

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Distribuição dos níveis de homocisteína em indivíduos pertencentes à Coorte de 1982, Pelotas-RS, segundo os genótipos do MTRR 66A>G**

**Josiane Weber Tessmann**

Pelotas, 2013

**Josiane Weber Tessmann**

**Distribuição dos níveis de homocisteína em indivíduos pertencentes à Coorte de 1982, Pelotas-RS, segundo os genótipos do MTRR 66A>G**

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Biotecnólogo.

Orientadora Acadêmica: Dr<sup>a</sup> Fabiana Kömmling Seixas

Orientadora de Estágio: Dr<sup>a</sup> Isabel Oliveira de Oliveira

Pelotas, 2013

**Banca Examinadora:**

Fabiana Kömmling Seixas - Dr<sup>a</sup> - UFPel;

Isabel Oliveira de Oliveira - Dr<sup>a</sup> – UFPel;

Janaína Vieira dos Santos Motta – Doutoranda – PPGE / UFPel;

Mônica Silveira Wagner - Mestranda – PPGB / UFPel

*“Dedico este trabalho a todos os amigos  
que torceram pelo meu sucesso e que  
sempre estiveram ao meu lado.”*

## **Agradecimentos**

A Deus, pela minha vida e pelas pessoas tão especiais que colocou nela.

Aos meus pais, Wilson Tessmann e Isolda Weber Tessmann, por sempre me apoiarem e acreditarem nos meus sonhos, pelas palavras de carinho e incentivo que nunca me faltaram.

À minha irmã, Elisane Tessmann, pelo amor e companheirismo, por todas às vezes que me ajudou e pela torcida para que tudo desse certo.

À minha avó Hilda Baller Weber, que agora está presente em nossas melhores lembranças, pelo carinho, ajuda e compreensão em todos os momentos da minha vida.

A toda a minha família pela preocupação e apoio em toda esta jornada.

À orientadora, Isabel Oliveira, pela oportunidade de estágio, pela confiança e dedicação, pelos ensinamentos passados que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos e colegas de laboratório, Mônica Silveira Wagner, Liziane Pereira da Silva, Otávio Martins Cruz e William Borges Domingues, pela ajuda na realização deste trabalho, por serem tão dedicados, pelas palavras de apoio e pelos momentos de descontração que sempre deram origem a boas risadas.

Às amigas, Cíntia Borges e Deise Freitas, pela parceria, força e carinho.

Às amigas, Giana Gaboardi, Luiza Fernandes, Marina Tuerlinckx e Patrícia Trentin, que sempre compartilharam comigo as alegrias e os desesperos da vida acadêmica, pela amizade, cumplicidade e pelo tempo que passamos juntas.

Às amigas, Francine Ribeiro, Cláudia Alves, Kathleen Almeida, Josiane Delgado, Michele Vieira e Gabriella Silva, por serem tão queridas e sempre terem palavras de conforto e incentivo.

Aos meus colegas de aula, pela cumplicidade e por tornarem esses 4 anos de convivência inesquecíveis.

Ao amigo, Matheus Barbosa Cardozo, pelo estímulo e por ficar feliz a cada página que eu escrevia.

A banca por ter aceitado o convite.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal de Pelotas que sempre ajudaram e incentivaram minha jornada acadêmica.

Ao Programa de Pós Graduação em Epidemiologia pela disponibilidade dos dados utilizados neste trabalho.

Aos laboratórios de Genômica Funcional, CDTec, e Genômica e Fitomelhoramento FAEM, pelo empréstimo dos equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Pelotas, pelo apoio financeiro e acolhida.

Ao Cnpq, pelo apoio financeiro para realização da pesquisa e formação acadêmica.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional,  
**MUITO OBRIGADA!**

## Resumo

TESSMANN, Josiane Weber. **Distribuição dos níveis de homocisteína em indivíduos pertencentes à Coorte de 1982, Pelotas-RS, segundo os genótipos do MTRR 66A>G**. 2013. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A homocisteína (Hcy), um aminoácido não essencial formado a partir da metionina, quando presente em elevadas concentrações no plasma sanguíneo pode ser um fator de risco para diversas doenças. Seus níveis plasmáticos são influenciados por fatores biológicos (gênero e etnia), fatores nutricionais (*status* do ácido fólico e das vitaminas B6 e B12), fatores comportamentais (fumo e álcool) além de fatores genéticos. Diversos genes são potenciais candidatos a marcadores de susceptibilidade à elevação dos níveis de Hcy, dos quais podemos destacar o gene que codifica a enzima Metionina Sintase Redutase (MTRR). A MTRR está envolvida na regulação da via metabólica da Hcy, sendo responsável pela manutenção do estado ativo da enzima Metionina Sintase (MTR), a qual catalisa a remetilação da Hcy em metionina em uma reação dependente de vitamina B12. Estudos epidemiológicos indicam que polimorfismos no gene da MTRR podem estar relacionados com o aumento dos níveis de Hcy. Dentre estes se encontra o SNP 66A>G (rs1801394) que resulta na substituição do aminoácido isoleucina por metionina na proteína final. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever a distribuição dos níveis de homocisteína em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos ocorridos na cidade de Pelotas-RS no ano de 1982 distribuídos segundo os genótipos do SNP 66A>G do gene da MTRR, além de avaliar a associação do polimorfismo com gênero e cor da pele autorreferida. A genotipagem das amostras foi realizada através do ensaio de TaqMan®, no 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Das 3.831 amostras de DNA da coorte de 82, foram genotipadas 3.814, com a seguinte distribuição genotípica para o SNP 66A>G: AA = 30,2%, AG = 48,7% e GG = 21,1%. A distribuição alélica e genotípica encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 1,342$  e  $p = 0,247$ ), sendo a frequência do alelo menos comum igual a 0,45 (alelo G). Foi observada uma associação do SNP 66A>G com a cor da pele autorreferida pelo participante ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, a distribuição dos genótipos não foi diferente entre os homens e as mulheres estudadas ( $p = 0,201$ ). Da mesma forma, o polimorfismo não foi associado aos níveis de Hcy plasmáticos na coorte de 1982 ( $p = 0,417$ ). Em conclusão, os níveis de Hcy não são diferentes entre os genótipos do polimorfismo 66A>G do gene da MTRR. A associação do SNP com a cor da pele autorreferida deve ser confirmada através de marcadores de ancestralidade. Investigações complementares devem ser realizadas a fim de se buscar novos marcadores genéticos associados aos níveis de Hcy, ampliando o conhecimento sobre a interação gene-ambiente no mecanismo de doenças crônicas complexas relacionadas a esse aminoácido e que acometem um número cada vez maior de indivíduos.

Palavras-chave: Homocisteína. Metionina Sintase Redutase. Polimorfismos. Estudos de Coortes.

## Abstract

TESSMANN, Josiane Weber. **Distribution of homocysteine levels in individuals from 1982 Cohort, Pelotas-RS, according to the genotypes of the MTRR 66A>G.** 2013. 49. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The homocysteine (Hcy) is a non-essential aminoacid synthesized from methionine. Hcy in high concentrations can be a risk factor for many diseases. Its plasmatic levels are influenced by biological, genetic and nutrition factors, such as folic acid status and B6 and B12 vitamins. Several genes are potential candidates for markers of susceptibility to Hcy level increasing, for example, the gene encoding the enzyme Methionine Synthase Reductase (MTRR). MTRR is involved in the regulation of metabolic pathway of Hcy. It is responsible for maintaining the active state of the Methionine Synthase (MTR) enzyme, which catalyzes the remethylation of the Hcy in methionine in a reaction dependent on vitamin B12. Epidemiological studies indicate that polymorphisms in the MTRR gene may be related to increased levels of Hcy. Among these, is found the SNP 66A>G (rs1801394) that results in the isoleucine to methionine substitution in the final protein. The objective of this study was to describe the levels of Hcy in 1982 cohort individuals distributed according to the MTRR 66A>G genotypes and also to evaluate the association of the polymorphism with gender and self-reported skin color. The genotyping was performed by TaqMan® assay using the 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). From 3.831 DNA samples it were genotyped 3.814 ones. The distribution for the SNP 66A>G was: AA = 30.2%, AG = 48.7% and GG = 21.1%. The allelic and genotypic distributions were found in Hardy-Weinberg Equilibrium ( $\chi^2 = 1.342$  and p value = 0.247), being the minor allele frequency of 0.45 for G allele. It was found an association of SNP 66A>G with self-reported skin-color (p <0.001). On the other hand, the genotype distribution was not different between men and women studied (p = 0.201). Also it was not found an association between the polymorphism and the Hcy levels (p = 0.417). In conclusion, the Hcy levels are not different between the MTRR 66A>G genotypes. The association of this polymorphism with self-reported skin-color should be confirmed using ancestry markers. Complementary researches to this study must be conducted in order to amplify the knowledge of gene-environment interactions and its involvement in the pathophysiologic mechanism of complex diseases that affect an increasing number of individuals in different populations.

Keywords: Homocysteine. Methionine Synthase Reductase. Polymorphism. Cohort Studies.



## Lista de Tabelas

Tabela 1	Distribuição alélica e genotípica do SNP 66A>G do gene da MTRR, segundo o gênero e a cor da pele autorreferida, numa amostra de 3.814 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas-RS.	30
Tabela 2	Distribuição dos níveis de homocisteína, segundo o gênero e a cor da pele autorreferida, numa amostra de 3.821 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas – RS.	31
Tabela 3	Distribuição dos níveis de homocisteína segundo os genótipos do SNP 66A>G do gene da MTRR numa amostra de 3.805 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas-RS.	31

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Ácido Desoxirribonucleico – DNA

Ácido Desoxirribonucleico Complementar – cDNA

Ácido Ribonucleico - RNA

Ácido Ribonucleico Transportador – tRNA

Adenina - A

Adenosina Trifosfato - ATP

Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec

Cistationa  $\beta$  – Sintase - CBS

Deoxitimidilato Monofosfato - dTMP

Deoxiuridilato Monofosfato – dUMP

Desvio Padrão - dp

Dihidrofolato Redutase – DHFR

Doença Arterial Coronariana - DAC

Estados Unidos – USA

Equilíbrio de Hardy-Weinberg - EHW

Gramas - g

Graus Celsius - °C

Guanina – G

Haplotype Map - HapMap

Hiperhomocisteinemia - Hhcy

Homocisteína – Hcy

Intervalo de Confiança - IC

Low Density Lipoprotein – LDL

Maranhão - MA

Millennium Cohort Study - MCS

Metilenotetrahidrofolato Redutase - MTHFR

Metionina Adenosiltransferase - MAT

Metionina Sintase – MTR

Metionina Sintase Redutase – MTRR

Micrograma -  $\mu\text{g}$

Microlitro -  $\mu\text{L}$

Micromol por Litro -  $\mu\text{mol L}^{-1}$

Milimol por Litro –  $\text{mmol L}^{-1}$

Minor Groove Binding – MGB

Mononucleotido de Flavina - FMN

N-5-metiltetrahidrofolato – 5-MTHF

Nanogramas por microlitro –  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$

National Center for Biotechnology Information – NCBI

Nanômetro – nm

Número Amostral – n

Polimorfismo de Nucleotídeo Único – SNP

Programa de Pós Graduação em Epidemiologia - PPGE

Qui-quadrado -  $\chi^2$

Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Rio Grande do Sul - RS

S-adenosilhomocisteína – SAH

S-adenosilhomocisteína Hidrolase - SAHH

S-adenosilmetionina – SAM

São Paulo – SP

Tetrahidrofolato – THF

The Avon Longitudinal Study of Parents and Children – ALSPAC

The Cebu Longitudinal Health and Nutrition Survey – CLHNS

The National Children's Study – NCE

Timidilato Sintase – TS

Tris-EDTA - TE

Universidade Federal de Pelotas – UFPel

5,10 Metiltetrahidrofolato Redutase – 5,10 MTHFR

5,10 Metiltetrahidrofolato - 5,10 MTHF

## Sumário

1	Introdução .....	14
2	Objetivos .....	16
2.1	Objetivo Geral .....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	Revisão de Literatura .....	17
3.1	Aspectos gerais .....	17
3.2	Rota metabólica da homocisteína.....	17
3.2.1	Via de remetilação .....	18
3.2.1.1	Via do Folato .....	19
3.2.2	Via de transulfuração .....	19
3.3	Hiper-homocisteinemia .....	20
3.3.1	Fatores que influenciam os níveis de homocisteína plasmática .....	21
3.3.1.1	Vitamina B12 .....	21
3.3.1.2	Folato.....	21
3.3.1.3	Sexo .....	22
3.3.1.4	Idade.....	22
3.3.1.5	Genéticos .....	22
3.4	Gene da MTRR.....	23
3.5	Coortes de Nascimentos.....	24
4	Materiais e métodos .....	26
4.1	População estudada .....	26
4.2	Extração de DNA .....	26
4.3	Quantificação do DNA.....	27
4.4	Diluição do DNA.....	27
4.5	Genotipagem .....	27
4.6	Dosagem de homocisteína .....	28
4.7	Análise estatística .....	28
5	Resultados .....	29
6	Discussão.....	32
7	Conclusão .....	35
8	Referências .....	36
	Anexos.....	48

## 1 Introdução

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido não essencial que participa do metabolismo da metionina (GONÇALVES; VAZ; BUZZI, 2005).

O aumento da concentração plasmática de Hcy está associado ao risco de desenvolvimento de muitas doenças. Dentre elas, destacam-se as doenças cardiovasculares (CLARKE et al., 2002), alguns tipos de cânceres (CUI et al., 2010), Síndrome de Down (JAMES, 2004), Alzheimer (MORRIS, 2003) defeitos congênitos (FÉLIX; LEISTNER; GIUGLIANI, 2004), aterosclerose nos vasos coronários e cerebrais (NETO; CHAGAS, 2001), diabetes, osteoporose, doenças neurodegenerativas, autoimunes, renais, neuropsiquiátricas (BRUSTOLIN; GIUGLIANI; FELIX, 2010), abortos e outras complicações da gravidez (VANNUCCHI; MELLO, 2007).

A Hcy plasmática é influenciada por fatores biológicos, como gênero e etnia (NEVES; MACEDO; LOPES, 2004), fatores nutricionais, como *status* do ácido fólico e das vitaminas B6 e B12, fatores comportamentais, como fumo e álcool, além de fatores hereditários, como mutações nos genes que codificam enzimas que participam do seu metabolismo (SISLASTE et al., 2001). Dentre esses fatores, encontra-se, no cromossomo 5 (5p15.), o gene que codifica a enzima Metionina Sintase Redutase (MTRR). Tal enzima, é responsável pela manutenção do estado ativo da enzima Metionina Sintase (MTR), a qual, por sua vez, catalisa a remetilação da Hcy em metionina em uma reação colabamina (vitamina B12) dependente (YAMADA et al., 2006).

O gene da MTRR é caracterizado por ser bastante polimórfico (ZAVADAKOVA; SOKOLOVA; KOZICH, 2003). A presença desses polimorfismos pode causar o comprometimento da função da enzima MTRR, levando a uma baixa afinidade pela MTR (BAILEY; GREGORY, 1999).

Dentre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) descritos no gene da MTRR, encontra-se o SNP 66A>G (rs1801394) que corresponde à troca do nucleotídeo adenina (A) por guanina (G), na posição 66 da sequência do ácido desoxirribunucleio complementar (cDNA). Como resultado, ocorre a substituição do aminoácido isoleucina por metionina na proteína final (BAILEY; GREGORY, 1999).

Os SNPs do gene da MTRR têm sido associados ao aumento de suscetibilidade para algumas doenças (LARAQUI et al., 2006; ZENG et al., 2011). A associação do SNP 66A>G com níveis aumentados de Hcy ainda é controversa.

Diante disto, é importante estudar em diferentes populações a associação deste polimorfismo com variáveis de interesse. Portanto, o presente estudo visa descrever a distribuição dos níveis de homocisteína segundo os genótipos do SNP 66A>G do gene da MTRR, além de investigar a associação do polimorfismo com gênero e cor da pele autorreferida em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos de 1982, Pelotas-RS.

Cabe salientar ainda que, SNPs constituem a base molecular da variação fenotípica entre os indivíduos e, que fatores nutricionais são fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis. A investigação das interações gene-ambiente contribuem para o entendimento de mecanismos fisiopatológicos envolvidos em doenças crônicas complexas que acometem um número crescente de indivíduos em diferentes populações.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Descrever a distribuição dos níveis de homocisteína segundo os genótipos do SNP 66A>G do gene da MTRR, além da associação do polimorfismo com variáveis demográficas em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos de Pelotas do ano de 1982.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Descrever as frequências alélicas e genotípicas do SNP 66A>G do gene da MTRR em indivíduos da coorte de 1982.

Descrever as frequências alélicas e genotípicas do SNP 66A>G do gene da MTRR em indivíduos da coorte de 1982, de acordo com o gênero.

Descrever as frequências alélicas e genotípicas do SNP 66A>G do gene da MTRR em indivíduos da coorte de 1982, de acordo com a cor da pele autorreferida.



### **3 Revisão de Literatura**

#### **3.1 Aspectos gerais**

A metionina é um aminoácido essencial presente nos alimentos que contenham proteínas animais. Encontra-se, juntamente com seus produtos metabólicos, envolvida em vários processos biológicos, como metilação e síntese de lipídeos, de proteínas e de ácido desoxirribonucleico (DNA) (SELHUB, 1999a). A rota metabólica da metionina dá origem a um importante produto, a homocisteína (Hcy).

A Hcy é um aminoácido não essencial, não proteínogênico, com peso molecular de 135,1 g e que contém um grupamento de enxofre na sua estrutura (NURK et al., 2001). Na circulação cerca de 80-90% da Hcy encontra-se ligada a proteínas, principalmente a albumina, enquanto 10-20% dá origem de forma espontânea a di-sulfídios como a homocistina, que corresponde a duas moléculas de Hcy ou a cisteína-homocisteína. O restante, menos de 1%, permanece na forma livre (MANSOOR et al., 1995). A soma das concentrações de todas essas formas é chamada de Hcy total ou Hcy plasmática (GONÇALVES; VAZ; BUZZI, 2005).

Uma das funções da Hcy é a reciclagem de folatos intracelulares, de modo que sua rota metabólica está fortemente envolvida no metabolismo dessa molécula.

O folato, também conhecido como ácido fólico ou vitamina B9 é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, presente em frutas e vegetais. Atua na síntese de DNA, de ácido ribonucleico transportador (tRNA) e de aminoácidos (ESKES, 1997), no reparo do genoma, na regulação gênica, na formação de mielina e na síntese de neurotransmissores (GORDON, 2009).

#### **3.2 Rota metabólica da homocisteína**

A Hcy participa da interseção de duas vias metabólicas: remetilação à metionina e transulfuração. A via de remetilação ocorre preferencialmente no jejum, quando os níveis de metionina estão baixos, contribuindo para a sua regeneração. Por outro lado, a via de transulfuração é ativada quando há sobrecarga de metionina, resultando na produção de cisteína (NEVES; MACEDO; LOPES, 2004; WIERZBICKI, 2007).

Em indivíduos que consomem alimentos contendo metionina, como por exemplo, carne bovina, ovos, leites entre outros, 70% da Hcy entra na via de transulfuração. Por outro lado, naqueles que não consomem alimentos ricos em metionina ou que estão em jejum, a via de remetilação é favorecida e apenas 10% entra na via de transulfuração (NEVES; MACEDO; LOPES, 2004)

Além disso, a Hcy ainda é transportada para o meio extracelular ajudando a manter baixas as concentrações intracelulares que são potencialmente citotóxicas (CHRISTENSEN et al., 1997).

### 3.2.1 Via de remetilação

O nível plasmático de Hcy é regulado pela quantidade de folato disponível (BRANDALIZE, 2009), pois é na via de remetilação que a Hcy compartilha reações com o ciclo do folato.

Após a metionina entrar no organismo, a enzima Metionina Adenosiltransferase (MAT) transfere um grupo adenosil da adenosina trifosfato (ATP) para o átomo de enxofre da metionina e forma S-adenosilmetionina (SAM) (AMORIM et al., 2011). SAM é um importante produto para as reações de metilação que ocorrem no organismo. Problemas na síntese de SAM podem levar a um estado de hipometilação (SMULDERS et al., 2006). Cerca de 80% das reações (ROTHENVERG, 1999) de síntese de DNA, ácido ribonucleico (RNA), proteínas, neurotransmissores, hormônios, ácidos graxos, polissacarídeos e fosfolípidos, dependem da presença de SAM (CHIANG, 1996). Posteriormente a formação de SAM, ocorre a transferência do grupamento metil para um aceptor formando S-adenosilhomocisteína (SAH) que, quando é hidrolisada pela S-adenosilhomocisteína Hidrolase (SAHH), leva à formação de Hcy e adenosina. Essa reação é reversível e favorecida pelo aumento nos níveis de Hcy (WEIR et al., 1992).

A Hcy formada recebe um grupo metil do N-5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), um produto intermediário do ciclo do folato, o qual se converte em Tetrahidrofolato (THF) (STANGER et al., 2009). Essa reação é catalisada pela Metionina Sintase (MTR) e tem como produto final a metionina, reiniciando o ciclo (ZHANG et al., 2005).

A enzima MTR possui como cofator a cob(I)alamina, ou vitamina B12, que é uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos

(GILLHAM et al., 1997), e está presente nos alimentos de origem animal, especialmente leite, carne e ovos (MAHAN et al., 1998).

A cobalamina se encontra fortemente ligada à MTR durante a reação e serve como carreador intermediário de grupos metil provenientes do 5-MTHF (LECLERC et al., 1996). Após a reação transforma-se em metilcobalamina, que finalmente permite a transferência de metil para a Hcy (RIBEIRO et al., 2002).

A cob(I)alamina depois de participar de um certo número de reações pode se oxidar a cob(II)alamina ou a cob(III)alamina, o que deixa a MTR inativa. Sua regeneração funcional necessita da enzima metionina sintase redutase (MTRR), a qual promove a redução à cob(I)alamina, que possui a SAM como doador do grupamento metil para a reação (MATTHEWS et al., 1998) Portanto, MTRR desempenha um importante papel na manutenção da cobalamina e pode ser um fator determinante das concentrações de Hcy.

### **3.2.1.1 Via do Folato**

O ácido fólico, após ser consumido, é reduzido pela enzima Dihidrofolato Redutase (DHFR) à THF, sua forma ativa. O THF é convertido a 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10 MTHF) pela enzima 5,10 Metiltetrahydrofolato Redutase (5,10 MTHFR) (ESKES, 1997). A 5,10 MTHFR é alvo de inibição alostérica pela SAM (AMORIM et. al., 2011).

A enzima Metilenotetrahydrofolato Redutase (MTHFR) converte o 5,10 MTHF em 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), que transfere seu grupo metil para a Hcy e volta a ser THF, o qual segue na via metabólica para a síntese de DNA e RNA (ESKES, 1997).

### **3.2.2 Via de transulfuração**

Na via de transulfuração, a enzima Cistationina  $\beta$ -Sintase (CBS), dependente de piridoxal fosfato (vitamina B6), catalisa a reação de condensação da Hcy com a serina, formando a cistationina. Essa reação é irreversível e regulada pela SAM. A cistationina formada é clivada pela  $\gamma$ -cistationase para formar 2-oxoglutarato e cisteína. Essa reação também é dependente de vitamina B6 (AMORIM et. al., 2011).

### 3.3 Hiper-homocisteinemia

A hiper-homocisteinemia (Hhcy), que corresponde à elevação dos níveis de Hcy no plasma, é observada em aproximadamente 5% da população em geral e está associada ao risco de desenvolvimento de muitas doenças, tais como doenças cardiovasculares (CLARKE et al., 2002), alguns tipos de cânceres (CUI et al., 2010), Síndrome de Down (JAMES, 2004), Alzheimer (MORRIS, 2003) defeitos congênitos (FÉLIX; LEISTNER; GIUGLIANI, 2004), aterosclerose nos vasos coronários e cerebrais (NETO; CHAGAS, 2001), diabetes, osteoporose, doenças neurodegenerativas, autoimunes, renais, neuropsiquiátricas (BRUSTOLIN; GIUGLIANI; FELIX, 2010), abortos e outras complicações da gravidez (VANNUCCHI; MELLO, 2007).

Entre os mecanismos fisiopatológicos de danos associados pelas altas concentrações de Hcy se incluem: danos celulares mediados por radicais livres (KANANI et al., 1999), oxidação do LDL-colesterol, com deposição na parede celular, lesão da célula endotelial, proliferação de células lisas vasculares (VANNUCCHI; MELLO, 2007), ativação plaquetária causando distúrbios na coagulação (PALOMO; TORRES; GUZMÁN, 2007) e regulação de leucócitos (DUDMAN, 1999).

A alteração da concentração de Hcy no plasma pode ser classificada como, leve (entre 14 e 16  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), moderada (entre 16 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e grave (entre 31 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (KANG, 1996). Porém, é ideal que cada população determine seus próprios valores, para uma possível detecção de Hhcy (TADDEI-GRAVINA et al., 2005).

O aumento do nível plasmático de Hcy pode ser causado por alterações na via do metabolismo da homocisteína-folato, por meio de fatores ambientais e genéticos. Dentre os fatores ambientais, podemos destacar os nutricionais (deficiência de vitamina B12 e folato), fisiológicos (idade, sexo), estilo de vida (tabagismo, sedentarismo), ação de alguns fármacos e algumas doenças (TADDEI-GRAVINA et al., 2005). Os fatores genéticos incluem mutações nos genes das enzimas que participam do metabolismo da homocisteína-folato (SISLASTE et al., 2001).

### **3.3.1 Fatores que influenciam os níveis de homocisteína plasmática**

#### **3.3.1.1 Vitamina B12**

A deficiência de vitamina B12 causa diminuição da SAM, ocorrendo a redução de importantes reações de transmetilação no organismo (MORETTI et al., 2004). A alteração do funcionamento da MTR leva a interrupção da conversão de Hcy em metionina, resultando em Hhcy (VENÂNCIO; BURINI; YOSHIDA, 2004).

Além disso, o aumento de 5-MTHF, decorrente do não funcionamento de MTR, juntamente com a deficiência de outros metabólitos como o 5,10 MTHF, levam a alteração na síntese de DNA (SNOW, 1999).

A deficiência de vitamina B12 também pode ocasionar outros problemas como: transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares (ANDRES et al., 2004). A dosagem adequada por dia é de 1500-6000 µg (AMORIM et al., 2011).

#### **3.3.1.2 Folato**

A molécula central do metabolismo do folato envolvido na via de remetilação da Hcy é o THF, que pode ser utilizado por outra via para a síntese de timidilato e purina, essenciais na formação de DNA (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002). O 5,10-MTHF atua como cofator para a enzima Timidilato Sintase (TS) que converte deoxiuridilato monofosfato (dUMP) para deoxitimidilato monofosfato (dTMP). Baixos níveis plasmáticos de 5,10 MTHF diminui a síntese de dTMP e aumenta a probabilidade de incorporação errada de uracilo dUTP (GIOVANNUCCI et al., 1993), o que pode aumentar as quebras das fitas de DNA (MELSE-BOONSTRA et al., 2002). Isso potencialmente conduz a proto-oncogenese, com ativação e indução da transformação maligna (AMES, 2001; DUTHIE, 1999). Para a síntese de purina utiliza-se o 10-formil-THF (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

As vias de remetilação e de transulfuração são reguladas pela SAM, que age de acordo com a disponibilidade de metionina ou folato. Dependendo da concentração de SAM pode ocorrer ativação ou inibição da MTHFR. Baixas concentrações de SAM, provavelmente decorrentes de baixa ingestão de metionina, aumentam a atividade da MTHFR, o que acarreta na redução de folato intracelular e

sua utilização na via de metilação necessária à reposição de SAM (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002).

Alta concentração de SAM inibe a MTHFR, o que faz com que a 5-MTHF também sofra redução, levando a uma diminuição da metilação da Hcy. Quando isso acontece, há aumento da atividade de CBS e a via de transulfuração é ativada (SELHUB; MILLER, 1992). O folato intracelular se mantém na forma não metilada e é utilizado para a síntese de nucleotídeos (BALUZ; CARMO; ROSAS, 2002). Portanto a deficiência de folato pode afetar a metilação do DNA que é importante para a regulação gênica (KIM, 1999).

### **3.3.1.3 Sexo**

Os homens apresentam um aumento de aproximadamente 21% nos níveis de Hcy em comparação àqueles observados nas mulheres (AMORIM et al., 2011). Assim como, mulheres pós-menopáusicas têm níveis superiores àquelas pré-menopáusicas (LUSSIER-CANCAN; XHIGNESSE; PIOLOT, 1996), isto provavelmente pelo efeito do estrógeno no metabolismo da Hcy (AMORIM et al., 2011).

### **3.3.1.4 Idade**

A concentração de Hcy aumenta com a idade, aproximadamente de 10,8 mmol L<sup>-1</sup> na idade de 40-42 anos para 12,4 mmol L<sup>-1</sup> entre 65 e 67 anos (NURK et al., 2001).

### **3.3.1.5 Genéticos**

O metabolismo homocisteína-folato pode ser influenciado por diversos genes, que interagem para regular a resposta a diferentes sinais. Dentre tais genes estão, o gene *MTHFR* (GUDNASON et al., 1998), o *MTRR* (LECLERC et al., 1996), o *MTR* e o *CBS* (MONSEN; UELAND, 2003).

### 3.4 Gene da MTRR

A enzima MTRR é codificada pelo gene *MTRR* que se localiza no cromossomo 5 (5p15.3) (YAMADA et al., 2006).

Polimorfismos no gene da MTRR podem causar o comprometimento da função enzimática levando a uma baixa afinidade por MTR. Este gene apresenta-se bastante polimórfico, contendo mais de dez SNPs presentes em regiões exônicas (ZAVADAKOVA; SOKOLOVA; KOZICH, 2003).

Dentre os SNPs descritos na literatura, encontra-se o SNP 66A>G (rs1801394). Este corresponde à troca do nucleotídeo adenina (A) por guanina (G), na posição 66 da sequência de cDNA, resultando na substituição do aminoácido isoleucina por metionina na proteína final (BAILEY; GREGORY, 1999).

A presença do alelo G leva a redução da atividade da enzima MTRR, que chega a exibir uma atividade quatro vezes menor que a proteína selvagem *in vivo* (OLTEANU; MUNSON; BANERJEE, 2002). Em comparação com SNPs presentes em outros genes da rota homocisteína-folato, a contribuição da variante MTRR 66GG para os níveis de Hcy total é metade do efeito do polimorfismo MTHFR 677TT, e duas vezes o efeito do polimorfismo MTR 2756AA (FEIX et al., 2004).

Embora ainda não esteja bem esclarecido o verdadeiro efeito deste polimorfismo na atividade da enzima MTRR, sabe-se que este SNP se encontra dentro do domínio de ligação da proteína com o mononucleotídeo de flavina (FMN) (LECLERC et al., 1998). Isto sugere que a troca de isoleucina por metionina poderia afetar a interação da proteína com o FMN (WILSON et al., 1999).

Alguns estudos epidemiológicos indicam que o SNP 66A>G do gene da MTRR, está envolvido com o risco de desenvolvimento de algumas doenças, tais como: carcinoma epidermóide de esôfago (SOLOMON et al., 2003); desenvolvimento de transtornos do espectro autista (GODOY, 2010) e câncer de cabeça e pescoço (ZHANG et al. 2005).

Em relação a doenças cardiovasculares, foi descrito que o SNP 66A>G quando associado ao SNP 424C>T, também presente no gene da MTRR, constitui um fator de risco para o desenvolvimento de cardiopatias congênitas (ZENG et al., 2011). Por outro lado, o SNP 66A>G isolado não foi associado à doença arterial coronariana. Porém, quando associado ao SNP 2756A>G presente na MTR foi

observado um aumento nos níveis de Hcy, contribuindo para o risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (LARAQUI et al., 2006).

### 3.5 Coortes de Nascimento

Estudos de ciclo vital, como os estudos de coortes de nascimentos são importantes para a compreensão de processos biológicos, comportamentais e psicossociais que operam ao longo da vida do indivíduo. Tais estudos permitem investigar a influência dos efeitos de exposições precoces sobre a saúde, ou sobre o risco de desenvolvimento de doenças crônicas durante as várias fases da vida do indivíduo, ou seja, a gestação, a infância, a adolescência, a fase adulta e a velhice. Portanto, são estudos-chave para a compreensão dos efeitos de condições de vida intra-uterina e durante a infância e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (OSLER et al., 2004).

Existem amplos estudos de coortes de nascimentos realizados em diferentes países, tais como: *The Avon Longitudinal Study of Parents and Children* (ALSPAC) (FRASER et al., 2012) e o *Millennium Cohort Study* (MCS), ambos no Reino Unido (SMITH; JOSHI, 2002); *The Cebu Longitudinal Health and Nutrition Survey* (CLHNS), nas Filipinas (ADAIR et al., 2010); *The National Children's Study* (NCE), nos Estados Unidos (LANDRIGAN et al., 2006) e *Birth to Twenty* na África do Sul (RICHTER et al., 2007).

No Brasil, a primeira coorte de nascimentos foi realizada em Ribeirão Preto – SP, no ano de 1978 incluindo 6.827 nascimentos. Uma segunda coorte nesta mesma região foi iniciada em 1994 com 2.846 participantes. Outro estudo de coorte também foi realizado em São Luis - MA, no ano de 1997-1998, incluindo 2.443 participantes (CARDOSO et al. 2007).

Neste contexto, foi iniciado em Pelotas – RS pelo Programa de Pós Graduação em Epidemiologia (PPGE) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), o estudo da coorte de nascimentos do ano de 1982. Posteriormente outros dois estudos de coortes foram desenvolvidos com intervalo de 11 anos entre eles, a coorte de 1993 e a coorte de 2004 (BARROS et al., 2008).

A coorte de 1982 representa um estudo de ciclo vital, que é considerado um dos maiores e mais longos estudos de coortes de países em desenvolvimento (VICTORA et al., 2003). Neste estudo foram incluídos indivíduos que nasceram na



cidade de Pelotas, RS, Brasil, no período de 1 de janeiro a 31 de dezembro de 1982 e que residiam na zona urbana deste município. Foram registrados 6.011 crianças nascidas em 3 maternidades responsáveis por 99,2% de todos os nascimentos na cidade, das quais 5.914 nasceram vivos (BARROS et al., 2008).

Vários acompanhamentos foram realizados ao longo dos anos para coletar informações de caráter demográfico, biológico, sócio-econômico e reprodutivo, compondo um banco de dados com mais de 2.000 variáveis. As principais etapas do estudo aconteceram em 1983, 1984, 1986, 1995, 1997, 2000 e 2001. Um novo acompanhamento desta coorte foi realizado em 2004/2005 quando também foi coletada uma amostra de sangue de 3.831 participantes, que permitiu o armazenamento de soro e extração de DNA (VICTORA et al., 2003).

## 4 Materiais e métodos

### 4.1 População estudada

As amostras de DNA utilizadas neste estudo foram obtidas do banco de DNA da coorte de 1982 do PPGE da UFPel. O banco de DNA é composto por 3.831 amostras dos participantes que participaram do acompanhamento no ano de 2004/2005 (VICTORA et al., 2003).

Os dados referentes às variáveis cor da pele autorreferida em 3 categorias (“branca = indivíduos que se autorreferem como brancos”; “preta = indivíduos que se autorreferem como pretos ou mulatos”; e “outra = indivíduos que se autorreferem como amarelos ou índios”), sexo do recém-nascido e dosagens de Hcy foram obtidos do banco de variáveis da coorte de 1982, do PPGE.

A variável cor da pele autorreferida e a coleta de soro, para a dosagem de Hcy, foram obtidas no ano de 2004-2005. A variável sexo corresponde ao sexo do recém-nascido obtido no ano de 1982 (BARROS et al., 2008).

Esse estudo faz parte do projeto intitulado “Estudo da associação de polimorfismos de genes codificadores de enzimas relacionadas ao metabolismo da homocisteína com fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis em indivíduos pertencentes às coortes de nascimentos ocorridos nos anos de 1982 e de 1993, Pelotas-RS, Brasil”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas. Cada participante da coorte assinou um termo de consentimento livre e pré-informado autorizando as análises propostas (Anexo 1).

### 4.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada no Laboratório de Fisiologia Molecular, pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da UFPel, no ano de 2004/2005.

O DNA foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico utilizando a metodologia de *salting-out*, baseado no protocolo de Miller (1998).

As amostras de DNA se encontram armazenadas em 3 alíquotas separadas, uma em freezer -80°C e, duas em freezer – 20°C, formando o banco de DNA da coorte de 1982.

### 4.3 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada no Laboratório de Genômica Funcional, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec da UFPel, no ano de 2011.

A leitura da concentração de DNA e a relação entre as absorvâncias 260/280 nm (RAT) foi realizada por espectrofotometria, através do equipamento NanoVue® (GE Healthcare - USA) utilizando-se 1 µL de cada amostra na leitura.

### 4.4 Diluição do DNA

Foi preparada uma diluição do DNA utilizando-se tampão TE (Tris-EDTA), a fim de se obter a concentração final de 20 ng µL<sup>-1</sup> para ser utilizada na reação de genotipagem por discriminação alélica com o uso de sondas TaqMan®. A diluição foi mantida à 4°C até seu uso nas reações de genotipagem.

### 4.5 Genotipagem

A genotipagem foi realizada no Laboratório de Genômica e Fitomelhoramento, pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da UFPel.

A genotipagem do SNP 66A>G (rs1801394) do gene da MTRR foi realizada através da técnica de discriminação alélica utilizando o ensaio comercial TaqMan® no equipamento 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems by Life Technologies – *Grand Island, USA*).

Foram analisadas amostras de DNA genômico de 3.831 indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos de 1982. No ensaio foi utilizado um par de *primers forward* e *reverse*, os quais flanqueiam o polimorfismo de interesse, e um par de sondas do tipo *Minor Groove Binding* (MGB).

A sonda (C\_3068176\_10, Applied Biosystems) utilizada apresenta o fluoróforo repórter VIC®, para detectar o alelo A, e o fluoróforo repórter FAM®, que detecta o alelo G. A atividade 5' nuclease da TaqDNA Polimerase durante a fase de

extensão do PCR cliva o repórter da sonda perfeitamente hibridizada, ocorrendo emissão de fluorescência que é detectada pelo equipamento Real Time ABI 7.500 Fast.

A reação foi padronizada em 45 ciclos sendo a quantidade dos reagentes para cada amostra a seguinte:

- Água DNase *Free* – 2,2 µL
- Master Mix – 3,0 µL
- SNP Assay (sonda) – 0,3 µL
- DNA – 0,5 µL

Para o controle de qualidade foi realizado o sorteio de 5% das amostras (n = 192) através do programa estatístico STATA versão 12. Além disso, como recomendado pelo fabricante, as reações que apresentaram qualidade inferior a 98% também foram repetidas.

#### **4.6 Dosagem de homocisteína**

Os níveis séricos de Hcy foram dosados pelo Laboratório de Fisiologia Molecular, pertencente ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da UFPel, no ano de 2010.

A dosagem de Hcy na coorte de 1982 foi realizada por um ensaio de quimioluminescência através do equipamento IMMULITE® 1 (SIEMENS) (LOPES et al., 2010). Do número total de 3.826 amostras analisadas, foi possível obter a dosagem em 3.821.

#### **4.7 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pelo programa STATA versão 12. Foram avaliadas as frequências alélica e genotípica do SNP 66A>G pelo teste do qui-quadrado, com um grau de liberdade, a fim de se investigar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise da associação entre os genótipos e a variável Hcy foi realizada pela análise de variância e os resultados foram apresentados como média,  $\pm$  desvio padrão e intervalo de confiança. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%.

## 5 Resultados

Foram processadas e analisadas 3.831 amostras de DNA genômico da população alvo, pela técnica de discriminação alélica utilizando sondas pré-desenhadas Taqman®. Dentre estas, 17 apresentaram resultados negativos para a reação de amplificação, o que pode ser decorrente de possíveis degradações das amostras. Portanto, o total de indivíduos genotipados foi de 3.814.

A média da qualidade da reação de genotipagem foi de 99,56%. Na repetição de 5% das reações, foi obtido 100% de concordância entre os resultados.

A frequência alélica observada na população em estudo foi de 0,55 para o alelo A e 0,45 para o alelo G. A frequência genotípica foi de 30,2% (n=1151) para o genótipo AA, 48,7% (n=1856) para o genótipo AG e 21,1% (n=807) para o genótipo GG. A distribuição alélica e genotípica se apresentou em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ( $\chi^2 = 1,342$  e  $p = 0,247$ ).

A distribuição alélica e genotípica do SNP 66 A>G do gene da MTRR segundo as variáveis gênero e cor da pele autorreferida são apresentados na Tab. 1.

Foi observada uma associação significativa do SNP 66A>G com a cor da pele autorreferida ( $p < 0,001$ ). A distribuição dos genótipos entre homens e mulheres não se mostrou diferente ( $p = 0,201$ ).

Tabela 1 - Distribuição alélica e genotípica do SNP 66A>G do gene da MTRR, segundo o gênero e a cor da pele autorreferida, numa amostra de 3.814 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas-RS.

Grupos	n	Alelo A	Alelo G	Genótipo AA	Genótipo AG	Genótipo GG	Valor p
<b>Gênero</b>							
Feminino	1901	0,55	0,45	31,1% (n=590)	48,9% (n=930)	20,0% (n=381)	0,201
Masculino	1913	0,54	0,46	29,3% (n=561)	48,4% (n=926)	22,3% (n=426)	
<b>Cor da pele</b>							
Branca	2851	0,52	0,48	27,5% (n=784)	48,7% (n=1388)	23,8% (n=679)	<0,001
Preta	830	0,64	0,36	39,3% (n=326)	48,9% (n=406)	11,8% (n=98)	
Outra	133	0,54	0,46	30,8% (n=41)	46,6% (n=62)	22,6% (n=30)	

n = número amostral.

A distribuição dos níveis de Hcy em relação ao gênero e a cor da pele autorreferida são apresentados na Tab. 2. A diferença significativa entre os níveis de Hcy observada entre homens e mulheres ( $p < 0,001$ ) é um dado anteriormente publicado pelo grupo Gigante e colaboradores (2011). Os níveis de Hcy não se apresentaram diferente quando a população estudada foi estratificada por cor da pele autorreferida ( $p = 0,231$ ).

Tabela 2 - Distribuição dos níveis de homocisteína, segundo o gênero e a cor da pele autorreferida, numa amostra de 3.821 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas – RS.

Grupos	n	Média ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	IC	dp	Valor p
<b>Genêro</b>					
Feminino	1905	7,39	[7,2-7,5]	$\pm 2,32$	<0,001
Masculino	1916	9,50	[9,4-9,6]	$\pm 3,71$	
<b>Cor da pele</b>					
Branca	2856	8,40	[8,3-8,5]	$\pm 3,07$	0,231
Preta	831	8,60	[8,3-8,9]	$\pm 4,12$	
Outra	134	8,66	[8,1-9,2]	$\pm 3,05$	

n = número amostral, IC = intervalo de confiança, dp = desvio padrão.

Os participantes da coorte com diferentes genótipos para o SNP 66A>G não apresentaram níveis diferentes de Hcy ( $p = 0,417$ ) (Tab. 3).

Tabela 3 - Distribuição dos níveis de homocisteína segundo os genótipos do SNP 66A>G do gene da MTRR numa amostra de 3.805 indivíduos da coorte de 1982, Pelotas-RS.

Genótipo	n	Média ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	IC	dp	Valor p
AA	1147	8,34	[8,1-8,5]	$\pm 3,43$	0,417
AG	1853	8,51	[8,3-8,7]	$\pm 3,41$	
GG	805	8,46	[8,2-8,7]	$\pm 2,98$	

n = número amostral, IC = intervalo de confiança, dp = desvio padrão.

## 6 Discussão

A descrição das frequências alélicas e genotípicas do SNP 66A>G do gene da MTRR em indivíduos pertencentes à coorte de nascimentos de 1982, relatadas no presente estudo, contribuíram para a caracterização genética desta população. O conhecimento do *background* genético de uma população é um importante passo para o estudo das interações gene-ambiente, as quais podem estar envolvidas nos mecanismos que fundamentam as doenças.

De acordo com os dados depositados no banco de SNPs do National Center for Biotechnology Information-USA (NCBI Entrez SNP rs 1801394) pelo projeto HapMap, a frequência alélica para americanos descendentes de caucasianos europeus (HapMapCEU) é de 0,55 para o alelo A e de 0,45 para o alelo G, enquanto que para indivíduos africanos sub-saharianos (HapMapYRI) é de 0,77 para o alelo A e 0,23 para o alelo G.

Na população estudada, o alelo MTRR 66G foi descrito como o alelo de menor frequência, tendo sido encontrada uma distribuição A/G de 0,55/0,45. Quando, porém, os indivíduos foram estratificados por cor da pele autorreferida, foi observada uma distribuição de 0,52/0,48 entre os de cor branca e de 0,64/0,36 entre os de cor preta, indicando uma diferença na distribuição alélica influenciada pela cor da pele. É sabido que a população brasileira é descendente de caucasianos europeus, africanos e ameríndios, existindo uma variação dessa proporção entre as diferentes regiões do Brasil (PENA et al., 2011). A população em estudo é composta principalmente por descendentes de colonos europeus (portugueses, espanhóis e alemães), ameríndios e africanos (VICTORA; BARROS, 2006). Frente ao exposto, seria interessante, realizar a investigação de marcadores genéticos de ancestralidade, a fim de melhor caracterizar a real contribuição de cada alelo na população estudada.

No presente estudo não foi demonstrada uma associação do SNP MTRR 66A>G com os níveis de Hcy. Resultado semelhante é observado na literatura em relação a estudos de caso-controle.

Botto e colaboradores (2003) investigaram a associação de alguns polimorfismos da rota homocisteína-folato, entre eles o SNP MTRR 66A>G, com níveis de Hcy, folato e vitamina B12, além de danos ao DNA, em uma amostra de 68 pacientes submetidos à angiografia coronariana. Nesta amostra, 51 pacientes



apresentavam doença arterial coronária (DAC). Em relação ao SNP MTRR 66A>G os autores não encontraram diferenças nos níveis de Hcy entre os genótipos estudados. Além disso, os genótipos não foram associados ao risco de desenvolvimento de DAC.

De forma similar, Wilson e colaboradores (1999) realizaram um estudo de caso-controle com pacientes portadores de espinha bífida, uma malformação congênita, onde relataram que os níveis de Hcy não eram associados ao SNP 66A>G do gene da MTRR. Porém tais autores apontaram para um aumento no risco de nascimentos de crianças com defeitos do tubo neural quando o SNP MTRR 66A>G estava associado com baixa concentração de cobalamina, ou na presença do genótipo MTHFR mutante.

Em outro estudo, foi relatado que os genótipos AG e GG do SNP MTRR 66A>G eram significativamente maiores em mães de crianças com Síndrome de Down em comparação ao grupo controle, porém também não foi encontrada uma associação do polimorfismo com os níveis de Hcy (LEARY et al., 2002).

Por outro lado, Gaughan e colaboradores (2001) realizaram um estudo com 601 homens norte-irlandeses, entre 30-49 anos, e revelaram que o genótipo 66AA contribuiu para um aumento moderado nos níveis de Hcy. Da mesma forma, Rodriguez e colaboradores (2005) relataram que o genótipo 66AA estava presente em casos de Hhcy e em pacientes com DAC. Os autores concluíram que o genótipo MTRR 66AA é um determinante genético de Hhcy moderada associada a DAC na população francesa estudada.

Cabe salientar que as dosagens de Hcy da coorte de 82 foram realizadas no ano de 2004-2005, quando os participantes estavam com a idade de 22 anos. É de conhecimento comum que os níveis de Hcy são influenciados por diferentes fatores, entre eles, a idade.

Em um estudo com 1.960 homens e mulheres em jejum entre 28-82 anos de idade, foi demonstrado que os níveis totais de Hcy têm um aumento de 23% em pessoas com idade igual ou superior a 65 anos, em comparação com aquelas com idade de 45 anos ou menos (JACQUES et al., 2001). Aumentos de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  na concentração de Hcy foram observados a cada década entre 40 e 70 anos (SELHUB et al., 1999b). Outro estudo realizado com 399 adultos os autores não encontraram associação entre idade e concentrações de Hcy, provavelmente porque a população era muito jovem, ou seja, entre 20-40 anos de idade (SCHUMACHER et al., 2005).

Esse ponto se assemelha à população relatada no nosso estudo. Deve-se levar ainda em consideração alterações na função renal, deficiência de vitaminas (AMORIM et al., 2011) e a atividade diminuída das enzimas envolvidas no metabolismo da Hcy com o avançar da idade (SELHUB et al., 1993).

É importante ter em mente que, a contribuição de SNPs à suscetibilidade a doenças crônicas é pequena. Além disso, o fato deste polimorfismo ter sido associado a níveis de homocisteína em algumas populações e, não na nossa, pode ser discutido considerando as interações gene-ambiente. Populações diferentes vivem em ambientes diferentes o que pode modificar a participação de genes na determinação fenotípica.

Em conclusão, a busca por marcadores genéticos relacionados ao aumento da suscetibilidade a doenças crônicas complexas não transmissíveis visa refletir na melhora da qualidade de vida dos indivíduos e de seus familiares. Portanto, trabalhos futuros na busca de novos marcadores genéticos associados aos níveis de Hcy devem ser desenvolvidos.

## 7 Conclusão

A média de Hcy não foi diferente entre os genótipos do MTRR 66A>G: 8,34  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o genótipo AA; 8,51  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o genótipo AG e 8,46  $\mu\text{mol L}^{-1}$  o genótipo GG.

O alelo A do SNP 66A>G do gene da MTRR, na amostra estudada, foi o de maior frequência (0,55).

A distribuição genotípica do SNP 66A>G do gene da MTRR na amostra estudada, foi a seguinte: 30,2% para o genótipo AA, 48,7% para o genótipo AG e 21,1% para o genótipo GG, observando-se Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A frequência do alelo menos comum, alelo A, do SNP 66A>G do gene da MTRR, não foi diferente entre homens (0,54) e mulheres (0,55). A distribuição genotípica entre homens e mulheres foi, respectivamente, a seguinte: AA (29,3% e 31,1%); AG (48,4% e 48,9%) e GG (22,3% e 20,0%).

A frequência do alelo menos comum, alelo A, do SNP 66A>G do gene da MTRR, foi diferente entre a categoria branca (0,52), preta (0,64) e outra (0,54). A distribuição genotípica entre a categoria branca, preta e outra foi, respectivamente, a seguinte: AA (27,5%, 39,3% e 30,8%); AG (48,7%, 48,9% e 46,6%) e GG (23,8%, 11,8% e 22,6%).

## 8 Referências

- ADAIR, L. S.; POPKIN, B. M.; AKIN, J. S.; GUILKEY, D. K.; GULTIANO, S.; BORJA, J.; PEREZ, L.; KUZAWA, C. W.; MCDADE, T.; HINDIN, M. J. Cohort profile: The Cebu longitudinal health and nutrition survey. **International Journal of Epidemiology**. v. 40, n. 3, p. 619-625, 2010.
- AMES, B. N. DNA damage from micronutriente deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutation Research**. v. 475, n. 1-2, p. 7-20, 2001.
- AMORIM, F. G.; REZENDE, L. C. D.; COITINHO, L. B.; FREITAS, J. V.; SCHERR, J. A.; DETTOGNI, R. S. Bioquímica clínica da aterosclerose provocada por hiperhomocisteinemia. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 8, n. 1, p. 36-59, 2011.
- ANDRES, E.; NOUREDDINE, H. L.; NOEL, E.; KALTENBACH, G.; ABDELGHENI, M. B.; PERRIN, A. E.; DICK, M. N.; MALOISEL, F.; SCHLIENGER, J. L.; BLICKLÉ, J. F. Vitamin B 12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. **Canadian Medical Association or its Licensors**. v. 171, n. 3, p. 251-259, 2004.
- BAILEY, L.B.; GREGORY, J.F. Folate metabolism and requirements. **The Journal of Nutrition**. v. 129, n. 4, p. 779-782, 1999.
- BALUZ, K.; CARMO, M. G. T.; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 48, n. 4, p. 597-607, 2002.
- BARROS, F.; VICTORA, C.; HORTA, B.; GIGANTE, D. Metodologia do estudo da coorte de nascimentos de 1982 a 2004-5, Pelotas, RS. *Revista Saúde Pública*. v. 42, n. 2, p. 7-15, 2008.
- BOTTO, N.; ANDREASSI, M. G.; MANFREDI, S.; MASETTI, S.; COCCI, F.; COLOMBO, M.; G.; STORTI, S.; RIZZA, A.; BIAGINI, A. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. **European Journal of Human Genetics**. v. 11, n. 9, p. 671-678, 2003.

BRANDALIZE, Ana Paula Carneiro. **Análise dos fatores genéticos e ambientais relacionados ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fatores de risco para Síndrome de Down e suas malformações maiores**. 2009. 145f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

BRUSTOLIN, S.; GIUGLIANI, R.; FELIX, T. M. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, n. 1, p. 01-07, 2010.

CARDOSO, V. C.; SIMÕES, V. M. F.; BARBIERI, M. A.; SILVA, A. A. M.; BETTIOL, H.; ALVES, M. T. S. S. B.; GOLDANI, M. Z. Profile of three Brazilian birth cohort studies in Ribeirão Preto, SP and São Luís, MA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 9, p. 1165-1176, 2007.

CHIANG, P. K.; GORDON, R. K.; TAL, J.; ZENG, G. C.; DOCTOR, B. P.; PARDHASARADHI, K.; CANN, P. P. M. S-Adenosylmethionine and methylation. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 10, n. 4, p. 471-480, 1996.

CHRISTENSEN, B.; REFSUM, H.; VINTERMYR, O.; UELOND, P. M. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of nontransformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. **Journal of Cellular Physiology**. v. 146, n. 1, p. 52-62, 1997.

CLARKE, R.; COLLINS, R.; LEWINGTON, S.; DONALD, A.; ALFTHAN, G.; TUOMILEHTO, J.; ARMESEN, E.; BONNA, K.; BLACHER, J.; BOERS, G. H. J.; BOSTOM, A.; BOTS, L.; GROBBEE, D. E.; BRATTSTRÖM, L.; BRETEL, M. M. B.; HOFMAN, A. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. **American Medical Association**. v. 288, n. 16, p. 2023-2042, 2002.

CUI, L. H.; SHIN, M. H.; KWEON, S. S.; KIM, H. N.; SONG, H. R.; PIAO, J. M.; CHOI, J. S.; SHIM, H. J.; HWANG J. E.; KIM, H. R.; PARK Y. K.; KIM, S. H. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with gastric and colorectal cancer in a Korean population. **BioMed Central Cancer**. v. 10, n. 236, p. 1-8, 2010.

DUDMAN, N. P. B. An alternative view of homocysteine. **Lancet**. v. 354, n. 9195, p. 2072-2074, 1999.

DUTHIE, S. J. Folic acid deficiency and câncer: mechanisms of DNA instability. **British Medical Bulletin**. v. 55, n. 3, p. 578-592, 1999.

ESKES, T. K. Folate and the fetus. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**. v. 71, n. 2, p. 105-111, 1997.

FEIX, A.; WINKELMAYER, W. C.; EBERLE, C.; SUNDER-PLASSMANN, G.; FÖDINGER, M. Methionine synthase reductase MTRR 66A>G has no effect on total homocysteine, folate, and vitamin B12 concentrations in renal transplant patients. **Atherosclerosis**. v. 174, n. 1, p. 43-48, 2004.

FÉLIX, T. M.; LEISTNER, S.; GIUGLIANI, R. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. **Birth Defects Research Part a Clinical and Molecular Teratology**. v. 70, n. 7, p. 459-463, 2004.

FRASER, A.; WALLIS, C. M.; TILLING, K.; BOYD, A.; GOLDING, J.; SMITH, G. D.; HENDERSON, J.; MACLEOD, J.; MOLLOY, L.; NESS, A.; RING, S.; NELSON, S. M.; LAWLOR, D. A. Cohort Profile: The Avon Longitudinal Study of Parents and Children: ALSPAC mothers cohort. **International Journal of Epidemiology**. v. pg. 1-14, 2012.

GAUGHAN, D. J.; KLUIJTMANS, L. A.J.; BARBAUX, S.; MCMASTER, D.; YOUNG, I. S.; YARNELL, J. W. G.; WHITEHEAD, A. S., The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. **Atherosclerosis**. v. 157, n. 2, p. 451-456, 2001.

GIGANTE, D.; OLINTO, T. M.; OLIVEIRA, I.; HORTA, B. Homocysteine levels and dietary patterns among young adults from a birth cohort in Brazil. In: World Congress of Epidemiology XIX, 2011, Edinburgo. **Anais do Journal of Epidemiology & Community Health**. v. 65, p. 247-247, 2011.

GILLHAM, B. et al. **Biochemical basis of medicine**. 3ed. Oxford: Reed Educational and professional Publishing Ltd, 1997. 590p.

GIOVANNUCCI, E.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; RIMM, E. B.; TRICHOPPULOS, D.; ROSNER, B. A.; SPEIZER, F. E.; WILLETT, W. C. Folate methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 85, n. 11, p. 875-884, 1993.

GODOY, Bibiane Armiliato. **MTRR A66G como um fator de risco para transtornos do espectro autista em uma amostra do sul do Brasil**. 2010. 17f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel no Curso de Ciências Biológicas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

GONÇALVES, L. H.; VAZ, L. S.; BUZZI, M. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico. **Arquivo de Neuropsiquiatria**. v. 63, n. 1, p. 97-103, 2005.

GORDON, N. Cerebral folate deficiency. **Developmental Medicine and Child Neurology**. v. 51, n. 3, p. 180-182, 2009.

GUDNASON, V.; STANSBIE, D.; SCOTT, J.; BOWRON, A.; NICAUD, V.; HUMPHRIES, S. C677T (thermolabile alanine/ valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. **Atherosclerosis**. v. 136, n. 2, p. 347-354, 1998.

JACQUES, P. F.; BOSTOM, A. G.; WILSON, P. W. F.; RICH, S.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Determinants of plasma total homocysteine concentration in the Framingham Offspring cohort. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, n. 3, p. 613-621, 2001

JAMES, S. J. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: beyond genetics. **American Journal of Medical Genetics**. v.127A, n.1, p. 1-4, 2004.

KANANI, P. M.; SINKEY, C. A.; BROWNING, R. L.; ALLAMAN, M.; KNAPP, H. R.; HAYNES, W. G. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. **Circulation**. v. 100, n. 11, p. 1161-1168, 1999.

KANG, S. S. Treatment of hyperhomocysteinemia: physiological basis. **The Journal of Nutrition**. v. 126, n. 4, p. 1273-1275, 1996.

KIM, Y. I.; Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 10, n. 2, p. 66-88, 1999.

LANDRIGAN, P. J.; TRASANDE, L.; THORPE, L. E.; GWYNN, C.; LIOY, P. J.; D'ALTON, M. E.; LIPKIND, H. S.; SWANSON, J.; WADHWA, P. D.; CLARK, E. B.; RAUH, V. A.; PERERA, F. P.; SUSSER, E. The National Children's Study: a 21-year prospective study of 100 000 American children. **Pediatrics**. v. 118, n. 5, p. 2173-2186, 2006.



LARAQUI, A.; ALLAMI, A.; CARRIÉ, A.; COIFFARD, A. S.; BENKOUKA, F.; BENJOUAD, A.; BENDRISS, A.; KADIRI, A.; BENNOUAR, N.; BENOMAR, A.; GUEDIRA, A.; RAISONNIER, A.; FELLATI, S.; SRAIRI, J. E.; BENOMAR, M. Influence of methionine synthase (A2756G) and methionine synthase reductase (A66G) polymorphisms on plasma homocysteine levels and relation to risk of coronary artery disease. **Acta Cardiologica**. v. 61, n. 1, p. 51-61, 2006.

LEARY, V. B.; MCDERMOTT, A. P.; MOLLOY, A. M.; KIRKE, P. N.; JOHNSON, Z.; CONLEY, M.; SCOTT, J. M.; MILLS, J. L. MTRR and MTHFR polymorphism: Link to Down syndrome? **American Journal of Medical Genetics**. v. 107, n. 2, p. 151-155, 2002.

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

LECLERC, D.; WILSON, A.; DUMAS, R.; GAFUIK, C.; SONG, D.; WATKINS, D.; HENG, H. H.; ROMMENS, J. M.; SCHERER, S. W.; ROSENBLATT, D. S.; GRAVEL, R. A. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 95, n. 6, p. 3059-3064, 1998.

LOPES, P. T.; CRUZ, O. M.; SILVA, L. P.; SANTOS, J. V.; OLIVEIRA, I. O. Dosagem de homocisteína entre homens e mulheres da coorte de indivíduos nascidos em Pelotas-RS no ano de 1982. In: XIX CIC XII ENPOS II Mostra Científica, 2010, Pelotas. **Anais do XIX CIC XII ENPOS II Mostra Científica**. 2010.

LUSSIER-CANCAN, S.; XHIGNESSE, M.; PIOLOT, A. Plasma total homocysteine in health subjects: sex-specific relation with biological trials. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.1 n. 64, p. 587-93, 1996.

MAHAN, L. K. et al. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 9ed. São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1998. 1157p.

MANSOOR, M. A.; BERGMARK, C.; SVARDAL, A. M.; LONNING, P. E.; UELAND, P. M. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. Homocysteine and peripheral vascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v.15, n.2, p.232-240, 1995.

MATTHEWS, R. G. et al. **Methionine Biosynthesis**. 1ed. New York: Gruyter, 1998. 980p.

MELSE-BOONSTRA, A.; DE BREE, A.; VERHOEF, P.; BJORKE-MONSEN, A. L.; VERSCHUREN, W. M. M. Dietary monoglutamate and polyglutamate folate are associated with plasma folate concentrations in Dutch men and women aged 20-65 years. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1307-1312, 2002.

MILLER, A. S.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, pg. 1215, 1988.

MONSEN, A. L. B.; UELAND, P. M.; Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis and risk assessment from infancy to adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 78, n. 1, p. 7-21, 2003.

MORETTI, R.; TORRE, P.; ANTONELLO, R. M.; CATTARUZZA, T.; CAZZATO, G.; BAVA, A. Vitamin B12 and folate depletion in cognition: a review. **Neurology India**. v. 52, n. 3, p. 310-318, 2004.

MORRIS, M. S. Homocysteine and Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**. v. 2, n. 7, p. 425-428, 2003.

NETO, J. R. F.; CHAGAS, A. C. P. A homocisteína como fator de risco coronariano. **Atherosclerosis**. v. 1, n. 2, p. 20-25, 2001.

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 40, n. 5, p. 311-320, 2004.

NURK, E.; TELL, G. S.; NYGARD, O.; REFSUM, H.; UELAND, P. M.; VOLLSET, S. E. Plasma Total Homocysteine Is Influenced by Prandial Status in Humans: The Hordaland Homocysteine Study. **The Journal of Nutrition**. v. 131, n. 4, p. 1214-1216, 2001.

OLTEANU, H.; MUNSON, T.; BANERJEE, R. Differences in the efficiency of reductive activation of methionine synthase and exogenous electron acceptors between the common polymorphic variants of human methionine synthase reductase. **Biochemistry**. v. 41, n. 45, p. 13378-13385, 2002.

OSLER, M.; ANDERSEN, A. M.; LUND, R.; BATTY, G. D.; HOUGAARD, C. O.; DAMSGAARD, M. T.; DUE, P.; HOLSTEIN, B. E. Revitalising the Metropolit 1953 Danish male birth cohort: background, aims and design. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**. v. 18, n. 5, p. 385-394, 2004.

PALOMO, I. G.; TORRES, C. U.; GUZMÁN, L. J. Hiperhomocisteinemia: fisiopatología y diagnóstico. **Revista Médica del Maule**. v. 25, n. 2, p. 57-63, 2007.

PENA, S. D. J.; DI PIETRO, G.; MORAES, M. F.; GENRO, J. P.; HUTZ, M. H.; KEHDY, F. S. G.; KOHLRAUSCH, F.; MAGNOS, A. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. R.; OJOPI, E. B.; PERINI, J. A.; RACCIOPI, C.; SANTOS, A. K. C. R.; SANTOS, F. R.; SILVA, M. A. R.; SORTICA, V. A.; KURTZ, G. S. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **Plos One**. v. 6, n. 2, 2011.

RIBEIRO, L. C. et al. **Ácido fólico: sua importância em situações fisiológicas do ciclo vital**. São Paulo: Editora de Projetos Médicos, 2002. 20p.

RICHTER, L.; NORRIS, S.; PETTIFOR, J.; YACH, D.; CAMERON, N. Cohort Profile: Mandela's children: The 1990 birth to twenty study in South Africa. **International Journal of Epidemiology**. v. 36, n. 3, p. 504-511, 2007.

RODRIGUEZ, R. M. G.; JUILLIÈRE, Y.; CANDITO, M.; ADJALLAL, C. E.; GIBELIN, P.; HERBETH, B.; OBBERGHEN, E. V.; GUÉANT, J. L. Association of MTRR A66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTR A2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population.

**Thrombosis and Haemostasis.** v. 94, n. 3, p. 510-515, 2005.

ROTHENBERG, S. P. Increasing the dietary intake of folate: pros and cons.

**Seminars in Hematology.** v. 36, n. 1, p. 65-74, 1999.

SCHUMACHER, I. H.; ROJAS, R. M.; GUTIÉRREZ, P. C.; BRENES, G. Genetic, dietary, and other lifestyle determinants of serum homocysteine levels in young adults in Costa Rica. **Pan American Journal of Public Health.** v. 17, n. 4, p. 263-270, 2005.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual Review of nutrition.** v. 19, n. 1, p. 217-246, 1999.

SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; ROGERS, G.; BOWMAN, B. A.; GUNTER, E. W.; WRIGHT, J. D.; JOHNSON, C.L. Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations. **Annals of Internal Medicine.** v. 131, n. 5, p. 331-339, 1999.

SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; WILSON, P. W.; RUSH, D.; ROSENBERG, I. H.; Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA: The Journal of The American Medical Association.** v. 270, n. 22, p. 2693-2698, 1993.

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

SISLASTE, M. L.; RANTALA, M.; SÄMPI, M.; ALFTHAN, G.; ARO, A.; KESÄNIEMI, Y. A. Polymorphisms of key enzymes in homocysteine metabolism affect diet responsiveness of plasma homocysteine in healthy women. **The Journal of Nutrition**. v. 131, n. 10, p. 2643-2647, 2001

SMITH, K.; JOSHI, H. The Millennium cohort study. **Population Trends**. v. 107, p. 30-34, 2002.

SMULDERS, Y. M.; SMITH, D. E.; KOK, R. M.; TEERLINK, T.; SWINKELS, D. W.; STEHOUWER, C. D.; JAKOBS, C. Cellular folate vitamer distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. **British Journal of Haematology**. v. 132, n. 5, p. 623-629, 2006.

SNOW, C. F. Laboratory diagnosis of vitamin B 12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. **Archives of Internal Medicine**. v. 159, n. 12, p. 1289-1298, 1999.

SOLOMON, R. Z. S.; QIAO, Y. L.; ABNET, C. C.; RATNASINGHE, D. L.; DAWSEY, S. M.; DONG, Z. W.; TAYLOR, P. R.; MARK, S. D. Esophageal and gastric cardia cancer risk and folate - and vitamin B12 - related polymorphisms in Linxian, China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 12, n. 11, p. 1222-1226, 2003.

STANGER, O.; FOWLER, B.; PIERTZIK, K.; HUEMER, M.; HASCHKE-BECHER, E.; SEMMLER, A.; LORENZL, S.; LINNEBANK, M. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. **Expert Review of Neurotherapeutics**. v. 9, n. 9, p. 1393-1412, 2009.

TADDEI-GRAVINA, C. F.; BATLOUNI, M.; SARTESCHI, C.; BALTAR, V. T.; SALVARINI, N. A. C.; BERTOLAMI, M. C.; SOUSA, J. E. M. R. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for coronary atherosclerotic diseases in the elderly. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.85, n.3, p. 166-173, 2005.

VANNUCCHI, H.; MELLO, S. S. **Hiper-homocisteinemia como Fator de Risco para Doenças Cardiovasculares - Dependência Metabólica de vitaminas do Complexo B**. 1ed. Nutrição Clínica, 2007. p. 157-169.

VENÂNCIO, L. S.; BURINI, R. C.; YOSHIDA, W. B. Hiperhomocisteinemia na doença arterial periférica. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 3, n. 1, p. 31-37, 2004.

VICTORA, C. G.; BARROS, F. C. Cohort profile: The 1982 Pelotas (Brazil) birth cohort study. **International Journal of Epidemiology**. v. 35, n. 2, p. 237-242, 2006.

VICTORA, C. G.; BARROS, F. C.; LIMA, R. C.; BEHAGUE, D. P.; GONÇALVES, H.; HORTA, B. L.; GIGANTE, D. P.; VAUGHAN, J. P. The Pelotas birth cohort study, Rio Grande do Sul, Brazil, 1982-2001. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 19, n.5, p. 1241-1256, 2003.

ZAVADAKOVA, P.; SOKOLOVA, J.; KOZICH, V. Identification of novel polymorphisms and analysis of haplotypes in the methionine synthase reductase gene. **Journal of Inherited Metabolic Disease**. v. 26, 2003.

ZENG, W.; LIU, L.; TONG, Y.; LIU, H. M.; DAI, L.; MAO, M. A66G and C524T polymorphisms of the methionine synthase reductase gene are associated with congenital heart defects in the Chinese Han population. **Genetics and Molecular Research**. v. 10, n. 4, p. 2597-2605, 2011.

ZHANG, Z.; SHI, Q.; LIU, Z.; STURGIS, E. M.; SPITZ, M. R.; WEI, Q. Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. **Cancer epidemiology, biomarkers and prevention**. v. 14, n. 5, p. 1188-1193, 2005.

WEIR, D. G.; MOLLOY, A. M.; KEATING, J. N.; YOUNG, P. B.; KENNEDY, D. G.; SCOTT, J.M. Correlation of the ratio of S-adenosyl-L-methionine to S-adenosyl-L-homocysteine in the brain and cerebrospinal fluid of the pig: implications for the determination of this methylation ratio in human brain. **Clinical Science**. v. 82, n. 1, p. 93-97, 1992.

WIERZBICK, A. S. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 4, n. 2, p. 143-150, 2007.

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

YAMADA, K.; GRAVEL, R. A.; TORAYA, T.; MATTHEWS, R. G. Human methionine synthase reductase is a molecular chaperone for human methionine synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, n. 25, p. 9476-9281, 2006.

## **Anexos**



## ANEXO 1: Termo de consentimento livre e pré-informado



Universidade Federal de Pelotas  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Medicina Social

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-INFORMADO

Investigador responsável: Dr. Cesar Gomes Victora  
Departamento de Medicina Social-UFPel

Concordo em participar do estudo "Saúde dos Jovens Nascidos em Pelotas, RS, em 1982". Estou ciente de que todas as pessoas nascidas em Pelotas, em 1982, e que residam na cidade participarão voluntariamente do estudo.

**PROCEDIMENTOS:** Fui informado que será coletada uma amostra do meu sangue utilizando material estéril e descartável no procedimento de coleta. No meu sangue será medido o nível de glicose, além de ser extraído DNA das células do meu sangue. O DNA e o sangue serão armazenados em um arquivo, devidamente cadastrados e mantidos pelo Centro de Epidemiologia da UFPel, para que no futuro possam ser analisados com o objetivo de se estudar as doenças mais comuns na nossa população. Será também verificado qual é o grupo sanguíneo do meu sangue. Fui informado que as informações referentes ao meu DNA e ao meu sangue não serão repassadas a outras pessoas sem a minha autorização.

**RISCOS E POSSÍVEIS REAÇÕES À COLETA DE SANGUE:** Fui informado de que a coleta de sangue será realizada com material descartável, portanto, sem riscos de contaminação. Também fui avisado que em algumas pessoas, pode aparecer algum hematoma que desaparecerá no prazo máximo de uma semana.

**BENEFÍCIOS:** Os resultados dos exames de glicose e tipagem sanguínea serão fornecidos por escrito logo após sua realização, ainda na minha presença.

**PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:** Como já me foi dito, minha participação nesse estudo será voluntária, e poderei interrompê-la a qualquer momento.

**DESPESAS:** Eu não terei que pagar por nenhum dos procedimentos.

**CONFIDENCIALIDADE:** Estou ciente que minha identidade permanecerá confidencial durante todas as etapas do estudo.

**CONSENTIMENTO:** Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas nesse formulário de consentimento. Os investigadores do estudo responderam a todas as minhas perguntas até minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo em participar o estudo. Este formulário de consentimento pré-informado será assinado por mim e arquivado pela instituição responsável pela pesquisa.

ASSINATURA: \_\_\_\_\_

DATA: \_\_\_/\_\_\_/2005

**DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR:** Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O jovem compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento.

ASSINATURA DO INVESTIGADOR:

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

T338d Tessmann, Josiane Weber  
Distribuição dos níveis de homocisteína em indivíduos pertencentes à Coorte de 1982, Pelotas-RS segundo os genótipos do MTRR 66A>G / Josiane Weber Tessmann; Fabiana Kömmling Seixas, orientador; Isabel Oliveira de Oliveira, co-orientador. - Pelotas, 2012. 49 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia), Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1. Homocisteína. 2. Polimorfismos. 3. Metionina Sintase Redutase. 4. Estudos de Coortes. I. Seixas, Fabiana Kömmling. II. Oliveira, Isabel Oliveira de. III. Título.

CDD: 620.8