT	77	11.2

¹AA, wild type; AG, heterozygous; and GG homozygous mutant for the RFC1 80A>G polymorphism

²CC, wild type; and CT, heterozygous for the GPCII 1561C>T polymorphism

³CC, wild type; CT, heterozygous; and TT, homozygous mutant for the MTHFR 677C>T polymorphism

Table 5. Folate, vitamin B12 and homocysteine levels according to RFC1 A80G, GCPII C1561T and MTHFR C677T polymorphisms in elderly, children, pregnant women and lactating women¹.

GROUPS	RFC1 80G>A ³		p ²	GCPII 1651C>T ⁴		p ²	MTHFR 677C>T ⁵		p ²	
	AA	AG+GG		CC	CT		CC	CT+TT		
Folate (ng/mL)	Elderly	11.2 (5 – 20) n=49	11.2 (4 – 20) n=211	0.762	11.0 (4 – 20) n=241	12.2 (5 – 16) n=14	0.252	11.2 (4 – 20) n=103	11 (4 – 20) n= 154	0.976
	Children	12.55 (7 – 20) n= 20	12.0 (5 – 20) n= 80	0.737	12.0 (5 – 20) n=79	11.5 (6 – 19) n=6	0.932	12.0 (6 – 20) n= 51	12.8 (5 – 20) n= 43	0.516
	Pregnant women	9.8 (4 – 20) n= 74	10.9 (4 – 20) n= 212	0.224	10.8 (4 – 20) n=250	11.5 (5 – 19) n=21	0.927	11.2 (4 – 20) n= 139	9.7 (4 – 20) n= 139	0.030
	Lactating women	10.6 (5 – 14) n= 12	9.5 (4 – 16) n= 42	0.121	9.8 (4 – 16) n=49	12.6 (8 – 14) n=3	0.429	10.0 (5 – 16) n= 27	9.7 (4 – 15) n= 25	0.447
Vitamin B-12 (pg/mL)	Elderly	418.0 (114 – 2000) n=49	443.0 (129 – 2000) n=211	0.878	444.0 (114 – 2000) n=241	373.5 (222 – 819) n=14	0.317	463.0 (136 – 2000) n= 103	426.0 (114 – 2000) n= 154	0.335
	Children	827.0 (414 – 1434) n= 20	861.0 (221 – 1797) n= 80	0.799	901.0 (221 – 1797) n=79	772.5 (419 – 1248) n=6	0.359	790.0 (221 – 1797) n= 51	901.0 (317 – 1674) n= 43	0.428
	Pregnant women	341.5 (200 – 721) n= 74	323.5 (110 – 941) n= 212	0.092	322.0 (125 – 941) n=250	324.0 (110 – 538) n=21	0.738	321.0 (125 – 941) n= 139	330.0 (110 – 855) n= 139	0.550
	Lactating women	563.0 (271 – 763) n= 12	486.5 (188 – 1008) n= 42	0.204	488.0 (188 – 1008) n=49	627.0 (576 – 699) n=3	0.094	488.0 (299 – 1008) n= 27	517.0 (188 – 714) n= 25	0.527
Homocysteine (µmol/L)	Elderly	14.1 (7.8 – 79.0) n=49	13.2 (4.3 – 165.9) n=211	0.122	13.5 (4.3 – 165.9) n=241	13.3 (9.6 – 21.8) n=14	0.896	13.2 (4.3 – 27.1) n= 103	13.6 (7.1 – 165.9) n= 154	0.239
	Children	6.0 (4.8 – 9.7) n= 20	6.4 (3.65 – 12) n=80	0.500	6.2 (3.6 – 11.8) n=78	5.9 (4.8 – 9.5) n=6	0.876	6.2 (3.6 – 9.1) n= 51	6.0 (3.8 – 12.0) n= 43	0.956
	Pregnant women	5.9 (3.4 – 10.7) n= 74	6.4 (3.1 – 18.9) n= 212	0.052	6.4 (3.1 – 18.9) n=250	6.2 (4 – 8.8) n=21	0.710	6.2 (3.1 – 15.6) n= 139	6.4 (3.7 – 18.9) n= 139	0.287
	Lactating women	9.4 (5.4 – 22.9) n= 12	8.9 (5.4 – 22.9) n= 80	0.999	9.4 (4.3 – 22.9) n=49	12.6 (8.9 – 12.6) n=3	0.193	9.4 (5.3 – 16.3) n= 27	9.5 (6.4 – 22.9) n= 26	0.677

¹ Values are expressed as median, minimum and maximum

² Mann-Whitney test;

³ AA, wild type; AG, heterozygous; and GG homozygous mutant for the RFC1 80G>A polymorphism

⁴ CC, wild type; and CT, heterozygous for the GCPII 1561C>T polymorphism

⁵ CC, wild type; CT, heterozygous; and TT, homozygous mutant for the MTHFR 677C>T polymorphism

Table 6. Association between biochemical, clinical and genetic variables in Hcy levels.

*Multiple linear regression analysis with stepwise criteria.

Groups	Independent variables	R²	P[*]
Elderly	Vitamin B12	0.0324	0.0003
	Folate	0.0441	0.0001
	Gender (male)	0.1622	<0.0001
	Age (years)	0.0716	<0.0001
	RFC1 (genótipo AA x AG) (genótipo AA x GG)	0,019	0,011
Children	Vitamin B12	0.0782	0.0115
Pregnant women	Folate	0.0355	0.0020

REFERENCES

1. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1295S-303S.
2. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B-12 deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008;29:S238-44.
3. Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *Bmj* 2002;325:1202.
4. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *Jama* 2002;288:2015-22.
5. Allen LH. Causes of vitamin B-12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull* 2008;29:S20-34; discussion S35-7.
6. Devlin AM, Ling EH, Peerson JM, et al. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Hum Mol Genet* 2000;9:2837-44.
7. Vargas-Martinez C, Ordovas JM, Wilson PW, Selhub J. The glutamate carboxypeptidase gene II (C>T) polymorphism does not affect folate status in the Framingham Offspring cohort. *J Nutr* 2002;132:1176-9.
8. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation* 1998;98:2520-6.
9. D'Angelo A, Coppola A, Madonna P, et al. The role of vitamin B-12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene. A case-control study of patients with early-onset thrombotic events. *Thromb Haemost* 2000;83:563-70.
10. Hoey L, McNulty H, Askin N, et al. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1405-13.
11. MacFarlane AJ, Greene-Finestone LS, Shi Y. Vitamin B-12 and homocysteine status in a folate-replete population: results from the Canadian Health Measures Survey. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1079-87.

12. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA). Resolução RDC nº 344, 13 dezembro 2002. Internet: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> (accessed 18 jun 2013).
13. Clarke R, Grimley Evans J, Schneede J, et al. Vitamin B-12 and folate deficiency in later life. *Age Ageing* 2004;33:34-41.
14. Lamers Y. Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. *Ann Nutr Metab* 2011;59:32-7.
15. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* 1999;45:290-2.
16. Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
17. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, et al. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000;70:310-5.
18. Clarke R, Refsum H, Birks J, et al. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1241-7.
19. World Health Organization, Food and Agricultural Organization. Guidelines on food fortification with micronutrients. Geneva, Switzerland: WHO/FAO, 2006.
20. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B-12 status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *Am J Clin Nutr* 2011;94:666S-72S.
21. Xavier JM, Costa FF, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST. High frequency of vitamin B-12 deficiency in a Brazilian population. *Public Health Nutr* 2010;13:1191-7.
22. Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B-12 or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. *Food Nutr Bull* 2008;29:S74-85.
23. Lindenbaum J, Allen RH. Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency. *Folate in health and disease*. New York, 1995:43-73.

24. Lindenbaum J, Rosenberg IH, Wilson PW, Stabler SP, Allen RH. Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population. *Am J Clin Nutr* 1994;60:2-11.
25. Nurk E, Tell GS, Vollset SE, et al. Changes in lifestyle and plasma total homocysteine: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2004;79:812-9.
26. Tiemeier H, van Tuijl HR, Hofman A, Meijer J, Kiliaan AJ, Breteler MM. Vitamin B-12, folate, and homocysteine in depression: the Rotterdam Study. *Am J Psychiatry* 2002;159:2099-101.
27. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-83.
28. Hin H, Clarke R, Sherliker P, et al. Clinical relevance of low serum vitamin B-12 concentrations in older people: the Banbury B12 study. *Age Ageing* 2006;35:416-22.
29. Alessio AC, Annichino-Bizzacchi JM, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Hoehr NF. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Genet A* 2004;128A:256-60.
30. Cuevas-Nasu L, Mundo-Rosas V, Shamah-Levy T, et al. Prevalence of folate and vitamin B-12 deficiency in Mexican children aged 1 to 6 years in a population-based survey. *Salud Publica Mex* 2012;54:116-24.
31. Shakur YA, Garriguet D, Corey P, O'Connor DL. Folic acid fortification above mandated levels results in a low prevalence of folate inadequacy among Canadians. *Am J Clin Nutr* 2010;92:818-25.
32. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Neural-tube defects. *N Engl J Med* 1999;341:1509-19.
33. van der Put NM, van Straaten HW, Trijbels FJ, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:243-70.
34. Guerra-Shinohara EM, Paiva AA, Rondo PH, Yamasaki K, Terzi CA, D'Almeida V. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B-12. *Bjog* 2002;109:784-91.

35. Velzing-Aarts FV, Holm PI, Fokkema MR, van der Dijs FP, Ueland PM, Muskiet FA. Plasma choline and betaine and their relation to plasma homocysteine in normal pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1383-9.
36. Wallace JM, Bonham MP, Strain J, et al. Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the Seychelles Child Development Study. *Am J Clin Nutr* 2008;87:391-7.
37. Garcia-Casal MN, Osorio C, Landaeta M, et al. High prevalence of folic acid and vitamin B-12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:1064-70.
38. Ray JG, Goodman J, O'Mahoney PR, Mamdani MM, Jiang D. High rate of maternal vitamin B-12 deficiency nearly a decade after Canadian folic acid flour fortification. *Qjm* 2008;101:475-7.
39. Ray JG, Blom HJ. Vitamin B-12 insufficiency and the risk of fetal neural tube defects. *Qjm* 2003;96:289-95.
40. Ray JG, Wyatt PR, Thompson MD, et al. Vitamin B-12 and the risk of neural tube defects in a folic-acid-fortified population. *Epidemiology* 2007;18:362-6.
41. Ubbink JB. Is an elevated circulating maternal homocysteine concentration a risk factor for neural tube defects? *Nutr Rev* 1995;53:173-5.
42. Zhang T, Xin R, Gu X, et al. Maternal serum vitamin B-12, folate and homocysteine and the risk of neural tube defects in the offspring in a high-risk area of China. *Public Health Nutr* 2009;12:680-6.
43. Andersson A, Hultberg B, Brattstrom L, Isaksson A. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992;30:377-9.
44. Walker MC, Smith GN, Perkins SL, Keely EJ, Garner PR. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:660-4.
45. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. *Placenta* 1999;20:519-29.
46. Daly S, Cotter A, Molloy AE, Scott J. Homocysteine and folic acid: implications for pregnancy. *Semin Vasc Med* 2005;5:190-200.

47. Mignini LE, Latthe PM, Villar J, Kilby MD, Carroli G, Khan KS. Mapping the theories of preeclampsia: the role of homocysteine. *Obstet Gynecol* 2005;105:411-25.
48. Specker BL, Black A, Allen L, Morrow F. Vitamin B-12: low milk concentrations are related to low serum concentrations in vegetarian women and to methylmalonic aciduria in their infants. *Am J Clin Nutr* 1990;52:1073-6.
49. Casterline JE, Allen LH, Ruel MT. Vitamin B-12 deficiency is very prevalent in lactating Guatemalan women and their infants at three months postpartum. *J Nutr* 1997;127:1966-72.
50. Ramlau-Hansen CH, Moller UK, Moller J, Thulstrup AM. [Lactation--a risk factor for elevated plasma homocysteine?]. *Ugeskr Laeger* 2003;165:2819-23.
51. Christensen B, Arbour L, Tran P, et al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84:151-7.
52. Devlin AM, Clarke R, Birks J, Evans JG, Halsted CH. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 2006;83:708-13.
53. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-21.
54. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9.
55. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr* 2006;83:701-7.
56. Yang QH, Botto LD, Gallagher M, et al. Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey DNA Bank. *Am J Clin Nutr* 2008;88:232-46.
57. Winkelmayr WC, Eberle C, Sunder-Plassmann G, Fodinger M. Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier

(RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int* 2003;63:2280-5.

58. Yates Z, Lucock M. G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. *Life Sci* 2005;77:2735-42.
59. Lopreato FR, Stabler SP, Carvalho FR, et al. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. *Clin Chim Acta* 2008;398:134-9.
60. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *Jama* 1993;270:2693-8.

