

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK

Clóvis Paniz

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK

Clóvis Paniz

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P193e	Paniz, Clovis Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK / Clóvis Paniz. -- São Paulo, 2015. 188p. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria 1. Hematologia 2. Ácido fólico 3. Alimentos fortificados I.T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador. 616.15 CDD
-------	--

Clóvis Paniz

Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara
Orientadora/ Presidente

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Prof. Dr. Paulo Augusto Achucaro Silveira

Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Profa. Dra. Ana Campa

São Paulo, 27 de novembro de 2015

DEDICATÓRIA

Para Catiane e Luan, com todo
meu amor, carinho e dedicação

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer profundamente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do apoio financeiro que permitiu a realização deste estudo (**Processo 2012/12912-1**).

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo (FCF/ USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À minha orientadora Professora Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pelo exemplo de dedicação e paixão pela ciência, por todo o incentivo, pela amizade e o carinho nestes anos de convívio quase diário. E também, por todo o aprendizado científico e profissional neste período.

Ao diretor do Laboratório de análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, Elehú Moura de Oliveira, pela amizade, pela compreensão e por toda a ajuda com os processos de afastamento do meu trabalho durante esse período.

Ao professor Dr. José Édson Paz da Silva, por todo o incentivo inicial e motivação para a busca desse sonho.

À professora Dra. Ana Campa pela disponibilização de equipamentos e de seu laboratório para que parte importante desse projeto fosse desenvolvido.

À professora Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata, à professora Dra. Primavera Borelli e ao Professor Dr. Ricardo Fock, pela disponibilização de equipamentos e dos seus laboratórios para nossas análises.

À professora Dra. Ana Paula Loureiro e pela disponibilização de equipamentos e de seu laboratório e ao Dr. Tiago Franco de Oliveira pela ajuda com as análises de metilação.

À professora Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos e sua equipe pelo apoio com as determinações dos perfis de hemoglobina.

Aos professores Dra. Maria Stella Figueiredo, Dr. Rodolfo Cançado, Dra. Vera Blaia D'Avila e Dr. Marcelo Cliquet pela ajuda com a inclusão de pacientes.

Aos professores Dra. Maria de Fátima Sonati e Dr. Magnus Nueldo Nunes dos Santos, pela ajuda com a inclusão de pacientes e com a genotipagem de β -talassêmicos.

Ao professor Dr. Ralph Green da Universidade da Califórnia/Davies e Dra. Christine Pfeiffer e sua equipe do *Centers for Disease Control and Prevention* da Georgia pelo apoio com as análises de ácido fólico não metabolizado e formas de folato.

A Dra. Cecilia Zanin Palchetti, e a equipe da professora Dra. Dirce Marchioni pelas análises do consumo alimentar utilizando o Programa NSDR.

À farmacêutica Renata Chaves Albuquerque por toda a sua fundamental ajuda com a parte de citometria e por toda a sua disponibilidade e paciência, o que facilitou muito as análises.

A equipe do Laboratório de Bioquímica Clínica (Silene, Alexandre, Luziane, Franciele, Maryana, Edson e Renan) por todo o apoio de bancada e por todo o carinho com que sempre me acolheram.

À todos funcionários da Faculdade Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo carinho e colaboração, dando condições para realização deste projeto de pesquisa.

Aos pacientes e participantes do estudo que de forma anônima contribuíram para a realização deste estudo

A todos os meus colegas do LAC/HUSM por terem apoiado o meu afastamento e por sempre me incentivarem com palavras e com atitudes desde os tempos de estagiário e bolsista até os dias de hoje. Vocês são a minha outra família.

Aos amigos e colegas Renata Soccac, Iara Bertoncello e Miguel Rohers pelo apoio emocional, pelos conselhos e pelo encorajamento.

Ao meu amigo e colega José Antônio Mainardi de Carvalho, por todo o apoio nestes anos, pela compreensão e por todos os conselhos, as discussões, as motivações, incentivos e por todo o suporte no serviço do LAC/HUSM para que eu pudesse estar ausente.

Aos meus amigos Cristiano Ragagnin de Menezes e Leandro Maziero pelo apoio emocional e incentivo durante esse período.

Aos amigos André Bairros, Aramys dos Reis, Fabrício Dalmas e João Gobo por todo o apoio na chegada a São Paulo e por toda a amizade e companheirismo.

Ao meu amigo Alexandre Marchi por toda a parceria, paciência, amizade e compreensão. Obrigado por aguentar meus constantes lamentos, minha falta de tempo e minha desorganização doméstica.

Ao Juliano Bertinato, pela amizade diferenciada, por dividir alegrias e desilusões, por toda a paciência, a motivação, o suporte emocional, os ensinamentos, a disponibilidade a qualquer momento, por todo o apoio desde o primeiro até o último dia dessa tese. Nossa parceria foi fundamental pra este trabalho. Serei eternamente grato por tudo o que você fez. Obrigado por tudo irmão.

À Maylla Rodrigues Lucena, parceira de projeto, coletas, análises, risadas, choros, estresses e ensinamentos. Sem a tua energia, tua positividade e teu humor essa tese teria sido muito mais difícil.

À Luciene Terezina de Lima, Daniela Nunes, Guilherme Wataru pelos primeiros treinamentos na USP, por todo o suporte emocional, pela amizade, pelos ensinamentos e pela paciência.

À Patrícia Amorim, pela amizade, ensinamentos, paciência e ajuda com as análises de folato e ao Eduardo De Carli pela parceria e ajuda com as coletas de dados e avaliação nutricional.

A todos meus colegas de Laboratório de Hematologia com quem tive o prazer de conviver nesse período: Douglas Vivona, Carol Tosin, Malu Bertanha, Tamara Jorge, Celina Yassui, Gabriel Nakata, Stephanie Guassi, Grazielle Lima, Priscilla Lynn, Robson Lázaro, Kelma Cordeiro.

A todos da minha família amada, em especial meus queridos pais Antônio e Gema, sogros, irmãos, cunhados, tias, sobrinhos, etc, por todo apoio e incentivo que me permitiram ir além das minhas limitações e também por todas as suas constantes orações, torcidas e boas energias.

À Keitiane, pelo suporte logístico com o Luan durante minha ausência de casa.

Aos meus amados Catiane e Luan, por toda a compreensão e paciência nestes anos difíceis. Obrigado por terem embarcado nesse sonho e terem suportado os tantos momentos de distâncias e de ausências. Passar estes anos longe de casa foi uma experiência difícil, mas agradeço muito por terem compreendido e por estarem sempre me apoiando. Tudo é mais fácil com vocês por perto. Amo muito vocês.

A Deus e aos anjos que me guiam, pela proteção constante e por colocar sempre tantas pessoas boas no meu caminho.

RESUMO

PANIZ, C. Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Com o início da fortificação de farinhas com ácido fólico (AF) no Brasil, a partir 2004, a população passou a estar exposta de modo compulsório a maiores quantidades desta vitamina. Sabe-se que o AF na sua forma sintética pode não ser completamente convertido para formas metabolicamente ativas, levando ao aparecimento de uma fração não metabolizada no organismo. Este fato é mais preocupante nos indivíduos que além da fortificação, fazem uso terapêutico dessa vitamina, como em pacientes com anemias hemolíticas (esferocitose hereditária (EH), β -talassemia heterozigótica (β -TH), entre outras). O objetivo desse estudo foi avaliar se as concentrações séricas de AF não metabolizado (UMFA) afetam a metilação global do DNA; a expressão de RNAm de genes da DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina (IL)-8; e a citotoxicidade de células NK. Foram incluídos 27 pacientes com EH, 50 indivíduos com β -talassemia heterozigótica (β -TH) e 136 indivíduos saudáveis. Outros 30 indivíduos saudáveis foram incluídos num estudo de intervenção com 5mg/dia de AF durante 90 dias. Foram realizadas as análises de: ácido fólico sérico, eritrocitário e UMFA, vitamina B₁₂, homocisteína total; expressões de RNAm dos genes de MTHFR, DHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8; citotoxicidade das células NK; metilação global do DNA e citocinas séricas IL6, IL-8, IL10, IFN- γ e TNF- α . Resultados: Os pacientes EH apresentaram maiores concentrações de AF (sérico, eritrocitário e UMFA) que seus controles, sendo que 55,5% (método microbiológico) e 74,1% (método LC-MS/MS) apresentaram concentrações suprafisiológicas da vitamina, e 74,1% apresentaram concentrações aumentadas de UMFA. No grupo β -TH foi observado maiores concentrações de folato eritrocitário comparado ao controle e 22% dos indivíduos tinham concentrações suprafisiológicas de AF. No estudo de intervenção, após 45 e 90 dias de uso de AF as concentrações suprafisiológicas estavam presentes em 93,3% dos indivíduos e 100% deles apresentavam concentrações aumentadas de UMFA. Não foram observadas diferenças nas taxas de metilação global do DNA entre os grupos EH e β -TH quando comparados aos seus controles e não foi verificada correlação entre metilação global e concentrações de UMFA. Tanto EH quanto β -TH apresentaram maior expressão de RNAm de IL-8, quando comparados aos seus controles. No grupo de intervenção houve maior expressão de IL-8 após 45 dias de uso de AF quando comparado ao período pré-intervenção. Foi mostrada uma correlação inversa entre as concentrações de folato eritrocitário com o número de células NK no grupo EH e com a capacidade citotóxica das células NK no grupo total (EH + controle). No grupo intervenção foi observado menor número e menor capacidade citotóxica das células NK após 90 dias de uso de AF. Conclusões: O uso de AF 5mg/dia foi associado com aumento expressivo das concentrações de folato sérico, eritrocitário, UMFA, na expressão de RNAm de genes da citocina inflamatória IL-8 e redução do número e da citotoxicidade das células NK. Dessa forma, altas doses de AF podem resultar em alterações de componentes do sistema imune

podendo prejudicar os mecanismos de vigilância celular das células NK. Os nossos achados sugerem que é importante o acompanhamento terapêutico dos pacientes que fazem uso de AF, especialmente aqueles indivíduos que fazem uso crônico desta vitamina por longo tempo, como os pacientes com anemias hemolíticas, mulheres que desejam engravidar e gestantes.

Palavras-chave: ácido fólico não metabolizado, fortificação compulsória de farinhas, metilação do DNA, expressão de RNAm, citotoxicidade de células NK.

ABSTRACT

PANIZ, C. **Effects of unmetabolized folic acid on global DNA methylation, on mRNA expression of *DHFR*, *MTHFR*, *interferon- γ* , *TNF- α* and *interleukin-8* genes, and on NK cells cytotoxicity.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2015

With the beginning of the fortification of flour with folic acid (FA) in Brazil, since 2004, the population has been exposed compulsorily to larger amounts of this vitamin. It is known that FA in its synthetic form can not be completely converted to metabolically active forms, leading to the appearance of an unmetabolized fraction in the body. This fact is more worrying in subjects beyond fortification, make therapeutic use of this vitamin, such as patients with hemolytic anemia (hereditary spherocytosis (HS), β -thalassemia heterozygotic (β -TH), among others). The aim of this study was to evaluate if serum concentrations of unmetabolized FA (UMFA) affect the global DNA methylation; mRNA expression of *DHFR*, *MTHFR*, *interferon- γ* , *TNF- α* and *interleukin (IL)-8* genes; and on cytotoxicity of NK cells. It was included 27 patients EH, 50 subjects β -TH and 136 healthy subjects. Another 30 healthy subjects were included in an intervention study with 5 mg/FA daily during 90 days. Analyzes performed were: serum and erythrocyte folate, and UMFA, vitamin B₁₂, tHcy; mRNA expression of *MTHFR*, *DHFR*, *IFN- γ* , *TNF- α* and *IL-8* genes; cytotoxicity of NK cells; global DNA methylation and serum cytokines IL6, IL-8, IL10, *IFN- γ* and *TNF- α* . Results: EH patients presented higher FA concentrations (serum, erythrocytes and UMFA) than controls ones, and 55.5% (microbiologic method) and 74.1% (LC-MS/MS method) showed supraphysiologic concentrations of vitamin, and 74.1% presented increased concentrations of UMFA. In β -TH group, it was observed higher erythrocyte folate concentrations compared with the control and 22% of subjects had supraphysiological concentrations of FA. In the intervention study, after 45 and 90 days of FA use, supraphysiological concentrations were present in 93.3% of subjects and 100% of them showed increased concentrations of UMFA. It was not observed differences in global methylation of DNA between EH and β -TH groups when compared to their controls and it was not observed significant correlation between global DNA methylation and UMFA levels. Both EH and β -TH showed higher mRNA expression of *IL-8* gene, when compared to controls. In the intervention group, there was higher mRNA expression of *IL-8* gene after 45 days of FA use when compared to pre-intervention period. It was demonstrated an inverse correlation between erythrocyte folate levels and the number of NK cells in EH group; and cytotoxic capacity of NK cells on total group (EH + control). In intervention group, it was observed fewer number and lower cytotoxic capacity of NK cells after 90 days of AF use. Conclusions: The use of AF 5mg daily was associated with a significant increase in serum and erythrocytes folate levels, accompanied by increase in UMFA levels, an increase in mRNA expression of *IL-8* gene, and reduction of the number and the cytotoxicity capacity of NK cells. Thus, high doses of AF can result in modifications of the immune system components, which may damage the cell surveillance mechanisms of NK cells. Our findings suggest that is important the therapeutic follow up of patients that are using AF, especially those subjects with chronic use of this vitamin, such as patients with hemolytic anemia, women who wish to become pregnant and pregnant women.

Key-words: unmetabolized folic acid, mandatory flour fortification, DNA methylation, mRNA expression, cytotoxicity of NK cells.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais dos pacientes com esferocitose hereditária e seus controles	67
Tabela 2. Concentrações das vitaminas e de homocisteína total nos grupos esferocitose hereditária e controles	69
Tabela 3. Correlações de Spearman entre os valores de folato sérico determinados pelo método microbiológico e folato sérico total e suas formas determinados por LC-MS/MS ...	71
Tabela 4. Consumo alimentar de pacientes com esferocitose hereditária e seus controles	74
Tabela 5. Valores hematológicos e bioquímicos dos pacientes com esferocitose hereditária e seus controles	75
Tabela 6. Concentrações séricas de marcadores de processo inflamatório dos pacientes com esferocitose hereditária e seus controles	76
Tabela 7. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln do número de células de NK nos grupos de pacientes com EH, em seus controles e no grupo total	77
Tabela 8. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln da atividade lítica das células NK nos grupos de pacientes com EH, em seus controles e no grupo total	78
Tabela 9. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln da capacidade citotóxica das células de NK nos grupos de pacientes com EH, em seus controles e no grupo total	79
Tabela 10. Regressão Logística multivariada para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” para grupo esferocitose hereditária e seus controles	82
Tabela 11. Correlação de Spearman entre os valores das expressões dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 no grupo esferocitose hereditária	84
Tabela 12. Correlação de Spearman entre os valores das expressões dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 no grupo controle	85
Tabela 13. Características gerais dos pacientes com β -talassemia heterozigótica e seus controles	86
Tabela 14. Frequências de alterações moleculares encontradas nos indivíduos com β -talassemia heterozigótica (n=50)	87
Tabela 15. Concentrações das vitaminas e de homocisteína total no grupo β -talassêmicos heterozigotos e no grupo controle	88
Tabela 16. Consumo alimentar de pacientes com β -talassemia heterozigótica e seus controles	89

Tabela 17. Valores hematológicos e bioquímicos dos pacientes com β -talassemia heterozigótica e em seus controles	90
Tabela 18. Concentrações de marcadores de processo inflamatório nos indivíduos β -talassêmicos heterozigotos e seus controles	91
Tabela 19. Modelos de regressão linear univariada para o Ln do número de células de NK nos grupos de indivíduos com β -TH, em seus controles e no grupo total	93
Tabela 20. Modelos de regressão linear univariada para o Ln da atividade lítica das células NK nos grupos de indivíduos com β -TH, em seus controles e no grupo total	93
Tabela 21. Modelos de regressão linear univariada para o Ln da citotoxicidade das células NK nos grupos de indivíduos com β -TH, em seus controles e no grupo total	94
Tabela 22. Regressão Logística multivariada para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” para grupo β -TH e em seus controles	97
Tabela 23. Regressão Logística multivariada para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” para grupo β -TH e em seus controles	97
Tabela 24. Correlação de Spearman entre os valores das expressões dos RNAm de genes do ciclo do folato (<i>DHFR</i> e <i>MTHFR</i>) e de citocinas inflamatórias (<i>IL-8</i> , <i>IFN-γ</i> e <i>TNF-α</i>) no grupo β -talassemia heterozigótica	99
Tabela 25. Correlação de Spearman entre os valores das expressões de RNAm dos genes do ciclo do folato (<i>DHFR</i> e <i>MTHFR</i>) e de citocinas inflamatórias (<i>IL-8</i> , <i>IFN-γ</i> e <i>TNF-α</i>) no grupo controle	100
Tabela 26. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da <i>DHFR</i> nos grupos β -TH, controle e no grupo total ..	101
Tabela 27. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da <i>IFN-γ</i> nos grupos β -TH, controle e no grupo total ...	101
Tabela 28. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da <i>MTHFR</i> nos grupos β -TH, controle e no grupo total ..	102
Tabela 29. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da <i>TNF-α</i> nos grupos β -TH, controle e no grupo total ...	103
Tabela 30. Comparação entre variáveis hematológicas, bioquímicas, marcadores de processo inflamatório e expressões de RNAm entre os indivíduos com β -talassemia heterozigótica segundo as concentrações de folato sérico	104
Tabela 31. Características gerais dos 30 indivíduos saudáveis incluídos no estudo intervenção com 5mg/dia de ácido fólico	105
Tabela 32. Concentrações das vitaminas e de homocisteína total em 30 indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico	106
Tabela 33. Correlações de Spearman entre folato sérico determinado pelo método microbiológico e folato sérico e suas formas determinados por LC-MS/MS	109

Tabela 34. Consumo alimentar dos indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico	110
Tabela 35. Valores hematológicos e bioquímicos nos indivíduos saudáveis nos três diferentes tempos de intervenção com 5mg diária de ácido fólico	111
Tabela 36. Efeito da intervenção com 5mg/dia de ácido fólico nas concentrações de hemoglobina e folato sérico nos dois indivíduos que apresentaram leve anemia	112
Tabela 37. Concentrações de marcadores de processo inflamatório em 30 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com ácido fólico 5mg/dia	112
Tabela 38. Concentrações de folato sérico e eritrocitário, UMFA, outras formas de folato, vitamina B ₁₂ e homocisteína total em 77 indivíduos saudáveis, cujos valores de ácido fólico não metabolizado (UMFA) foram determinados	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico	23
Figura 2. Estrutura química do diidrofolato, tetraidrofolato e 5-metil-tetraidrofolato. Este último apresenta cauda tetraglutamato, uma das formas de 5-metil-tetraidrofolato encontrada na natureza e nas células de mamíferos	24
Figura 3. Esquema de absorção do folato presente naturalmente nos alimentos e do ácido fólico proveniente dos alimentos fortificados ou da terapêutica	26
Figura 4. Metabolismo do folato	27
Figura 5. Representação dos países que estavam adotando a fortificação mandatória de alimentos com ácido fólico (em cinza) em 2014	32
Figura 6. Interação das células NK com receptores de inibição e de ativação. A densidade de ligantes para estes receptores irá estabelecer se esta interação levará ou não ativação da célula NK	38
Figura 7. Representação esquemática do processo de metilação do DNA, com a conversão de citosina para metil-citosina pela ação da DNA metiltransferase (DNMT)	40
Figura 8. Exemplo de resultado da separação de população de células NK usando citometria de fluxo	56
Figura 9. Marcação das células K-562 com 3mM de DiO (perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina), no analisador FACS Canto. Observa-se marcação de 98,1% das células pelo corante e baixa taxa de lise celular basal (0,7%)	59
Figura 10. Análise do experimento de citotoxicidade, em citômetro FACS Canto, mostrando a distribuição das populações estudadas	59
Figura 11. Exemplo de cromatograma obtido na determinação da taxa de metilação do DNA, através da quantificação de 5-metildeoxicitosina (5-mdC)	61
Figura 12. Concentrações de folato sérico por método microbiológico (A), folato eritrocitário (B), folato sérico total por LC-MS/MS (C), ácido fólico não metabolizado (D) e 5-metil-tetraidrofolato (E) no grupo esferocitose hereditária (EH) e controle	70
Figura 13. Concentrações séricas de vitamina B ₁₂ (A) e plasmáticas de homocisteína total (B) no grupo esferocitose hereditária (EH) e controle	70
Figura 14. Concentrações de folato sérico por método microbiológico (A), folato eritrocitário (B), folato sérico por LC-MS/MS (C), ácido fólico não metabolizado (D) e 5-metil-tetraidrofolato (E) em pacientes com esferocitose hereditária segundo o uso terapêutico de ácido fólico no momento da coleta de sangue	72
Figura 15. Concentrações séricas de vitamina B ₁₂ (A) e plasmáticas de homocisteína total (B) no grupo esferocitose hereditária de acordo com o uso terapêutico diário ou não uso de AF	73

Figura 16. Número de células NK (A); atividade lítica das células NK (B); e capacidade citotóxica das células NK (C) em indivíduos com esferocitose hereditária (EH) e seus controles	76
Figura 17. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do Ln de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos EH e seus controles. As variáveis independentes foram o consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)	80
Figura 18. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do LN de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos EH e seus controles. As variáveis independentes foram: folato sérico, eritrocitário, ácido fólico não metabolizado (UMFA) e 5-metil-tetraidrofolato	81
Figura 19. Expressões do RNAm dos genes da DHFR (A), MTHFR (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) e IL-8 (E) nos grupos de pacientes com esferocitose hereditária (EH) e seus controles	83
Figura 20. Distribuição das concentrações de folato sérico (A) e eritrocitário (B), vitamina B12 (C) e homocisteína total (D) nos grupos β -talassemia heterozigótica e controle	88
Figura 21. Número de células NK (A); atividade lítica das células NK (B); e capacidade citotóxica das células NK (C) em indivíduos com β -talassemia heterozigótica (β -TH) e seus controles	92
Figura 22. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do Ln de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos β -TH e seus controles. As variáveis independentes foram o consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)	95
Figura 23. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do LN de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos β -TH e seus controles. As variáveis independentes foram: folato sérico, eritrocitário, ácido fólico não metabolizado (UMFA) e 5-metil-tetraidrofolato ..	96
Figura 24. Expressão do RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, IFN γ , TNF- α e IL-8 nos grupos de β -talassemia heterozigótica (β -TH) e controle	98
Figura 25. Concentrações de folato sérico (A), folato eritrocitário (B), ácido fólico não metabolizado (UMFA) (C), vitamina B ₁₂ sérica (D) e de homocisteína total plasmática (E) em indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico	107
Figura 26. Concentrações séricas de vitamina B12 (A) e de tHcy plasmática (B) em indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico	108
Figura 27. Concentrações séricas de IL-6 (A), IL-8 (B), IL-10 (C), interferon- γ (IFN- γ) (D), TNF- α (E) e proteína C reativa ultra sensível (PCR-us) (E) em indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 de intervenção com 5mg diária de ácido fólico	113
Figura 28. Número de células NK (A); atividade lítica das células NK (B); e capacidade citotóxica das células NK (C) em indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico (AF)	114

Figura 29. Expressões do RNAm dos genes de DHFR (A), MTHFR (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) e IL-8 (E) de indivíduos saudáveis, antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg diária de ácido fólico116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados com exemplos de reduções observadas na incidência de DFTN em alguns países incluindo o Brasil, após o período de fortificação de farinhas com AF	33
Quadro 2. Variações nos parâmetros laboratoriais conforme o quadro clínico da esferocitose hereditária	43
Quadro 3. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação de regiões do cluster β : localização referente ao cluster β no cromossomo 11 (ID: U01317)	52
Quadro 4. Características dos ensaios <i>Taqman</i> ® empregados para avaliação da expressão dos genes <i>DHFR</i> , <i>MTHFR</i> , <i>IFN-γ</i> , <i>TNF-α</i> e <i>IL-8</i>	53
Quadro 5. Características dos ensaios <i>Taqman</i> ® empregados para avaliação da expressão dos genes de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real	54
Quadro 6. Esquema de preparação das proporções células efectoras/ células alvo, para o ensaio de citotoxicidade das células NK	57
Quadro 7. Esquema de preparação dos controles para o ensaio de citotoxicidade das células NK	58
Quadro 8. Resumo dos principais achados do estudo no Grupo Esferocitose Hereditária (EH)	119
Quadro 9. Resumo dos principais achados do estudo no Grupo β -talassemia heterozigótica (β -TH)	120
Quadro 10. Resumo dos principais achados do estudo de intervenção diária com 5mg de AF durante 90 dias	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF – ácido fólico

β -TH - β -talassemia heterozigótica

BSA – albumina de soro bovino

CHCM – concentração hemoglobínica corpuscular média

CMSP – células mononucleares do sangue periférico

DEPC – dietilpirocarbonato

DFE – equivalente de folato dietético

DFTN – defeitos de formação do tubo neural

DHF – diidrofolato

DHFR – diidrofolato redutase

DiO - perclorato de 3,3' -dioctadeciloxacarboianina

EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético

EH – esferocitose hereditária

FR – receptor de folato

GCPII– glutamato carboxipeptidase II

HbA2 – hemoglobina A2

HbF – hemoglobina fetal

HCM – hemoglobina corpuscular média

IC – intervalo de confiança

IFN- γ – interferon- γ

IL – interleucina

IMC – índice de massa corporal

K-562 – células de linhagem de eritroleucemia

LC-MS/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LDH – lactato desidrogenase

MMA – ácido metilmalônico

MSM – *multiple source method*

MTHFR – metilenotetraidrofolato redutase

NDSR – *Nutrition Data System for Research*

PBS – tampão fosfato-salino

PCFT – transportador de folato próton acoplado

PCR-us – proteína C reativa ultrasensível

PI – iodeto de propídio

QFA – questionário de frequência alimentar

QPA – questionário de propensão alimentar

R24h – recordatório alimentar de 24 horas

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RDW – *Red cell Distribution Width*, índice que quantifica a intensidade de anisocitose

RFC1 – carreador de folato reduzido

SAH – s-adenosilhomocisteína

SAM – S-adenosilmetionina

SFB – soro fetal bovino

tHcy – homocisteína total

THF – tetraidrofolato

TNF – fator de necrose tumoral

UL15% - unidade lítica 15%

UMFA – ácido fólico não metabolizado (*unmetabolized folic acid*)

VCM – volume corpuscular médio

5-mdC – 5-metil-2' -desoxicitidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Absorção e metabolismo	25
1.2 Deficiência de folato	29
1.3 Fortificação de farinhas com ácido fólico	32
1.4 Uso terapêutico de ácido fólico.....	34
1.5 Sobrecarga de ácido fólico	34
1.6 Ácido fólico, células NK e componente inflamatório.....	37
1.7 Metilação do DNA	40
1.8 Esferocitose hereditária.....	42
1.9 β -Talassemia heterozigótica	43
2 OBJETIVO GERAL.....	46
2.1 Objetivos Específicos	46
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	47
3.1 Casuística	47
3.1.1 Pacientes com esferocitose hereditária.....	47
3.1.2 Indivíduos com β -talassemia heterozigótica.....	47
3.1.3 Indivíduos saudáveis (controles).....	47
3.1.4 Indivíduos saudáveis (estudo prospectivo com intervenção com 5mg dia de ácido fólico).....	48
3.1.5 Aspectos Éticos	48
3.2 Métodos	49
3.2.1 Amostras Biológicas	49
3.2.2 Determinação do hemograma e número de reticulócitos	49
3.2.3 Concentração de proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) e de lactato desidrogenase (LDH).....	49
3.2.4 Determinação das concentrações de folato sérico e eritrocitário.....	50
3.2.5 Determinação das formas de folato por LC-MS/MS	50
3.2.6 Determinação de vitamina B ₁₂	51
3.2.7 Determinação de homocisteína total -tHcy.....	51
3.2.8 Determinação de hemoglobina fetal (Hb F) e hemoglobina A2 (Hb A2)	51
3.2.9 Determinação das concentrações séricas das citocinas inflamatórias	51
3.2.10 Detecção das mutações da β -Talassemia heterozigótica por PCR e Sequenciamento.....	51
3.2.11 Isolamento de leucócitos mononucleares.....	52

3.2.12	Extração de RNA total.....	52
3.2.13	Síntese de DNA complementar.....	53
3.2.14	Determinação de expressão de RNAm.....	53
3.2.15	Escolha dos genes de referência.....	54
3.2.16	Avaliação da citotoxicidade de células NK.....	55
3.2.17	Extração de DNA.....	60
3.2.18	Avaliação da taxa de metilação global do DNA.....	60
3.2.19	Avaliação antropométrica.....	62
3.2.20	Avaliação do consumo alimentar.....	62
3.2.21	Caracterização geral dos indivíduos estudados.....	63
3.2.22	Análises Estatísticas.....	63
4	RESULTADOS.....	66
4.1	Estudo dos 27 pacientes com esferocitose hereditária e seus 54 controles.....	67
4.2	Estudo dos 50 indivíduos com β -talassemia heterozigótica e seus 100 controles.....	86
4.3	Estudo com 30 indivíduos saudáveis submetidos à intervenção com 5mg/dia de ácido fólico.....	105
4.4	Somente indivíduos saudáveis cujos valores de ácido fólico não metabolizado foram determinados.....	117
5	DISCUSSÃO.....	123
6	CONCLUSÕES.....	135
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136
	APÊNDICES.....	153
	ANEXOS.....	173

1 INTRODUÇÃO

O folato, também conhecido como vitamina B₉, é uma vitamina hidrossolúvel encontrada naturalmente em vegetais de folhas verdes, legumes, frutas cítricas, fígado e outras carnes (Kim, 2007). Esta vitamina foi chamada inicialmente de fator de Wills, em homenagem a médica inglesa que primeiro descreveu sua função no tratamento de anemia macrocítica em gestantes trabalhadoras da indústria têxtil de Bombaim, na década de 30 (Hoffbrand e Weir, 2001). Mais tarde, em 1941, esta vitamina foi isolada das folhas do espinafre do qual deriva seu nome (do latim *folium* - folha) (Ulrich e Potter, 2006). O termo folato é usado para designar compostos com estrutura química semelhante ao ácido fólico, porém na forma de poliglutamato (com 2 a 8 resíduos de ácido glutâmico) que estão presentes naturalmente nos alimentos (Taulikar e Arulkumar, 2011).

O ácido fólico (AF) (forma monoglutamato) é a forma sintética, mais oxidada e que possui maior estabilidade, usada em suplementos vitamínicos, na terapêutica e na fortificação de alimentos (Eichholzer, Tönz e Zimmermann, 2006; Taulikar e Arulkumar, 2011; Tam, O'connor e Koren, 2012). Quimicamente, consiste de um anel de pteridina, uma molécula de ácido p-aminobenzóico e uma molécula de ácido glutâmico (também chamado de ácido pteroilglutâmico) (Kim, 2007; Green, 2010; Laanpere *et al.*, 2010) (**Figura 1**).

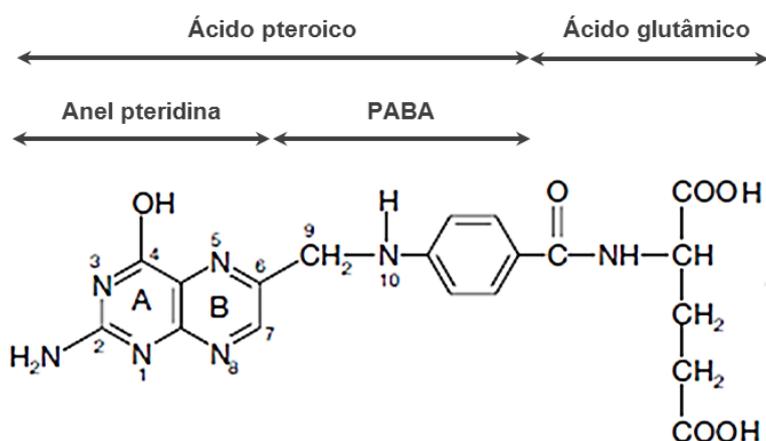


Figura 1. Estrutura química do ácido fólico

Adaptado de Zhao, Matherly e Goldman, 2009

Por outro lado, além de resíduos glutâmicos adicionais, os compostos naturais de folato apresentam-se nas formas mais reduzidas diidro e tetraidro e possuem unidades de um carbono adicionais, como metil (CH₃-), metileno (-CH₂-), formil (-CHO) e metenil (=CH-), ligados aos átomos de nitrogênio N5 e N10 (**Figura 2**) (Hoffbrand e Weir, 2001; Green, 2010; Laanpere *et al.*, 2010). Estas formas reduzidas são mais propensas à clivagem oxidativa da molécula na ligação C9-N10 produzindo dois produtos de degradação, a pteridina e o p-aminobenzoilglutamato. Estas duas moléculas, por sua vez, não apresentam atividade e não podem ser biologicamente convertidas para as formas ativas (Murphy *et al.*, 1978; Mckillop *et al.*, 2002).

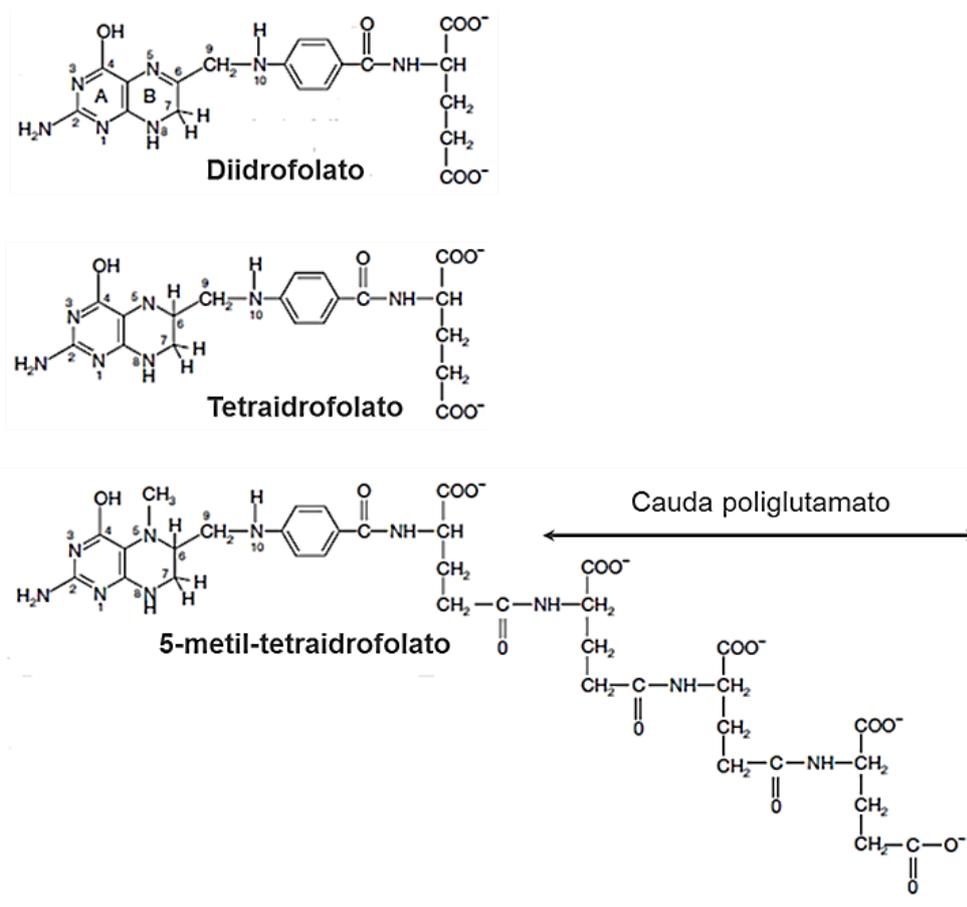


Figura 2. Estrutura química do diidrofolato, tetraidrofolato e 5-metil-tetraidrofolato. Este último apresenta cauda tetraglutamato, uma das formas de 5-metil-tetraidrofolato encontrada na natureza e nas células de mamíferos

Adaptado de Zhao, Matherly e Goldman, 2009

Desse modo, o folato de ocorrência natural é bastante instável, sofrendo rápida oxidação em baixo pH e altas temperaturas e parte importante pode ser perdida durante a cocção, estocagem, processamento e preparação dos alimentos (Institute of Medicine, 1998). Já a maior estabilidade do ácido fólico permite uma maior resistência durante o processamento e cozimento e maior facilidade de estocagem, sendo estável por meses ou mesmo anos (Institute of Medicine, 1998).

O ácido fólico possui maior biodisponibilidade que o folato de fontes naturais, sendo considerado que 0,5µg de AF equivale a 1µg de folato de fontes naturais (Institute of Medicine, 1998). Isso acontece devido à liberação parcial do folato da matriz dos alimentos; à destruição dentro do trato gastrointestinal e à hidrólise incompleta dos radicais poliglutamatos. Já o ácido fólico não requer liberação das estruturas dos alimentos; é menos suscetível à destruição dentro do lúmen gastrointestinal e já está na forma monoglutamato o que facilita a absorção (Caudill, 2010).

1.1 Absorção e metabolismo

No organismo, o principal local de absorção do folato é o intestino delgado (jejuno proximal) e sua absorção inicia-se dentro de minutos (Green, 2010). As formas poliglutamato presentes na dieta não conseguem transpor a membrana celular e precisam ser hidrolisadas à forma de monoglutamato pela enzima glutamato carboxipeptidase II (GCPII), presente nas membranas dos enterócitos (Chandler, Wang e Halsted, 1986).

Tanto o folato quanto o ácido fólico sintético entram nos enterócitos através do transportador de folato próton-acoplado (PCFT), o qual transporta formas oxidadas e reduzidas com igual eficiência e funciona em pH próximo a 6; e também através de difusão passiva (Zhao, Matherly e Goldman, 2009; Green, 2010; Laanpere *et al.*, 2010), conforme mostrado na **Figura 3**.

Após a absorção, o monoglutamato é reduzido (se necessário) e metilado, aparecendo na circulação principalmente na forma de 5-metiltetraidrofolato (5-metil-THF) (Devlin *et al.*, 2006; Kim, 2007; Green, 2010).

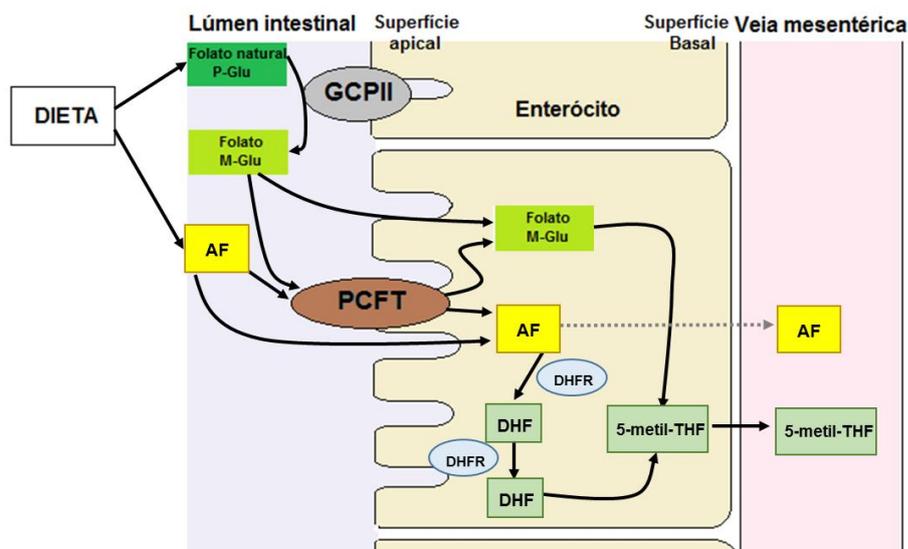


Figura 3. Esquema de absorção do folato presente naturalmente nos alimentos e do ácido fólico proveniente dos alimentos fortificados ou da terapêutica

Os poliglutamatos são convertidos à monoglutamato pela enzima GCPII. As formas monoglutamato dos alimentos e o ácido fólico sintético são absorvidos através de transportadores PCFT. O ácido fólico é convertido para THF pela diidrofolato redutase. Quando a enzima é saturada, parte do ácido fólico sintético chega a circulação sanguínea não metabolizado. AF: ácido fólico; P-Glu: poliglutamato; M-Glu: monoglutamato; GCPII: glutamato carboxipeptidase II; PCFT: transportador de folato próton-acoplado; DHF: diidrofolato; THF: tetraidrofolato; DHFR: diidrofolato redutase; 5-metil-THF: 5-metil-tetraidrofolato. Adaptado de Laanpere *et al.*, 2010

O AF deve ser reduzido a tetraidrofolato, pela enzima diidrofolato redutase (DHFR), antes da incorporação ao *pool* de folato ativo na célula (Troen *et al.*, 2006; Kalmbach, Paul e Selhub, 2011). Entretanto, quando há excesso de ingestão de AF (>200 µg), ocorre saturação da enzima DHFR, limitando a conversão para uma forma fisiologicamente ativa e levando ao aparecimento de AF não metabolizado (UMFA – *unmetabolized folic acid*) na circulação (Troen *et al.*, 2006). As concentrações plasmáticas máximas de folato são atingidas entre 1 e 2 horas após a ingestão (Green, 2010).

O folato circulante é então, transportado pra dentro das células dos tecidos periféricos através de duas famílias de transportadores: o carreador de folato reduzido (RFC1) e os receptores de folato (FR). O RFC1 funciona através de um mecanismo de troca iônica com maior afinidade pelas formas reduzidas de folato do que pelo ácido fólico, tendo como condição favorável de funcionamento o pH de 7,4. Os FR funcionam por endocitose e apresentam uma alta afinidade pelo ácido fólico (Zhao, Matherly e Goldman, 2009; Green, 2010; Laanpere *et al.*, 2010).

Embora a forma monoglutamato seja a única transportada através da membrana celular, uma vez dentro das células, ela é convertida para a forma poliglutamato pela enzima folilpoliglutamato sintase, o que permite a retenção do folato. Assim, no interior da célula, a forma poliglutamato é predominante (Kim, 2007).

Dentro da célula, o 5-metil-THF é utilizado na remetilação da homocisteína, gerando metionina e tetraidrofolato (THF), numa reação dependente de vitamina B₁₂ (coenzima), vitamina B₂ e da enzima metionina sintase. A metionina é então convertida, pela enzima metionina adenosil transferase, a S-adenosilmetionina (SAM) (Green, 2010), um doador universal de grupamentos metil, envolvida na metilação de DNA, RNA e proteínas, incluindo metilação de histonas (Selhub, 2002; Kim, 2005). Um mapa metabólico mostrando as reações em que o folato participa, bem como, as vias de entrada da porção proveniente dos alimentos e da porção sintética no pool celular é apresentado na **Figura 4**.

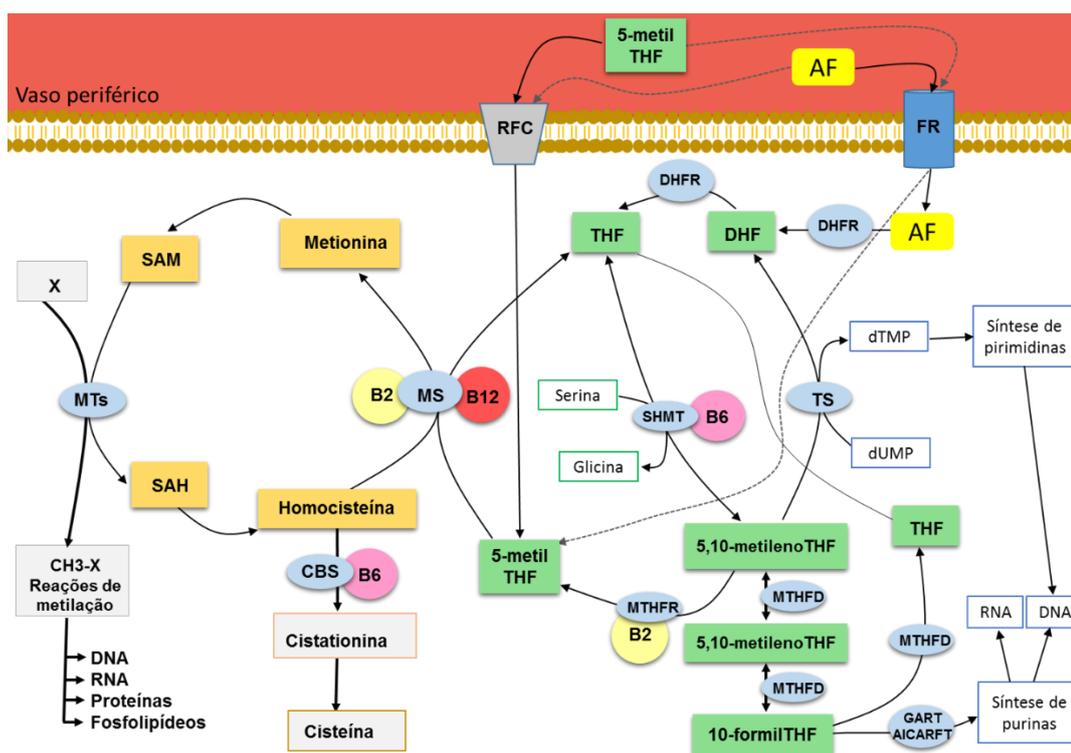


Figura 4. Metabolismo do folato

AF: ácido fólico; THF: tetraidrofolato; DHF: diidrofolato; SAM: s-adenosilmetionina; SAH: s-adenosilhomocisteína; RFC: transportador de folato reduzido; FR: receptor de folato humano; B6: vitamina B6; B12: vitamina B12; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; DHFR: diidrofolato redutase; MTHFD: metilenotetraidrofolato desidrogenase; CBS: cistationina β -sintase; MS: metionina sintase; MTs: metiltransferases; SHMT: serina metiltransferase; TS: timidilato sintetase; GART: glicinamida ribonucleotídeo transformilase; AICARFT: 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo transformilase; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP, deoxitimidina monofosfato; X: uma variedade de substratos para metilação. Adaptado de Ulrich, 2005 e Williams *et al.*, 2012

No ciclo do folato, o THF recebe um grupamento metil da serina em presença de vitamina B6 formando 5,10-metileno-THF e glicina. O 5,10-metileno-THF pode: 1) ser usado na síntese de timina (síntese do DNA), sendo convertido a DHF que posteriormente será reduzido a THF pela diidrofolato redutase (DHFR); 2) ser oxidado para formil-THF e usado na síntese de purinas, podendo ser reduzido novamente para THF por transformilases; ou 3) ser reduzido para 5-metil-THF, através da metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), e voltar para a rota da metilação da homocisteína à metionina (Ulrich, 2005; Shenkin e Baines, 2008).

É importante destacar que na remetilação da homocisteína a metionina, o 5-metil-THF é convertido a THF na dependência da vitamina B₁₂, vitamina B₂ e metionina sintase. Desse modo, a deficiência de vitamina B₁₂ impede a conversão do folato a THF, ficando o mesmo sequestrado na forma de 5-metil-THF, metabolicamente inaproveitado e não reciclado para THF (Shenkin e Baines, 2008). Sendo esta vitamina tão importante como doadora de grupo metil, sua deficiência pode comprometer diversas reações importantes para o organismo. Muitas enzimas são necessárias para o funcionamento normal do ciclo do folato. Entre estas, duas se destacam por seu papel fundamental na conversão de diversos intermediários do metabolismo do um carbono, a MTHFR e a DHFR.

A MTHFR é uma enzima regulatória no metabolismo do folato que catalisa a conversão irreversível do 5,10-metileno-THF em 5-metil-THF, usando NADPH como cofator. O 5-metil-THF será usado como doador de metil na remetilação da homocisteína para metionina (Ulrich, 2005; Devlin *et al.*, 2006). A redução de sua atividade leva à produção deficiente de 5-metil-THF interferindo na conversão de homocisteína a metionina. Um polimorfismo comum no gene da MTHFR ocorre na posição 677, com a substituição de uma citosina por uma timina, leva à redução na atividade da enzima e aumento da concentração de homocisteína plasmática (Frosst *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2004). Foi descrito que a redução na atividade da enzima MTHFR compromete também as rotas de síntese e metilação do DNA (Lee *et al.*, 2011).

A DHFR é uma enzima que converte o DHF formado durante a síntese de timidina para THF (Ulrich, 2005; Shenkin e Baines, 2008) usando NADPH como cofator. A síntese adequada de THF é necessária para a posterior geração de 5-metil-THF, dando continuidade às reações de metilação (Kalmbach, *et al.*, 2008). A

importância da DHFR na manutenção da homeostase do folato faz dela um importante alvo para as drogas citostáticas, como o metotrexato. A inibição da enzima por estas drogas limita as concentrações de THF e diminui a síntese do DNA, reduzindo, dessa forma, a proliferação celular (Banerjee *et al.*, 1995).

Esta enzima também desempenha importante atividade na conversão do AF sintético presente nos suplementos e alimentos fortificados, para a forma fisiologicamente ativa de folato, o DHF, permitindo assim, o uso desta vitamina pelas células (Kalmbach, *et al.*, 2008; Bailey e Ayling, 2009). A redução na expressão da enzima DHFR ou de sua atividade pode ter impacto importante no aproveitamento do AF sintético (Troen *et al.*, 2006), e pode ser uma causa importante de aumento do UMFA na circulação sanguínea (Smith, Kim e Refsum, 2008).

1.2 Deficiência de folato

Concentração de folato sérico inferior a 3,0ng/mL (6,8 nmol/L) é considerada deficiência de folato. No entanto, valores inferiores a 6,0 ng/mL (ou < 13,6 nmol/L) são considerados como duvidosos, ou provável deficiência de folato. Marcadores funcionais da deficiência de folato tem sido utilizados, adotando concentração sérica da vitamina <5,0 ng/mL, de homocisteína total (tHcy) >13,9 µmol/L e de ácido metilmalônico (MMA) < 271 nmol/L (Guerra-Shinohara *et al.*, 2007).

A deficiência de folato ocorre devido à baixa ingestão alimentar, ao aumento de consumo pelo organismo, à má absorção, ao aumento da excreção renal e ao alcoolismo crônico (Green, 2010; Hamid, 2012). Doenças que cursam com intensa divisão celular e renovação tecidual, como as anemias hemolíticas crônicas, as neoplasias mieloproliferativas e outras doenças malignas, além de algumas condições inflamatórias, como a doença celíaca, podem levar à deficiência de folato (Roddie e Davis, 2009). Alguns tecidos do organismo apresentam necessidades aumentadas de folato, devido às altas taxas de metabolismo, renovação e produção celulares, como a medula óssea, a pele e o intestino. A realização de diálise pode levar à perda aumentada de folato (Vannucchi e Monteiro, 2010).

Os grupos populacionais mais suscetíveis à carência de folato são as mulheres jovens em idade fértil, cujas dietas são geralmente pobres em micronutrientes e tem aumento das exigências de nutrientes durante a gravidez e lactação (Waddell, 2012;

WHO, 2015); lactentes e crianças jovens devido às exigências nutricionais pelo rápido crescimento (Waddell, 2012); idosos, devido à presença de gastrites atróficas (que afetam 20-50% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade) (Selhub *et al.*, 2000), perda de apetite, disfagias e problemas de dentição/mastigação, depressão e perdas cognitivas, fatores normalmente associados ao envelhecimento (Mudge *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2015); além de pessoas economicamente desfavorecidas, devido a dietas mais pobres em alimentos fontes de AF (García-Arias *et al.*, 2003).

Concentrações muito baixas desta vitamina levam ao aparecimento de anemia megaloblástica, caracterizada por eritrócitos macrocíticos, pancitopenia e neutrófilos hipersegmentados na circulação periférica (Malvezzi e Zago, 2001). A deficiência de folato é associada com aumento das concentrações de homocisteína e este aumento, por sua vez, é fator de risco para doença cardiovascular (Wald, Law e Morris, 2002) e acidente vascular cerebral (Casas *et al.*, 2005). Além disso, a hiperhomocisteinemia tem sido associada com demência (Boushey *et al.*, 1995; Blount *et al.*, 1997b; Kim, 2003; 2007), doença de Alzheimer (Seshadri *et al.*, 2002), e transtornos depressivos (Coppen e Bolander-Gouaille, 2005).

Durante a deficiência de folato, ocorre incorporação de uracila no lugar de timina no DNA, uma vez que o folato é necessário para a síntese desta última, o que leva à instabilidade genômica (Fenech, 2010). Também ocorrem alterações na metilação do DNA, ocasionando hipometilação de alguns genes (Pogribny *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 2007) e hipermetilação em outros (Jhaveri, Wagner e Trepel, 2001; Pogribny e James, 2002; Motiwala *et al.*, 2003). As alterações da expressão gênica e a instabilidade genômica podem aumentar o risco de câncer (Blount *et al.*, 1997a; Choi e Mason, 2002).

A deficiência de folato durante a gestação foi associada com descolamento prematuro da placenta, pré-eclâmpsia, abortos espontâneos, partos prematuros, defeitos cardíacos congênitos, baixo peso ao nascer (Molloy *et al.*, 2008) e, especialmente, com defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) (Hibbard, Hibbard e Jeffcoate, 1965; Kim, 2003; Ulrich e Potter, 2006; Kim, 2007), além de lábio leporino e fenda palatina (Bower e Stanley, 1989).

Os DFTN são as principais anomalias congênitas do sistema nervoso central, constituindo um importante problema de saúde pública em termos de mortalidade,

morbidade, custo social e sofrimento humano (Institute of Medicine, 1998; Mitchell *et al.*, 2004; Gomes, Lopes e Pinto, 2015). São causados por falhas no fechamento do tubo neural entre a 21^o e 28^o dias após a concepção. Os defeitos variam desde anencefalia, até encefalocele e espinha bífida, as quais são mais variáveis na gravidade dos efeitos (Blencowe *et al.*, 2010; Cordero *et al.*, 2015). A anencefalia é invariavelmente associada com feto natimorto, morte neonatal ou ocasionalmente, pós natal. A encefalocele e espinha bífida podem ser associadas com morte neonatal ou na infância, ou com danos graves, os quais requerem correção cirúrgica. Entretanto, muitas vezes mesmo com cirurgia, a espinha bífida é associada com mortalidade prematura e alto grau de incapacidades (Blencowe *et al.*, 2010).

No mundo, a prevalência de DFTN é estimada em mais de 300.000 novos casos por ano, com mais de 40.000 mortes e altas taxas de incapacitação (Rosenthal *et al.*, 2013). No Brasil, são escassas as publicações sobre a prevalência dos DFTN. Estima-se que esteja próximo de 1,6 casos para cada 1.000 nascimentos (Santos e Pereira, 2007; Pacheco *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado a associação entre DFTN e deficiência de folato e foi demonstrado que a suplementação com AF pode prevenir até 2/3 dos DFTN (Folic acid and neural tube defects, 1991; Blom *et al.*, 2006; Who, 2015). Por isso, é recomendado que mulheres em idade fértil que planejam engravidar ingiram 400 µg por dia de folato da dieta ou AF (Institute of Medicine, 1998; Obeid *et al.*, 2011; Jägerstad, 2012). Como a necessidade de folato para prevenir DFTN ocorre nas primeiras semanas de concepção (entre o 22^o e o 28^o dia após a concepção), é interessante iniciar a suplementação pelo menos 1 mês antes de engravidar (Nasser *et al.*, 2005). Entretanto, como muitas das gestações não são planejadas, a suplementação acaba acontecendo tarde demais e campanhas informando as mulheres sobre a necessidade de suplementação precoce com AF não tem tido êxito (Jägerstad, 2012). Especificamente no Brasil, estudos transversais demonstraram que a ingestão de folato pelas gestantes, quando avaliado o período pré-fortificação de farinhas com AF, era inadequado (Lima, Saunders e Ramalho, 2002; Azevedo e Sampaio, 2003; Fonseca *et al.*, 2003).

1.3 Fortificação de farinhas com ácido fólico

Visando reduzir a deficiência de folato e, principalmente, diminuir a incidência de DFTN, diversos países adotaram a fortificação de alimentos com o objetivo de aumentar a ingestão diária de AF pela população, principalmente pelas mulheres em idade reprodutiva (Eichholzer, Tönz e Zimmermann, 2006; Pacheco *et al.*, 2009; Jägerstad, 2012). Na **Figura 5** é mostrado um mapa-múndi com os países que estavam adotando políticas de fortificação mandatória de alimentos (farinhas ou arroz) em 2014.



Figura 5. Representação dos países que estavam adotando fortificação mandatória de alimentos com ácido fólico (em cinza) em 2014

Adaptado de *Food Fortification Initiative*. Disponível em: http://www.ffinetwork.org/global_progress/index.php

Nos Estados Unidos, a fortificação de AF iniciou em 1998, seguida pelo Canadá e Chile (Nazer, López-Camelo e Castilla, 2001; Neuhouser e Beresford, 2001). Já no Brasil, a fortificação mandatória teve início a partir de julho de 2004, após a publicação da RDC nº 344 de 13 de dezembro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ficou estabelecido que as farinhas de trigo e milho fossem fortificadas com 150 µg de AF e 4,2 mg de ferro para cada 100 g de farinha (Brasil, 2002).

Estima-se que a população dos países que adotaram a fortificação tenha dobrado o consumo habitual de AF, o que implicou em um aumento drástico nas concentrações plasmáticas de AF. Este aumento vem atingindo especialmente

crianças e idosos, grupo da população que apresenta hábitos de alto consumo de pães e/ou suplementos alimentares (Smith, Kim e Refsum, 2008).

Dessa forma, a fortificação das farinhas com AF tem levado à redução da incidência de DFTN em diversos países (Honein *et al.*, 2001; Eichholzer, Tönz e Zimmermann, 2006; De Wals *et al.*, 2007; Castillo-Lancellotti, Tur e Uauy, 2013). No **Quadro 1** são apresentados dados de redução de DFTN em alguns países incluindo o Brasil, após o período de fortificação de farinhas com AF.

Quadro 1. Dados com exemplos de reduções observadas na incidência de DFTN em alguns países incluindo o Brasil, após o período de fortificação de farinhas com AF

País	% de redução nos casos de DFTN	Período pré-fortificação	Período pós-fortificação	Referência
Brasil	35	2001-2003	2006-2008	(Fujimori <i>et al.</i> , 2013)
Chile	55	1999	2009	(Castillo-Lancellotti, Tur e Uauy, 2013)
Costa Rica	58	1997	2009	(Barboza Argüello e Umaña Solís, 2011)
Canadá e EUA	30-50	-	-	(Jägerstad, 2012)

Todavia, tanto a fortificação de farinhas, quanto o consumo de polivitamínicos sem prescrição em muitos países contribuíram para aumentar ainda mais a ingestão de AF (Bailey e Ayling, 2009), o que pode levar ao aparecimento de concentrações supra-fisiológicas de folato sérico, caracterizada por concentrações superiores a 45nmol/L (Dary, 2009) ou concentrações elevadas de UMFA (maior que 1,35nmol/L) (Kalmbach *et al.*, 2008). Após a fortificação com ácido fólico, concentrações supra-fisiológicas foram encontradas em 23% da população norte-americana, em 43% de crianças menores de 5 anos e em 38% dos idosos (Smith, Kim e Refsum, 2008).

No Brasil, observou-se aumento de 57% e 174% nas concentrações de folato sérico entre os períodos pré e pós-fortificação, respectivamente para o grupo crianças e adolescentes e para o grupo adultos (Britto, Cançado e Guerra-Shinohara, 2014).

1.4 Uso terapêutico de ácido fólico

O tratamento para a deficiência de folato é realizado com uso de AF em doses que variam de 1 a 5mg/dia por via oral (Green, 2010). O AF é normalmente prescrito a pacientes que apresentam aumento na eritropoese, tal como ocorre em anemias hemolíticas entre as quais a esferocitose hereditária (EH), talassemias e outras anemias (Malvezzi e Zago, 2001; Perrotta, Gallagher e Mohandas, 2008). E como já discutido anteriormente, é indicado também para todas as mulheres que desejam engravidar (Institute of Medicine, 1998).

Para gestantes que apresentam fatores de risco, entre eles história prévia de gestação acometida por DFTN, a Organização Mundial da Saúde recomenda 4.000µg/dia (CDC, 1991), enquanto que o Ministério da Saúde no Brasil, recomenda o uso de 5mg de AF por dia a todas as mulheres que desejam engravidar, independentemente de ter tido caso DFTN (Ministério da Saúde, 2006).

No Brasil, são escassas as informações sobre as concentrações de folato tanto em pacientes com EH, como naqueles com traço talassêmico. Mesmo na literatura internacional dados de concentrações de folato em pacientes com EH e traço talassêmico são raros na era pós-fortificação de alimentos.

É importante mencionar que no Brasil, a maioria das formulações contendo ácido fólico contém 5 mg desta vitamina, a qual é mais utilizada na clínica tanto para portadores de EH quanto para talassêmicos. Os riscos do tratamento com doses elevadas de AF (de 5mg de AF/dia) não estão completamente elucidados.

1.5 Sobrecarga de ácido fólico

Com a efetivação da fortificação das farinhas com AF em vários países tem sido discutido os riscos do aparecimento de concentrações elevadas de UMFA no organismo (Kim, 2007; Mason *et al.*, 2007; Solomons, 2007; Kalmbach, *et al.*, 2008; Smith, Kim e Refsum, 2008; Houghton, Yang e O'connor, 2009).

O AF sintético somente será incorporado às células quando reduzido pela DHFR (Kalmbach, *et al.*, 2008). Assim, a baixa atividade da DHFR ou a saturação desta enzima podem ser fatores limitantes para a redução do AF em pessoas que consomem quantidades superiores à ingestão tolerável de 1 mg/dia da vitamina,

levando ao aparecimento de UMFA na circulação sanguínea (Wright, Dainty e Finglas, 2007; Bailey e Ayling, 2009).

Em humanos, a expressão e atividade da DHFR em hepatócitos é relativamente baixa e a ingestão de quantidades aumentadas de AF poderia levar a sua saturação (Kelly *et al.*, 1997; Sweeney *et al.*, 2003; Sweeney *et al.*, 2006). Foi demonstrada a presença de UMFA em amostras de plasma colhidas em jejum após 8 a 14 semanas de suplementação com 400µg/dia de AF. Isso sugere que a ingestão diária de mais de 400µg/dia de AF satura não somente a atividade da DHFR hepática, mas também a absorção pelas células dos tecidos periféricos e o *clearance* renal (Tam, O'connor e Koren, 2012).

Em estudo norte americano com mulheres na menopausa, na era pós-fortificação, foi detectado UMFA em cerca de 78% dos indivíduos após uma noite de jejum (Troen *et al.*, 2006). Entretanto, muito pouco é conhecido sobre o metabolismo e os efeitos biológicos da presença de UMFA no organismo, especialmente em altas concentrações (Bailey *et al.*, 2010).

Tem sido sugerido que o AF em excesso poderia interferir no metabolismo, no transporte celular, e nas funções regulatórias que o folato natural exerce no organismo por competir com as formas reduzidas pela ligação com enzimas, proteínas transportadoras e proteínas ligadoras. Um exemplo é o plexo coroide cerebral, no qual o transporte de folato é feito pelos receptores de folato (FR), os quais exibem uma maior afinidade pelo AF do que por metil-THF. Em uma situação de altas concentrações de UMFA, o transporte de metil-THF para essa região cerebral ficaria limitado (Smith, Kim e Refsum, 2008). O mesmo poderia acontecer em outros tecidos, nos quais o FR é bastante expresso, como o epitélio renal, retina e placenta (Salazar e Ratnam, 2007; Zhao, Matherly e Goldman, 2009). Foi descrito ainda, uma inibição dos transportadores de folato na membrana de células intestinais e renais cultivadas com excesso de AF (Ashokkumar *et al.*, 2007).

Como mencionado anteriormente, o DHF é um intermediário na conversão de AF para THF. Altas concentrações de AF poderiam teoricamente levar ao acúmulo desse intermediário. O DHF em excesso, na forma poliglutamato, inibe a enzima timidilato sintase e, conseqüentemente, a formação de deoxitimidilato necessária para a síntese de DNA. O DHF também inibe a enzima purina sintase (Allegra *et al.*, 1985)

e é também um potente inibidor da MTHFR (Matthews e Baugh, 1980), podendo, portanto, reduzir a formação de 5-metil-THF e levar a diminuição da síntese de metionina (Smith, Kim e Refsum, 2008).

Acredita-se também, que a presença de altas concentrações de AF circulante possa mascarar uma deficiência de vitamina B₁₂ levando ao agravamento dos danos neurológicos associados com uma prolongada deficiência da mesma (Reynolds, 2002; Morris *et al.*, 2007). Em estudo que avaliou 3.718 idosos, com um acompanhamento médio de 5,5 anos, Morris e colaboradores demonstraram que os indivíduos com maior ingestão de folato apresentaram maior taxa de declínio cognitivo, sugerindo que o excesso de AF por meio de multivitaminas e alimentos fortificados poderia ter efeitos nocivos na saúde de idosos (Morris *et al.*, 2005).

Outro importante aspecto, relacionado com o UMFA, é seu efeito sobre as células *natural killer* (NK). Foi demonstrado que a citotoxicidade das células NK de idosas com altas concentrações plasmáticas de UMFA estava diminuída, independentemente das concentrações de folato total e de 5-metil-THF (Troen *et al.*, 2006). As células NK são importante componente da resposta imune não específica, sendo consideradas a primeira linha de defesa do sistema imune contra carcinogênese. A diminuição da citotoxicidade das células NK pode aumentar o risco ou gravidade de infecções e foi associada com aumento futuro da incidência de câncer (Imai *et al.*, 2000). O efeito do AF sobre a citotoxicidade de NK *in vivo* poderia ser uma via pela qual o excesso de AF promoveria lesões malignas e pré-malignas, pela redução da vigilância contra células tumorais (Troen *et al.*, 2006).

O papel do AF no câncer tem sido muito discutido na literatura, mostrando que esta vitamina apresenta ações paradoxais na carcinogênese, dependente da dose e do momento da intervenção (Kim *et al.*, 1996; Song, Medline, *et al.*, 2000; Song, Sohn, *et al.*, 2000; Kim, 2006b; 2007; Lindzon *et al.*, 2009). Alguns estudos mostraram os efeitos benéficos do AF no processo carcinogênico em diferentes órgãos (Choi e Mason, 2002; Larsson, Giovannucci e Wolk, 2004; Sanjoaquin *et al.*, 2005; Ericson *et al.*, 2007); no entanto, outros sugerem que a suplementação com AF pode aumentar o risco de desenvolvimento do câncer e acelerar a progressão tumoral, principalmente se a vitamina for administrada em concentrações elevadas ou se o tratamento for iniciado após a presença de lesões pré-neoplásicas (Kim, 2004; 2006a; b; Cole *et al.*, 2007; Ulrich e Potter, 2007).

Também foi postulado que a presença de UMFA poderia interferir nos tratamentos com medicação antifolato como os usados contra malária, artrite reumatoide, psoríase e câncer (Smith, Kim e Refsum, 2008).

1.6 Ácido fólico, células NK e componente inflamatório

As células NK são linfócitos produzidos na medula óssea e compreendem de 5 a 10% do total dessas células no sangue periférico (Trinchieri, 1989). As células NK fazem parte da resposta imune não específica e podem destruir uma variedade de células anormais ou infectadas por vírus sem sensibilização prévia. Além disso, elas podem destruir células tumorais, evitando o crescimento e disseminação de tumores, participando da vigiância contra células tumorais e também células alogênicas (Troen *et al.*, 2006; Vivier *et al.*, 2008; Levy, Roberti e Mordoh, 2011).

Quando as células NK detectam células infectadas por vírus ou tumorais, elas as destroem por indução da apoptose e sinalizam outras células com liberação de citocinas (Romagné e Vivier, 2011). O sistema de detecção usado pelas NK inclui uma variedade de receptores estimuladores destas células (receptores de ativação) e inibidores da reactividade das mesmas (receptores inibitórios) (Vivier *et al.*, 2008; Vivier *et al.*, 2011). Quando uma célula NK encontra uma célula saudável, em condições normais, predominam os sinais inibitórios sobre os sinais ativadores e, dessa forma, a NK não é ativada. Entretanto, quando uma célula infectada é encontrada, os sinais ativadores predominam e a célula NK é ativada, levando a lise da célula-alvo ou à produção de citocinas (**Figura 6**). O reconhecimento das células estranhas ou das células próprias alteradas acontece via molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC I) e seus receptores de ativação (Vivier *et al.*, 2008; Ljunggreen e Karre, 1990).

O teste de citotoxicidade das células NK *in vitro* se baseia neste princípio: as células NK, em contato com células tumorais (como por exemplo, células de linhagem de eritroleucemia - K-562), não reconhece o MHC I destas células e tem seus receptores de superfície ativados, levando à apoptose das células alvo.

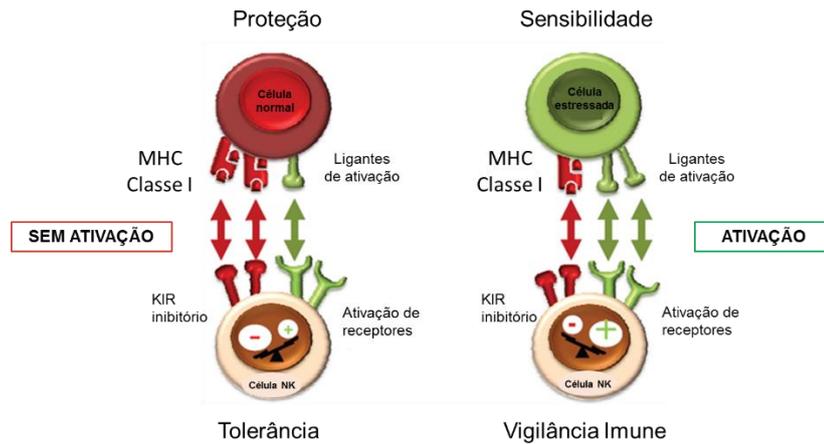


Figura 6. Interação das células NK com receptores de inibição e de ativação. A densidade de ligantes para estes receptores irá estabelecer se esta interação levará ou não ativação da célula NK

MHC: complexo principal de histocompatibilidade; KIR: *killer immunoglobulin-like receptor*. Adaptado de Romagné e Vivier, 2011

A atividade das células NK é mediada principalmente por meio da liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas, e através da expressão de moléculas da superfície celular, tais como o ligante FAS (Lanier, 2005; Orange, 2008). A perforina facilita a entrada de granzimas para dentro da célula-alvo, ativando caspases e induzindo a apoptose das mesmas (Sun e Lanier, 2011).

É importante notar que as células NK são as maiores produtoras de algumas citocinas tais como interferon- γ (IFN- γ) em muitas condições fisiológicas e patológicas. Elas também produzem variedade de citocinas inflamatórias e imunossupressoras, como o TNF- α e IL-10, respectivamente, além de fatores de crescimento (Vivier *et al.*, 2011).

Os interferons são amplamente reconhecidos por serem parte integrante da resposta imune inata a infecções virais (George *et al.*, 2012). Entre eles, o IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células (Ohtoshi *et al.*, 1991). Além de ser produzido por células NK, é também secretado por células T em certas condições de ativação (Boehm *et al.*, 1997). O IFN- γ desempenha papel-chave na defesa do hospedeiro (incluindo defesa antiviral e antibacteriana) e na imunidade antitumoral.

Em contraste com seu papel estimulante, o IFN- γ também é capaz de inibir respostas imunes; ele pode minimizar danos a tecidos e órgãos imuno-mediados em situações de autoimunidade e de infecções (Wilke *et al.*, 2011).

O TNF- α é uma citocina que está envolvida nas reações imunes celulares e inflamatórias. É produzida principalmente por macrófagos, linfócitos ativados, células NK, neutrófilos entre outros (Matthias *et al.*, 1998; Meyers, Albitar e Estey, 2005). É descrito como o principal mediador de resposta inflamatória aguda contra bactérias gram-negativas, além de participar da resposta contra outros micro-organismos patogênicos. Dessa forma, atua como uma citocina multifuncional, implicada na inflamação, apoptose ou sobrevivência celular e também na citotoxicidade. Além disso, muitos fenômenos fisiopatológicos observados durante a sepse são atribuídos ao TNF- α (De Souza *et al.*, 2005).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células, entre as quais linfócitos T e B, fibroblastos, monócitos e células endoteliais. Desempenha um papel chave em processos inflamatórios de células normais, em respostas imunitárias do hospedeiro e na modulação do crescimento celular e hematopoese. Também é um mediador central em muitas doenças inflamatórias crônicas e autoimunes. Atua ainda numa variedade de processos biológicos (Ataie-Kachoe, Pourgholami e Morris, 2013).

A interleucina-8 (IL-8) é uma citocina produzida por quase todas as células do organismo, principalmente células endoteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, e linfócitos T (Nonaka *et al.*, 1996). É também conhecida como “citocina quimiotática”, por ser um potente mediador do recrutamento de células e da neovascularização em doenças inflamatórias e neoplásicas (Leonard *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997). A migração dos leucócitos se dá através de um gradiente de quimiocinas cuja concentração vai aumentando em direção ao foco inflamatório (Ohkubo *et al.*, 1998; Kleinjan *et al.*, 1999). Tem sido observado que a IL-8 está aumentada quando ocorre processo inflamatório endotelial associado com o aumento de tHcy (Laanpere *et al.*, 2010), mostrando um vínculo entre esta citocina e o metabolismo do folato.

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel crucial na prevenção da inflamação e de doenças autoimunes (Saraiva e O'garra, 2010) e é produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo

macrófagos, linfócitos T, células NK, entre outras células do sistema imune (Mannino *et al.*, 2015). Sua principal função parece ser limitar e finalizar as respostas inflamatórias (Moore *et al.*, 2001). Entretanto, nas células NK essa citocina desempenha um papel contraditório, tendo em alguns casos efeitos anti-inflamatórios, inibindo a produção de TNF- α e IFN- γ por estas células em experimentos *in vitro* (Moore *et al.*, 2001). Já *in vivo* foi demonstrado que a IL-10 induziu aumento da atividade citolítica das células NK (Lauw *et al.*, 2000).

1.7 Metilação do DNA

A metilação do DNA em mamíferos é uma modificação pós-replicação na qual grupos metil se ligam predominantemente à posição 5' de citosinas da sequência dinucleotídica CpG (citosina-fosfato-guanina) (Friso *et al.*, 2002; Jaenisch e Bird, 2003) por meio de transferência enzimática pelas DNA metiltransferases que utilizam como substrato a SAM (Sawan *et al.*, 2008). É chamada de característica epigenética, já que são modificações hereditárias que não dependem de mudanças na sequência do DNA (Jaenisch e Bird, 2003). Uma representação esquemática do processo de metilação do DNA é mostrada na **Figura 7**.

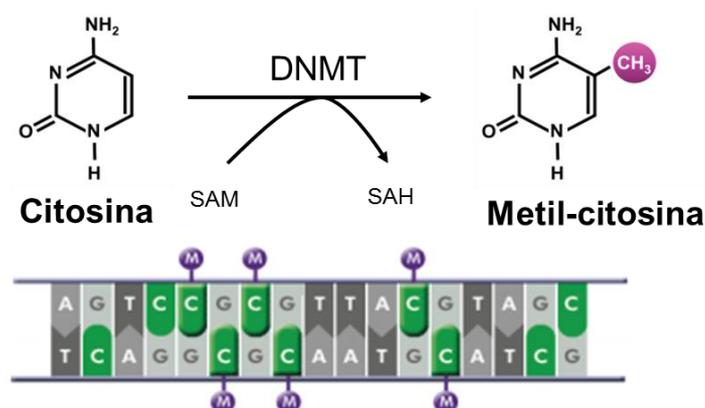


Figura 7. Representação esquemática do processo de metilação do DNA, com a conversão de citosina para metil-citosina pela ação da DNA metiltransferase (DNMT) SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína. Adaptado de Zakhari, 2013

A metilação ocorre predominantemente em regiões repetitivas do genoma que contêm resíduos CpG (Jirtle e Skinner, 2007). Os dinucleotídeos CpG ocorrem em

regiões densas chamadas ilhas CpG, que variam entre 0,5 kb e 4 kb em comprimento e são encontradas principalmente em regiões promotoras de genes funcionais (Johnson e Belshaw, 2008).

Em nosso genoma, quase a metade dos genes apresenta regiões promotoras ricas em CpG. Na maior parte do genoma, cerca de 80% dos dinucleotídeos CpG que não estão em ilhas CpG são fortemente metilados, enquanto os dinucleotídeos CpG que estão em ilhas CpG, especialmente aqueles associados com regiões promotoras, são usualmente desmetilados (Bird, 2002). A metilação das ilhas CpG, especialmente aquelas localizadas em regiões promotoras de genes, é associada com o silenciamento de genes, enquanto a hipometilação permite a expressão do gene (Crider *et al.*, 2012). Estudo com análise de metilação em células de linhagem de fibroblastos humanos mostrou que 4,25% do total de citosinas no DNA genômico estão metiladas (Lister *et al.*, 2009).

Componentes alimentares têm a capacidade de influenciar a metilação do DNA através do suprimento de intermediários do ciclo do um carbono, especialmente regulando as concentrações de SAM (Ross, 2007), a qual fornece o grupo metil usado na metilação da citosina (Parle-Mcdermott e Ozaki, 2011).

Entretanto, a S-adenosilhomocisteína (SAH), é um potente inibidor competitivo de todas metiltransferases e a extensão da inibição depende da razão SAM/SAH (Ingrosso *et al.*, 2003). Em condições normais, a SAH é rapidamente hidrolisada a homocisteína e adenosina, e a reação é reversível. Se a homocisteína acumula, a hidrólise da SAH é mais lenta, com consequente inibição da metiltransferase (Ingrosso *et al.*, 2003). Elevações moderadas de tHcy no plasma têm sido associada com aumento das concentrações de SAH, mas não de SAM, e esse aumento de SAH tem sido associada com hipometilação global do DNA (Yi *et al.*, 2000; Guerra-Shinohara *et al.*, 2007).

Embora, durante a deficiência de folato tenha sido relatada a ocorrência de hipometilação em alguns genes (Pogribny *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 1998a; Liu *et al.*, 2007) e hipermetilação em outros (Jhaveri, Wagner e Trepel, 2001; Pogribny e James, 2002; Motiwala *et al.*, 2003), não há uma associação consistente entre a metilação global do DNA com o estado do folato (Pufulete *et al.*, 2003; Piyathilake *et al.*, 2006; Crider *et al.*, 2012).

As evidências de associação entre metilação aberrante do DNA e mudanças na expressão gênica em resposta às altas concentrações de folato/ ácido fólico não são claras e não há um consenso entre as doses ou concentrações de ácido fólico que poderiam estar associadas com resultados adversos para a saúde (Crider *et al.*, 2012).

Entretanto, muitos dos estudos de associação entre folato e metilação têm sido realizados em células de linhagens tumorais. Há escassez de estudos descrevendo associação de altas concentrações de AF, especialmente na forma não metabolizada, sobre as taxas de metilação global do DNA. Mesmo que exista controle enzimático sobre o processo de metilação do DNA, o efeito que o excesso de substrato (no caso doadores de grupos metil) poderia exercer neste mecanismo é desconhecido.

1.8 Esferocitose hereditária

A esferocitose hereditária (EH) é uma anemia hemolítica hereditária caracterizada por defeito ou deficiência em uma ou mais das proteínas (espectrinas, banda 3, anquirinas e banda 4.2) que compõe a membrana dos eritrócitos. Como resultado, os eritrócitos perdem pequenas vesículas da membrana citoplasmática contendo lipídios e proteínas, o que diminui a superfície da membrana tornando o eritrócito esférico (esferócito). A prevalência é elevada no norte da Europa atingindo em torno de 50 para 100.000 indivíduos, menor nas populações brancas latinas (20 a 30/100.000) e ainda menor em negros e orientais (Failace, Fernandes e Failace, 2009).

Esta alteração de forma do eritrócito leva a alteração na capacidade de deformação fazendo com que estas células sejam prematuramente sequestradas e destruídas pelo baço (Gallagher, 2010; Iolascon, Avvisati e Piscopo, 2010). A EH pode se apresentar com variações no quadro clínico, desde leve até grave, com intensidade variável de anemia, hemólise icterícia e esplenomegalia (Perrotta, Gallagher e Mohandas, 2008).

As formas leves e moderadas de EH são mais frequentes e podem causar uma hemólise compensada. Entretanto, icterícia com episódios de agravamento durante infecções são relatados com frequência por estes pacientes. As formas que variam de moderadamente grave a grave ocorrem em menos que 10% dos casos (Saad, 2001).

Os diferentes graus de alterações nos parâmetros laboratoriais associados ao quadro clínico dos pacientes EH estão apresentados no **Quadro 2**.

O diagnóstico é baseado na combinação de avaliação clínica, história familiar, exame físico (esplenomegalia e icterícia) e testes laboratoriais (Bolton-Maggs *et al.*, 2004). Os achados laboratoriais incluem a presença de esferócitos na extensão sanguínea (em cerca de 70% dos casos), concentração hemoglobínica corpuscular média superior a 36% em 50% dos casos e aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos, consequência direta da relação superfície/volume diminuídos (Saad, 2001).

Quadro 2. Variações nos parâmetros laboratoriais conforme o quadro clínico da esferocitose hereditária

	Leve	Moderada	Moderadamente grave	Grave
Hemoglobina (mg/dL)	Normal	>8,0	6,0-8,0	<6,0
Reticulócitos (%)	<6%	>6%	>10%	>10%
Bilirrubinas Total (mg/dL)	1,0-2,0	>2,0	>2,0-3,0	>3,0
Alterações na morfologia dos eritrócitos	Alguns esferócitos	Esferócitos	Esferócitos	Microesferócitos e poiquilócitos

Adaptado de Perrotta, Gallagher e Mohandas, 2008

O uso de AF é indicado a todos os pacientes com doenças da membrana eritrocitária e hemólise crônica, como os pacientes com EH, a fim de prevenir a anemia megaloblástica e os DFTN em fetos de gestantes pertencentes a este grupo (Malvezzi e Zago, 2001; Perrotta, Gallagher e Mohandas, 2008).

1.9 β -Talassemia heterozigótica

A β -talassemia compreende um grupo de desordens hereditárias caracterizadas por uma deficiência genética na quantidade de síntese de cadeias β -globina, resultando em um fenótipo que varia de anemia muito grave até formas assintomáticas. São descritas três principais formas: β -talassemia maior, β -talassemia intermédia e β -talassemia menor ou heterozigótica (Cao e Galanello, 2010; Galanello e Origa, 2010).

Indivíduos com talassemia maior são homocigotos ou heterocigotos compostos para genes β^0 ou β^+ , e apresentam grave anemia com dependências de transfusões sanguíneas. Indivíduos com β -talassemia intermédia são principalmente homocigotos ou heterocigotos compostos, apresentam anemia moderada e, ou não requerem ou somente ocasionalmente necessitam transfusão de sangue. Indivíduos com talassemia menor ou traço talassêmico são caracterizados como heterocigóticos preferindo-se a denominação β -talassemia heterocigótica. Estes indivíduos são normalmente assintomáticos, embora laboratorialmente seja frequente a observação de leve anemia (Rund e Rachmilewitz, 2005; Cao e Galanello, 2010; Galanello e Origa, 2010).

Os indivíduos β -talassêmicos heterocigóticos (β -TH) apresentam uma diminuição discreta na produção de cadeia β , o que compromete a produção de hemoglobina A, apresentando deste modo, um discreto aumento na concentração de Hemoglobina A₂ (HbA₂) que fica em geral entre 3,5 e 6%. Apresentam hemoglobina ligeiramente diminuída (10,5-13,0g/dL) devido a hemólise crônica, mas estes índices podem ser mais baixos durante a gestação e nos primeiros anos de vida. É comum a presença de microcitose e hipocromia, no entanto o ferro sérico é normal (Zago, 2001; Weatherall, 2010). Em maior ou menor grau, o distúrbio das cadeias β leva a um processo de hemólise e aumento da eritropoese (Weatherall, 2010), mesmo nos indivíduos β -TH. Isso fica caracterizado por uma contagem de reticulócitos acima do normal, o que leva a um aumento de eritrócitos nestes indivíduos, sem, no entanto corrigir as taxas de hemoglobina (Failace, Fernandes e Failace, 2009).

No nível molecular, as talassemias β apresentam uma heterogeneidade de alterações, com mais de 300 diferentes mutações descritas no gene da β globina (HBB) (Cao e Galanello, 2010), o que colabora para a variabilidade do grau de hemólise e de concentração de hemoglobina.

Funcionalmente, as mutações no gene da cadeia β globina (HBB) variam desde aquelas que inativam completamente o gene, causando uma completa ausência de produção (denominadas β^0), até aquelas que causam uma redução significativa (denominadas β^+) (Weatherall, 2010).

No Brasil, as mutações mais comuns são as do códon 39 (CAG→TAG) e as que afetam nucleotídeos localizados no íntron 1, a IVS1-110 (G→A), IVS1-6 (T→C) e

IVS1-1 (G→A). Porém, as prevalências de cada mutação variam de região para região (Souza, 2015).

A suspeita de β -TH ocorre quando há microcitose e hipocromia no hemograma com ferro sérico normal. A confirmação diagnóstica de β -TH é realizada através de cromatografia de hemoglobinas, na qual é observado o aumento de HbA₂ (Failace, Fernandes e Failace, 2009; Galanello e Origa, 2010).

A grande maioria dos indivíduos β -TH não requer nenhuma medida terapêutica, entretanto, alguns fazem uso de AF na tentativa de repor estoques desta vitamina evitando o desenvolvimento de anemia por sua deficiência ou a consequente piora da anemia em relação ao nível basal (Castagna *et al.*, 1984). Porém, esse uso varia a critério médico conforme o quadro clínico do indivíduo e o grau de anemia.

Frente ao exposto, considerando que não é conhecido o efeito de altas doses de AF, seja decorrente do uso terapêutico, seja proveniente da fortificação das farinhas de trigo e milho ou de ambos, na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK, propusemos este estudo.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das concentrações de ácido fólico (sérico, eritrocitário e UMFA) sobre a metilação global do DNA, sobre a expressão de RNAm de genes (interferon- γ , TNF- α , interleucina-8, MTHFR e DHFR) em leucócitos mononucleares, e sobre a citotoxicidade e o número de células NK em indivíduos saudáveis expostos apenas a fortificação compulsória com ácido fólico e em indivíduos que fazem uso terapêutico desta vitamina.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar a concentração sérica de UMFA, folato sérico e eritrocitário, vitamina B₁₂ e tHcy;
- Verificar se as concentrações de UMFA e de folato (sérico e eritrocitário) levam a modificações na metilação global do DNA e na expressão de RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8 em leucócitos mononucleares do sangue periférico;
- Analisar o efeito das concentrações de UMFA e de folato (sérico e eritrocitário) sobre o número e a citotoxicidade das células NK;
- Determinar se existe associação entre a concentração sérica das citocinas interferon- γ , TNF- α e interleucina-6, 8 e 10 com as concentrações de UMFA e de folato (sérico e eritrocitário);
- Avaliar a ingestão dietética de folato e das vitaminas do complexo B correlacionando com as concentrações de UMFA e de folato (sérico e eritrocitário), vitamina B₁₂ e tHcy;
- Verificar o efeito da intervenção com 5mg/dia de ácido fólico nas concentrações de vitaminas (folato sérico, eritrocitário, UMFA e vitamina B₁₂), tHcy e citocinas inflamatórias (interferon- γ , TNF- α e interleucina-6, 8 e 10);
- Verificar o efeito da intervenção com 5mg/dia de ácido fólico na expressão de RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8, e também no número e na citotoxicidade das células NK.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Pacientes com esferocitose hereditária

Foram incluídos 27 pacientes com esferocitose hereditária (EH), de ambos os gêneros e com idades entre 20 e 84 anos, provenientes dos Ambulatórios de Anemias da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e do Ambulatório de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC-Sorocaba-SP. Foram excluídos do estudo os etilistas crônicos, pacientes com infecções, portadores de doenças crônicas, gestantes e aqueles que estavam fazendo uso de medicações imunossupressoras.

3.1.2 Indivíduos com β -talassemia heterozigótica

Foram incluídos 50 indivíduos com β -talassemia heterozigótica, de ambos os gêneros e com idades entre 19 e 84 anos, provenientes dos Ambulatórios de Anemias da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e do Ambulatório de Hematologia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUC-Sorocaba-SP. Alguns indivíduos com β -talassemia heterozigótica atenderam nosso convite através do anúncio no site da Associação Brasileira de Talassemia e também após divulgação na Universidade de São Paulo. Foram excluídos do estudo os etilistas crônicos, pacientes com infecções, portadores de doenças crônicas, gestantes e aqueles que estavam fazendo uso de medicações imunossupressoras.

3.1.3 Indivíduos saudáveis (controles)

Foram incluídos 136 indivíduos saudáveis provenientes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, da UNIFESP e indivíduos voluntários da cidade de São Paulo, os quais foram convidados a participar deste estudo. Destes, 54 indivíduos com idades entre 21 e 82 anos foram pareados com os pacientes do grupo EH quanto ao gênero, idade, índice de massa corporal (IMC) e cor de pele declarada, servindo como controles saudáveis. Cem indivíduos com idades entre 20 e 82 anos foram utilizados como controles saudáveis do grupo β -talassemia heterozigótica, sendo

pareados quanto ao gênero, idade e IMC. Dezoito indivíduos serviram como controles saudáveis simultaneamente aos dois grupos. Foram excluídos do estudo os etilistas crônicos, pacientes com infecções, gestantes, portadores de doenças crônicas, aqueles que estavam fazendo uso de medicações imunossupressoras, ou que nos 6 meses anteriores ao início do estudo fizeram uso de polivitamínicos, ácido fólico, vitamina B₁₂, ferro ou que doaram sangue.

3.1.4 Indivíduos saudáveis (estudo prospectivo com intervenção com 5mg dia de ácido fólico)

Foram incluídos 30 indivíduos saudáveis (15 homens e 15 mulheres), que não haviam feito uso de polivitamínicos nos 6 meses anteriores ao início do estudo, com idades entre 20 e 36 anos. Estes indivíduos foram recrutados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (29 alunos e 1 funcionário), tomando as devidas precauções para não criar constrangimento ou coação sobre os participantes. Os mesmos foram submetidos a intervenção com 1 comprimido de 5 mg de ácido fólico/dia pelo período de 90 dias. A vitamina usada na intervenção utilizada foi da mesma marca comercial (Afopic®, Teuto Bras. – Anápolis, Brasil) e mesmo lote (0184329).

Foram excluídos do estudo os etilistas crônicos, indivíduos com infecções, portadores de doenças crônicas, gestantes, aqueles que estavam fazendo uso de medicações imunossupressoras, ou que nos 6 meses anteriores ao início do estudo fizeram uso de polivitamínicos, ácido fólico, vitamina B₁₂, ferro ou que doaram sangue.

3.1.5 Aspectos Éticos

Todos os indivíduos participantes deste estudo foram informados sobre os objetivos do projeto e consultados sobre a vontade de participar da pesquisa. Os que foram favoráveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O projeto foi aprovado nos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob parecer número 69/2012 em 25/09/2012; da Universidade Federal de São Paulo sob parecer número

69574 em 08/08/2012; da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo sob parecer número 230.882 em 27/03/2013.

Um adendo com solicitação de inclusão de um grupo de indivíduos saudáveis que foram submetidos à intervenção com 5mg de ácido fólico/dia foi aprovado pelos CEPs da FCF-USP e UNIFESP.

3.2 Métodos

3.2.1 Amostras Biológicas

Foram colhidos 40 mL de sangue periférico de cada indivíduo em jejum de 8 horas, utilizando tubos a vácuo (sistema Vacutainer®) secos para obtenção de soro; contendo EDTA para a realização de hemograma, contagem de reticulócitos, perfil de hemoglobinas, extração de DNA e para a obtenção de plasma; e com heparina para a separação de células mononucleares, extração de DNA e obtenção de plasma.

Para o estudo de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico, foi realizado uma coleta de 50 mL de sangue, em jejum de 8 horas, antes de iniciar a intervenção, e após 45 dias e 90 dias de uso da vitamina, utilizando tubos a vácuo como descrito acima. Tomou-se o cuidado de padronizar o uso do AF 5mg, as 8 horas da manhã no dia anterior a coleta, de modo que a coleta ocorreu após 24 horas da última administração do medicamento.

3.2.2 Determinação do hemograma e número de reticulócitos

O hemograma e a contagem de reticulócitos foram obtidos utilizando contador eletrônico Pentra 120® (*HORIBA, Montpellier, França*).

3.2.3 Concentração de proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) e de lactato desidrogenase (LDH)

As determinações de PCR-us foram realizadas em amostras de soro por imunoturbidimetria ultrasensível utilizando o kit Roche-CRPL 3 e o equipamento COBAS 8.000® (*Roche Diagnostics, Indianapolis, USA*). A atividade sérica da LDH foi

determinada por ensaio enzimático, utilizando o equipamento Vitros 250® (*Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, USA*).

3.2.4 Determinação das concentrações de folato sérico e eritrocitário

As concentrações de folato sérico e eritrocitário foram determinadas por método microbiológico, utilizando-se cepas de *Lactobacillus casei* conforme descrito anteriormente (O'broin e Kelleher, 1992).

Para a determinação do folato eritrocitário, no dia da coleta, foi preparado um hemolisado das amostras, adicionando-se 50µL de sangue coletado com EDTA em 1mL de solução de ácido ascórbico 0,05%. Estas amostras foram armazenadas durante 90 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz, em seguida, armazenadas a -80°C até o momento das análises. A partir deste hemolisado, foi realizada a determinação de folato pelo método microbiológico. Do resultado obtido no hemolisado foi calculado o folato eritrocitário a partir da fórmula abaixo:

$$\text{Folato eritrocitário} = \frac{(\text{Folato no hemolisado} \times 21) - \left(1 - \left(\frac{\text{Ht}}{100}\right)\right) \times \text{folato sérico}}{\left(\frac{\text{Ht}}{100}\right)}$$

Ht: hematócrito em %; 21: fator de diluição; Folato eritrocitário, sérico e no hemolisado em nmol/L

3.2.5 Determinação das formas de folato por LC-MS/MS

Uma alíquota de soro foi usada para determinação de folato total e das formas não metabolizada (UMFA), tetraidrofolato (THF), 5-metil-THF, 5-formil-THF, 5,10-metenil-THF e o produto de degradação do 5-metil-THF (MeFox) por LC-MS/MS. Estas análises foram realizadas pela equipe da Profa. Dra. Christine Pfeiffer do *Center for Disease Control and Prevention* dos Estados Unidos (Pfeiffer *et al.*, 2004). Devido ao custo, estas determinações foram realizadas apenas nas amostras do grupo esferocitose hereditária (N=27) e seus controles (N=54) e nas amostras do estudo de intervenção com 5mg/dia de AF (N=90). Não foi possível a determinação destas formas nas amostras do grupo com β-talassemia heterozigótica e em seus controles.

3.2.6 Determinação de vitamina B₁₂

As concentrações séricas de vitamina B₁₂ foram determinadas por método microbiológico usando-se cepas de *Lactobacillus leishmannii* conforme descrito previamente (Kelleher *et al.*, 1987; Kelleher e Broin, 1991).

3.2.7 Determinação de homocisteína total -tHcy

A dosagem de tHcy foi realizada no plasma, utilizando método de imunoenensaio por quimioluminescência em analisador automatizado IMMULITE 2000® (*Siemens Healthcare, Erlangen, Germany*).

3.2.8 Determinação de hemoglobina fetal (Hb F) e hemoglobina A2 (Hb A2)

O perfil de hemoglobinas e a quantificação das frações de Hb F e Hb A2 foram realizados por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento automatizado (VARIANT Bio-Rad), utilizando colunas de troca catiônica e sistema de tampões de diferentes forças iônicas, fornecidos no Kit de Diagnóstico Beta Thalassemia Short (*Bio-Rad, Hercules, USA*). Além, da quantificação destas formas de hemoglobina, foi possível a checagem de outras formas de hemoglobinas (variantes). Nenhum indivíduo portador de variantes foi incluído neste estudo.

3.2.9 Determinação das concentrações séricas das citocinas inflamatórias

As concentrações séricas das citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α) foram determinadas através de imunoenensaio multiplex, utilizando os painéis de alta sensibilidade *T Cell Magnetic Bead Milliplex Map* (*EMD Millipore Corporation, St. Charles, USA*) e o equipamento Bio-PLex 200® (*Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA*).

3.2.10 Detecção das mutações da β -Talassemia heterozigótica por PCR e Sequenciamento

As mutações da β -talassemia foram investigadas através da amplificação e sequenciamento direto do gene da β globina, utilizando iniciadores específicos que

flanqueiam o gene, descritos por Miranda et al. (1997) e listados no **Quadro 3**. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer® (*Applied Biosystems, Foster City, USA*).

Quadro 3. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação de regiões do cluster β : localização referente ao cluster β no cromossomo 11 (ID: U01317)

<i>Primers</i>	<i>Sequência do iniciador (5´-3´)</i>	<i>Direção</i>	<i>Posição</i>	<i>Fragmento</i>
P1	TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG	→	61976	773 pb
P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	←	62746	
β IVSII 5´	GTGAGTCTATGGGACCCTTG	→	62632	850 pb
β IVSII 3´	CTGTGGGAGGAAGATAAGAGG	←	63481	
58	AATCCAGCTACCATTCTGC	→	63369	430 pb
P7	GACCTCCCACATTCCCTTTTT	←	63798	

→: sense; ←: anti-sense

3.2.11 Isolamento de leucócitos mononucleares

Os leucócitos mononucleares provenientes do sangue periférico (CMSP) colhido com heparina foram separados por gradiente descontínuo de Ficoll-Hypaque de densidade específica de 1,070 g/mL, à temperatura ambiente (Böyum, 1968). Foram separadas 5×10^6 células para a posterior extração de RNA, e o restante foi usado para o teste de citotoxicidade e separação de populações de linfócitos por marcação CD (*cluster of differentiation*).

3.2.12 Extração de RNA total

As células mononucleares foram inicialmente homogeneizadas com 1 mL de Trizol® até a dissolução do sedimento e armazenadas a -80°C até posterior extração do RNA, conforme orientação do fabricante. Após a extração uma alíquota foi utilizada para quantificação e avaliação da integridade. O restante foi armazenado em -80°C para análises posteriores. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (*Thermo Scientific, Wilmington, USA*), e a avaliação da integridade foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed™.

3.2.13 Síntese de DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit de reagentes *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, USA), a partir de 500ng de RNA total. A reação foi realizada em termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), com as seguintes condições de ciclagem: 37°C por 60 minutos e 95°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a – 20°C.

3.2.14 Determinação de expressão de RNAm

A determinação da expressão de RNAm dos genes do interferon- γ , TNF- α , interleucina-8, MTHFR e DHFR foi realizada em duplicata por *Real Time PCR*, no equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, USA), utilizando os ensaios *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os ensaios empregados estão descritos no **Quadro 4**. As análises foram realizadas em RNA proveniente de células mononucleares do sangue periférico.

Quadro 4. Características dos ensaios *Taqman®* empregados para avaliação da expressão dos genes *DHFR*, *MTHFR*, *IFN- γ* , *TNF- α* e *IL-8*

Gene	Identidade do ensaio	Fragmento amplificado (pb)
<i>DHFR</i>	Hs00758822_s1	75
<i>MTHFR</i>	Hs00195560_m1	95
<i>IFN-γ</i>	Hs00989291_m1	73
<i>TNF-α</i>	Hs01113624_g1	143
<i>IL-8</i>	Hs01553824_g1	91

DHFR: diidrofolato redutase; *MTHFR*: metilenotetraidrofolato redutase; *IFN- γ* : interferon- γ ; *TNF- α* : fator de necrose tumoral- α ; *IL-8*: interleucina-8; pb, pares de bases

Os resultados foram analisados com o software *System 7500* versão 2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, USA), que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. O equipamento gerou curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação por monitoração contínua de fluorescência (Hirayama *et al.*, 2008). Os valores quantitativos da expressão dos genes foram obtidos pelos valores do CT

(*threshold cycle*) ou limiar da amplificação, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR, de acordo com a seguinte fórmula: $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT é igual ao CT do gene de interesse menos a média do CT dos genes de referência.

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram analisados controles sem amostra (controle negativo) com a finalidade de avaliar possíveis contaminações dos reagentes com os produtos de PCR.

3.2.15 Escolha dos genes de referência

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, usando genes de referência como controles endógenos. Seis genes (*GAPDH*, *ACTB*, *UBC*, *HMBS*, *B2M* e *HPRT1*) foram escolhidos para serem testados como genes de referência, com o objetivo de avaliar quais deles apresentavam expressão mais estável na casuística de cada estudo. As características dos ensaios empregados para a avaliação da expressão dos genes de referência são apresentados no **Quadro 5**.

Quadro 5. Características dos ensaios *Taqman*® empregados para avaliação da expressão dos genes de referência candidatos pela técnica de PCR em tempo real

Gene	Identidade do ensaio	Fragmento amplificado (pb)
ACTB	Hs01060665_g1	63
B2M	Hs00984230_m1	81
GAPDH	Hs00266705_g1	74
HMBS	Hs00609293_g1	62
HPRT1	Hs02800695_m1	82
UBC	Hs02800695_m1	135

ACTB: beta-actina; *B2M*: beta-2-microglobulina; *GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; *HMBS*: hidroximetil butirato sintase; *HPRT1*: hipoxantina fosforibosiltransferase 1; *UBC*: ubiquitina C; pb, pares de bases.

Para o teste do gene endógeno no estudo caso-controle foi realizada PCR em tempo real, utilizando amostras de cDNA de pacientes com esferocitose hereditária,

com β -talassemia heterozigótica e indivíduos controles para cada um dos seis genes escolhidos.

Para o teste do gene endógeno no estudo de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico foi realizada PCR em tempo real, utilizando amostras de cDNA de indivíduos de ambos os gêneros e de cada tempo do estudo (pré-intervenção, 45 dias e 90 dias).

Os dados obtidos em ambos testes foram inseridos no qbasePLUS, versão 2.4 (*Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium*), baseado no geNorm™ (*Vandesompele et al., 2002*). Segundo o programa, os genes com maior estabilidade para o estudo com os pacientes esferocitose hereditária, indivíduos β -talassêmicos heterozigóticos e controles saudáveis foram os genes B2M (beta-2-microglobulina) e HPRT1 (hipoxantina fosforibosiltransferase 1). Já para o estudo de intervenção os dois genes com maior estabilidade para o estudo foram os genes HPRT1 e ACTB (beta-actina).

Os coeficientes foram considerados adequados para a condução dos experimentos, pois estavam dentro do valor de estabilidade de expressão aceitável para matrizes complexas ($M \leq 1$), como o sangue, de acordo com Hellemans e colaboradores (2007).

3.2.16 Avaliação da citotoxicidade de células NK

O ensaio de avaliação de citotoxicidade das células NK foi realizado conforme metodologia previamente descrita por Shade e colaboradores (2004) e Valiathan e colaboradores (2012).

a) Preparação das células efectoras (mononucleares do sangue periférico – CMSP)

Os CMSP foram quantificados em contador de células ABX Vet (*Horiba Medical, Irvine, USA*) e, em seguida, foi preparada uma suspensão de células contendo 4×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 (sem vermelho de fenol) contendo 10% de soro fetal bovino.

b) Determinação de população de células NK na amostra de CMSP

A proporção de células NK foi obtida por citometria de fluxo, utilizando os marcadores CD56, CC16, CD3 e CD45, marcados respectivamente com os fluorocromos PE, PE, APC e FITC (*BD Biosciences, San Jose, USA*). As células NK são identificadas como CD56⁺/CD3⁻ ou CD16⁺/CD3⁻. A adição de CD45 ao ensaio seleciona a população de leucócitos eliminando a interferência de hemácias e outras partículas, tais como restos celulares. Um exemplo de resultado obtido é mostrado na **Figura 8**.

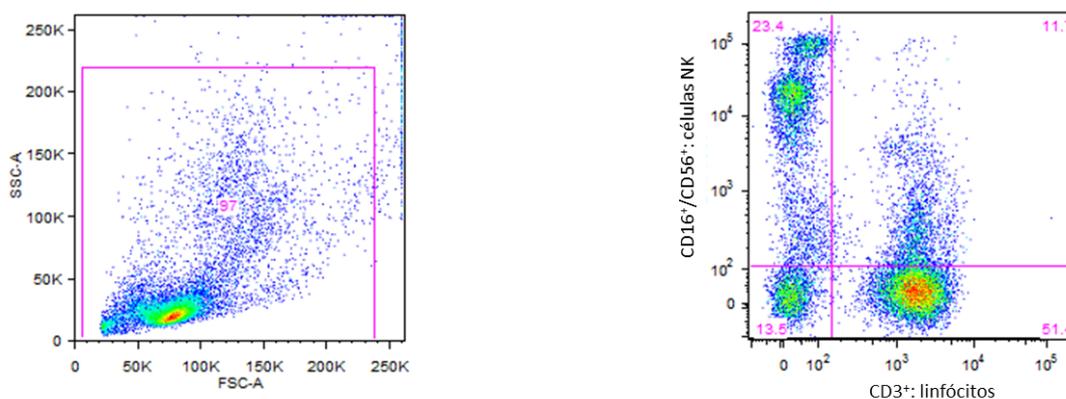


Figura 8. Exemplo de resultado da separação de população de células NK usando citometria de fluxo

A amostra de CMSP contém linfócitos e monócitos, então o número absoluto de células NK foi calculado multiplicando-se a soma dos linfócitos e monócitos obtidos no hemograma pelo índice de células NK obtido na citometria de fluxo, conforme a fórmula abaixo:

Total de células NK (células/ μ L) = (Linfócitos/ μ L+ Monócitos/ μ L) x índice de células NK

c) Preparação das células alvo (K-562)

As células K-562 (linhagem celular de eritroleucemia), utilizadas na avaliação da citotoxicidade de NK, foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementados com

10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 48-72h.

As células usadas no ensaio de citotoxicidade encontravam-se em fase logarítmica de crescimento. No dia de cada ensaio, uma alíquota de células foi lavada duas vezes com tampão PBS/BSA a 1%. Então, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma suspensão de 2x10⁶ células/ mL. Para 1mL desta suspensão, foram adicionados 4µL de solução corante DiO (3,3' - dioctadeciloxacarbocianine perclorato). As amostras foram incubadas por 20 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente à incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS/BSA a 1% e foram preparadas alíquotas contendo 1x10⁶ células/mL.

d) Ensaio de citotoxicidade das células NK

O ensaio de citotoxicidade das células NK foi realizado em duplicata e em diversas proporções célula efetora (CMSP)/ célula alvo (K-562), como apresentado no **Quadro 6**. Para preparar estas proporções, partiu-se de uma suspensão de CMSP de concentração 4x10⁶ células/mL, sendo transferidas alíquotas para tubos de polipropileno de citometria de fluxo (em duplicata).

Quadro 6. Esquema de preparação das proporções células efetoras/ células alvo, para o ensaio de citotoxicidade das células NK

Proporção	25/ 1	12,5/ 1	6,25/ 1	3,125/ 1
Suspensão de CMSP	125 µL	62,5 µL	31,3 µL	15,7 µL
RPMI 1640 com 10% SFB	125 µL	187,5 µL	218,7 µL	234,3 µL
K-562 marcadas com DiO (1x10⁶ cél/mL)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Iodeto de propídio 0,15 nM	130 µL	130 µL	130 µL	130 µL

CMSP - células mononucleares do sangue periférico; RPMI: meio de cultura; SFB: soro fetal bovino; K-562: células de linhagem eritroleucêmica; DiO: perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianine.

Foram realizadas preparações de controles contendo somente CMSP (com e sem PI) para avaliar a viabilidade dos mesmos; e contendo somente células K-562,

com e sem PI, para servir de controle basal de lise e com e sem DiO para avaliação da qualidade da marcação com corante DiO, conforme **Quadro 7**.

Quadro 7. Esquema de preparação dos controles para o ensaio de citotoxicidade das células NK

Preparação	K-562	K-562 + PI	K-562 + DiO	K-562 + DiO + PI	CMSP	CMSP + PI
RPMI	140 µL	140 µL	140 µL	140 µL	140 µL	140 µL
K-562 com DiO			40 µL	40 µL		
K-562 sem DiO	40 µL	40 µL				
CMSP					40 µL	40 µL
PI 0,15nM		130 µL		130 µL		130 µL

RPMI – meio de cultura; K-562 – células da linhagem K-562; DiO – perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina; CMSP: Células mononucleares do sangue periférico; PI: iodeto de propídio.

Os tubos foram homogeneizados suavemente e centrifugados a 500rpm/ 10 segundos e incubados por 2h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, os tubos foram homogeneizados delicadamente e foi realizada a análise no citômetro de fluxo FACS Canto II (*BD Biosciences, San Jose, USA*). Um total de 20.000 eventos foi adquirido por amostra.

A adição de iodeto de propídio (PI) avaliou a perda de viabilidade celular antes e após o ensaio. O PI é um composto fluorescente altamente solúvel em água que se liga diretamente ao DNA intercalando-se entre as bases nitrogenadas, com pouca ou nenhuma preferência por alguma sequência específica; no entanto, não consegue ultrapassar membranas intactas, sendo, portanto, excluído de células viáveis. A perda da integridade de membrana é determinada quando a fluorescência emitida pelo PI aumenta.

O resultado de um controle de marcação das células K-562 com DiO é mostrado na **Figura 9**.

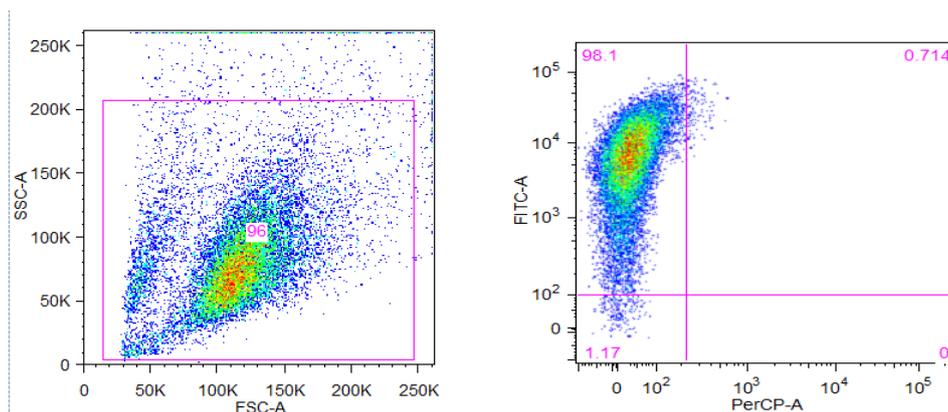


Figura 9. Marcação das células K-562 com 3mM de DiO (perclorato de 3,3'-diocetadeciloxacarbocianina), no analisador FACS Canto. Observa-se marcação de 98,1% das células pelo corante e baixa taxa de lise celular basal (0,7%)

O DiO emite fluorescência verde que é lida no canal FITC do citômetro, enquanto o iodeto de propídio emite fluorescência vermelha que é lida no canal PerCP. Foram contados 20.000 eventos

Desse modo, a população de células K-562 mortas foi definida como aquela que apresentava dupla marcação (DiO⁺ e PI⁺) (**Figura 10**). Para o cálculo da lise celular, foi utilizada a fórmula: $(\text{Células DiO}^+ \text{ PI}^+ / \text{Total de células DiO}^+) \times 100$. O DiO emite fluorescência verde, que é lida no canal FITC do citômetro, enquanto o PI emite fluorescência vermelha, lida no canal do PerCP do citômetro. Um modelo de distribuição das populações no ensaio de citotoxicidade no citômetro de fluxo é apresentada na **Figura 10**.

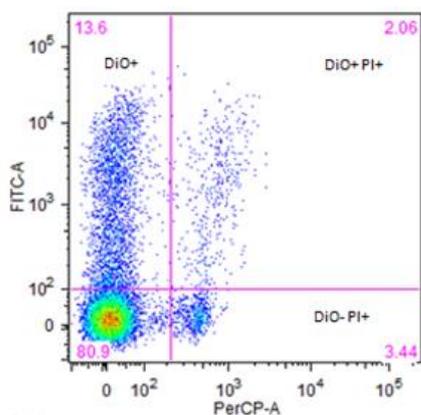


Figura 10. Análise do experimento de citotoxicidade, em citômetro FACS Canto, mostrando a distribuição das populações estudadas

DiO⁻: Células mononucleares do sangue periférico;
DiO⁺: Células K-562; PI⁺: células mortas

A partir dos resultados de porcentagem de lise de cada proporção células efetoras (E)/ células alvo (T), foi calculado a Unidade Lítica 15% (UL15%). Para isso, foi construída uma curva de regressão linear usando o log E:T versus a porcentagem

de lise para cada paciente, com o intuito de determinar o número de células efetoras necessárias para lisar 15% das células alvo. A UL15% é inversamente proporcional à potência citotóxica das células estudadas.

Com os dados da UL15%, foi determinada a Atividade Lítica, representada pelo número de unidades líticas em 10 milhões de células (10^7). Para este cálculo, foi dividido 10^7 pela UL15%. Desta forma, a atividade lítica é diretamente proporcional à potência citotóxica das células NK. A capacidade citotóxica das células NK foi obtida dividindo-se o número absoluto de células NK/ mL de sangue pela UL15%.

3.2.17 Extração de DNA

O DNA dos leucócitos foi obtido como descrito no protocolo do fabricante Gentra Puregene® (QIAGEN, Valencia, USA) utilizando a camada de leucócitos de uma alíquota de 10mL de sangue coletado com heparina. Depois da extração o DNA foi ressuspendido em 200 μ L de solução de desferroxamina 0,1mM e mantido em geladeira *overnight*. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm e a pureza do DNA determinada pela relação A260nm/ A280nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

3.2.18 Avaliação da taxa de metilação global do DNA

a. Hidrólise enzimática

Para hidrólise enzimática, foram adicionados 50 μ g da amostra de DNA em solução de desferroxamina, em 3,75 μ L de tampão tris-HCl/ MgCl₂ (200mM, pH-7,4), 6,5 unidades de DNase I. As amostras foram incubadas a 37°C, 90 rpm por 1 hora. Posteriormente, foram adicionadas 0,005 unidades de fosfodiesterase I e 6,5 unidades de fosfatase alcalina, continuando a incubação por mais 1h a 37°C 90 rpm. Após a segunda incubação, as amostras foram centrifugadas 14.000 rpm / 10 min. Alíquotas de 7 μ L da amostra foram injetadas no sistema de HPLC-UV para quantificação das bases normais e da taxa de metilação global.

b. Quantificação

A quantificação de 5-metil-2'-desoxicitidina (5-mdC) e dos 2'-desoxinucleotídeos normais foi realizada com um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlado por um método de comunicação CBM-20a. Os dados foram processados pelo software LC-Solution. A coluna foi eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH, pH 2,6, sendo possível visualizar uma clara separação entre a 5-metil-dC ($\lambda_{\text{máx}} = 286\text{nm}$) e os outros desoxinucleosídeos.

O sistema de eluição utilizado foi: coluna Luna C18 (*Phenomenex, Torrance, CA*) de 250mm x 4,6mm, 5 μm acoplada a uma coluna guarda C18 (4,0 x 3,0mm, 4 μm) (*Phenomenex, Torrance, CA*), eluído com um gradiente de ácido fórmico 0,1% e metanol (de 0 a 25 minutos, 0 a 18% metanol; de 25 a 27 minutos, 18 a 0% metanol; de 27 a 37%, 0% de metanol), com fluxo de 1 mL/minuto a 30°C. O detector PDA foi fixado em 286nm para a detecção de 5-mdC e a 260nm para os desoxinucleosídeos normais. Curvas de calibração foram construídas com padrão puro dissolvido em água com intervalo de 0,01-0,8nmol para 5-mdC e 0,5-8nmol para desoxinucleosídeos normais (dC e dG), preparados no mesmo dia do experimento. A porcentagem de metilação global do DNA foi calculada usando a seguinte equação: $5\text{-mdC (\%)} = \frac{\text{nmol } 5\text{-mdC}}{\text{nmol } 5\text{-mdC} + \text{nmol dC}} \times 100$. Um exemplo de cromatograma obtido na determinação da taxa de metilação global é demonstrado na **Figura 11**.

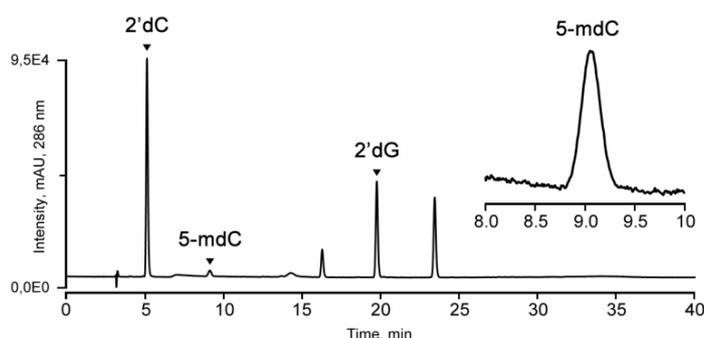


Figura 11. Exemplo de cromatograma obtido na determinação da taxa de metilação do DNA, através da quantificação de 5-metildeoxicitosina (5-mdC)

2'dC: 2'-deoxicitosina; 2'dG: 2'-deoxiguanosina.

3.2.19 Avaliação antropométrica

Para avaliação do peso corporal, foi utilizada uma balança eletrônica do tipo plataforma, com capacidade para 150 kg, sensibilidade de 100 gramas, da marca TANITA®. Os indivíduos foram pesados com roupas leves e descalços, posicionados em postura ereta, com os pés inteiramente compreendidos na plataforma da balança, de forma paralela, com braços ao longo do corpo e olhar no horizonte. Para a aferição da altura foi utilizado um estadiômetro com escala em milímetros, da marca Seca *bodometer* 208®, fixado na parede. O índice de massa corporal foi calculado pela fórmula (peso corporal / altura²).

3.2.20 Avaliação do consumo alimentar

Para a avaliação do consumo alimentar, realizou-se o recordatório de 24 horas (R24h), aplicado segundo o método *Multiple Pass*, cuja entrevista é estruturada em cinco etapas (Moshfegh *et al.*, 1999; Moshfegh *et al.*, 2001). Em relação aos pacientes com esferocitose hereditária, β -talassemia heterozigótica e indivíduos saudáveis (controles), foram coletados dois R24h. O primeiro R24h foi obtido por entrevista pessoal no dia da coleta de sangue e a segunda replicata foi obtida por telefone após intervalo médio de quatro meses. Considerando os indivíduos saudáveis incluídos no estudo prospectivo, em cada tempo do estudo, dois R24h foram obtidos por meio de entrevista pessoal, sendo o primeiro realizado no dia da coleta de sangue e o segundo em dias não consecutivos. Os R24h foram representativos de todos os dias da semana, incluindo os dias do final de semana.

Os alimentos e as preparações citadas nos R24h foram quantificados em gramas com o auxílio de tabelas e manuais específicos (Fisberg e Villar, 2002; Unicamp, 2006; Pinheiro *et al.*, 2008; Marchioni e Fisberg, 2014). Os dados de consumo alimentar foram convertidos em valores de energia e nutrientes por meio do *software Nutrition Data System for Research – NDSR* versão 2014, desenvolvido pelo *Nutrition Coordinating Center (NCC)*, (*University of Minnesota, Minneapolis, MN*).

Este programa tem como principal base de dados a tabela do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Diferentemente dos programas e tabelas nacionais, possui a vantagem de considerar os valores de folato em equivalentes de folato dietético (*dietary folate equivalents* - DFE) e permite a diferenciação da

biodisponibilidade do folato, presente naturalmente nos alimentos e do folato sintético (ácido fólico), adicionado aos alimentos fortificados (Suitor e Bailey, 2000; Steluti *et al.*, 2011).

Os valores de ferro e folato sintético, e conseqüentemente os valores de DFE, foram corrigidos conforme a fortificação mandatária em farinhas de trigo e milho (150 mcg de AF e 4,2 mg de ferro para cada 100 g de farinha), vigente no Brasil desde 2004 (Brasil, 2002).

O ajuste da distribuição da ingestão pela variabilidade intrapessoal foi realizado utilizando o software *Multiple Source Method (MSM)* (*Department of Epidemiology of the German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbrücke (DIfE)*® 2008-2011 *Version 1.0.1*), que produz estimativas acuradas da distribuição do consumo habitual dos nutrientes para a análise descritiva dos mesmos (Harttig *et al.*, 2011; Souverein *et al.*, 2011). Para as análises de correlação, os dados de consumo habitual dos nutrientes foram ajustados pela energia utilizando o método dos resíduos proposto por Willett *et al.*, 1997 (Willett, Howe e Kushi, 1997).

3.2.21 Caracterização geral dos indivíduos estudados

Nos dias de coleta de amostras, foi aplicado um questionário com as seguintes informações: nome, endereço, idade, gênero, peso, altura, cor de pele declarada, ocupação, uso de tabaco e bebidas alcólicas, uso de medicamentos, doenças crônicas e transfusão / doação de sangue.

3.2.22 Análises Estatísticas

O banco de dados foi construído no SPSS versão 22.0. As análises foram realizadas no SPSS e Graphpad Prism versão 5.0.

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas, apresentando o número de indivíduos e frequência em porcentagem entre parênteses.

O teste de Qui-quadrado, ou o teste Likelihood ratio e teste Exato de Fisher foram utilizados para analisar as frequências das variáveis categóricas (cor da pele declarada, tabagismo e uso de bebidas alcólicas).

Testes de correlação de Spearman foram realizados entre diversas variáveis.

Para as variáveis numéricas, adotou-se como padrão, a apresentação das medianas e intervalos interquartílicos em tabelas e figuras, sem transformação logarítmica dos dados, uma vez que algumas variáveis não apresentaram distribuição normal.

Para comparar os valores das variáveis numéricas entre os grupos, foram utilizados os testes: Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Friedman. Quando houve diferença significativa, nos testes de Kruskal-Wallis e Friedman, foi realizado o teste de múltiplas comparações para detectar qual grupo era diferente utilizando o teste de Dunn`s.

Vários modelos de regressão linear univariadas foram utilizados para as variáveis dependentes transformadas a logaritmo neperiano (Ln). Estas variáveis não apresentavam distribuição normal dos dados, porém após a transformação logarítmica houve a correção destas distribuições. Nos modelos de regressão linear univariadas que incluíram as variáveis dependentes: Ln do número de células NK, Ln dos valores da atividade lítica e Ln da capacidade citotóxica, foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: Ln dos valores do folato sérico (microbiológico), Ln dos valores do folato sérico total (LCMS/MS), Ln dos valores de UMFA e Ln para os valores de folato eritrocitário. Estes modelos foram realizados nos grupos em separados, e em alguns momentos, juntando os casos com os controles, chamando neste caso, como grupo total.

Para a taxa de metilação global do DNA, dois subgrupos foram formados a partir da mediana, categorizando deste modo a variável taxa de metilação global do DNA em cada grupo estudado. O subgrupo com os maiores valores da taxa de metilação global do DNA (\geq mediana) foi considerado como “1” e os menores como “0”, na curva ROC. O subgrupo com maiores valores de metilação global do DNA foi utilizado como variável dependente no cálculo da AUC (Area Under Curve), em cada modelo, para cada grupo estudado. As variáveis independentes analisadas em cada modelo foram: consumo de folato na dieta (consumo de folato total ajustado para DFE, folato natural e folato sintético) e os valores de folato (sérico, eritrocitário, UMFA e 5-metil-THF).

Ainda para a variável dependente categorizada “taxas de metilação global do DNA”, foram realizados modelos regressão logística multivariada, incluindo as

seguintes variáveis independentes, também categorizadas segundo os valores das medianas de cada variável: Ln dos valores das expressões do RNAm da DHFR, Ln dos valores das expressões do RNAm da MTHFR, Ln dos valores das expressões do RNAm da IFN- γ , Ln dos valores das expressões do RNAm da TNF- α e Ln dos valores das expressões do RNAm da IL-8.

Decidiu-se também, classificar o grupo de pacientes EH, e também o β -TH, em dois subgrupos segundo a mediana de UMFA ($<$ e \geq mediana) e verificar se havia diferença entre os diversos parâmetros (concentrações de: vitaminas, tHcy, citocinas; expressão de RNAm dos diversos genes estudados, parâmetros hematológicos e bioquímicos, e metilação global do DNA. Também foram avaliadas se haviam diferenças entre os mesmos parâmetros comparando-se o 1º tercil (menores valores) com o 3º tercil (maiores valores) de UMFA nos diversos grupos.

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

Critérios adotados:

Foi considerado deficiência de folato concentrações de folato sérico inferiores a 13,6nmol/L e concentrações suprafisiológicas aquelas com folato sérico superior a 45nmol/L. As concentrações aumentadas de tHcy plasmáticas foram definidas como aquelas superiores a 13,9 μ mol/L.

Os dados de UMFA de 78 indivíduos saudáveis que participaram do estudo de intervenção foram apresentados na Parte 4 desta tese. O percentil 90 (maiores valores) foi utilizado como valor de corte para caracterizar valores elevados de UMFA ($>1,30$ nmol/L) no presente estudo.

Anemia foi definida como hemoglobina menor que 12g/dL para mulheres e menor que 13g/dL para homens.

4 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em 4 partes, a saber:

4.1 Estudo dos 27 pacientes com esferocitose hereditária e seus 54 controles

4.2 Estudo dos 50 indivíduos com β -talassemia heterozigótica e seus 100 controles

4.3 Estudo com 30 indivíduos saudáveis submetidos à intervenção com 5mg/dia de ácido fólico

4.4 Valores de referência obtidos em 78 indivíduos saudáveis para as concentrações de vitaminas e tHcy

4.1 Estudo dos 27 pacientes com esferocitose hereditária e seus 54 controles

As características gerais dos pacientes com esferocitose hereditária (EH) e seus controles saudáveis estão apresentadas na **Tabela 1**.

A maioria dos pacientes EH (85,2%) declararam estar fazendo uso diário de 5mg de AF como terapêutica. Três deles, apesar de ter dito estar tomando 5mg de AF diariamente, apresentaram concentrações muito baixas de folato sérico e UMFA (**Figura 13**).

Os demais EH e os controles saudáveis não fizeram uso de AF ou polivitamínicos pelo menos nos três meses anteriores a coleta de sangue.

Tabela 1. Características gerais dos pacientes com esferocitose hereditária e seus controles

	Esferocitose Hereditária N= 27	Controle # N= 54	P valor
Idade (anos)	40 (28-55)	37,5 (28-54,3)	0,829
Gênero Feminino	21 (77,8)	42 (77,8)	1,000*
Cor declarada da pele			
Branca	21 (74,1)	38 (70,4)	0,539**
Negra	2 (7,4)	3 (5,6)	
Parda	4 (14,8)	11 (20,4)	
Amarela	0	2 (3,7)	
IMC (kg/m²)	23,7 (21,4-25,3)	24,0 (21,9-26,4)	0,634
Uso de ácido fólico (AF) 5mg/dia	23 (85,2)	0	<0,001*
Fumantes	2 (7,4)	7 (13,0)	0,453*
Esplenectomizados	2 (7,4)	0	0,108***

IMC: índice de massa corporal. # Os indivíduos controles saudáveis foram pareados aos pacientes com EH, quanto a idade, índice de massa corporal (IMC), gênero e cor de pele declarada. As variáveis numéricas (idade e IMC) foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses). Os grupos foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney. As variáveis categóricas (gênero, cor da pele, uso de AF e fumantes) foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses. Os grupos foram comparados usando os testes: * Teste Qui-Quadrado, **Teste Likelihood ratio, *** Teste Exato de Fisher. Em negrito foram apresentados os P<0,05.

Todos os pacientes EH apresentaram concentrações de hemoglobina superiores a 8 g/dL, sendo a esferocitose por este critério classificada como leve a moderada. Quando se utilizou como parâmetro as taxas de reticulocitose, 25 (92,6%) dos pacientes foram classificados como tendo esferocitose leve a moderada, enquanto 2 (7,4) foram classificados como moderadamente grave a grave, de acordo com os critérios propostos por Perrotta, Gallagher e Mohandas (2008).

Vitaminas e homocisteína total (tHcy)

As concentrações de folato sérico, eritrocitário, UMFA e as formas 5-metil-THF, 5-formil-THF e 5,10-metenil-THF foram maiores no grupo EH quando comparadas com as concentrações no grupo controle (**Tabela 2**). As concentrações séricas e eritrocitárias de folato foram, respectivamente, 2,1 e 1,7 vezes maiores no grupo EH comparado ao controle.

As frequências de concentrações elevadas de ácido fólico; de deficiência desta vitamina; e de UMFA aumentado também estão apresentadas na **Tabela 2**.

As concentrações de folato sérico e eritrocitário pelo método microbiológico e de folato sérico total, UMFA e 5-metil-THF por LC-MS/MS estão apresentadas na **Figura 12**. As concentrações suprafisiológicas de folato (>45nmol/L) foram apresentadas na **Tabela 2** de acordo com o método utilizado para determinação do folato no soro (microbiológico ou LCMS/MS). O grupo EH apresentou elevadas concentrações de folato sérico, sendo que 5 (18,5%) indivíduos tinham concentrações superiores a 100nmol/L e 1 (3,7%) indivíduo apresentou concentração de 407nmol/L (**Tabela 2 e Figura 12**).

Não foi observada diferença entre os grupos para as concentrações de vitamina B₁₂ e de tHcy (**Tabela 2 e Figura 13**).

Tabela 2. Concentrações das vitaminas e de homocisteína total nos grupos esferocitose hereditária e controles

	Esferocitose Hereditária N=27*	Controles N=54*	P valor
Folato sérico (nmol/L) ¹	51,1 (20,2-93,2)	24,4 (14,5-39,8)	0,002
Concentrações suprafisiológicas (>45,0 nmol/L) ¹	15 (55,5)	7 (12,9)	<0,001*
Deficiência (<13,6nmol/L) ¹	5 (18,5)	12 (22,2)	0,700*
Folato eritrocitário (nmol/L) ¹	947 (535-2248)	569 (368-727)	0,003
Folato sérico total (nmol/L) ²	73,8 (32,1-144,0)	31,5 (24,1-41,8)	<0,001
Concentrações suprafisiológicas (>45,0 nmol/L) ²	20 (74,1)	9 (16,7)	<0,001*
Deficiência (<13,6nmol/L) ²	1 (3,7)	2 (3,7)	1,000**
UMFA (nmol/L) ²	3,78 (1,08-69,00)	0,75 (0,60-0,98)	<0,001
UMFA aumentado (>1,30 nmol/L) ²	20 (74,1)	5 (9,3)	<0,001*
5-metil-THF (nmol/L) ²	62,3 (29,9-78,2)	29,3 (22,1-39,0)	<0,001
5-formil-THF (nmol/L) ²	0,19 (0,13-0,31)	0,11 (0,05-0,13)	<0,001
5,10-metenil-THF (nmol/L) ²	0,02 (0,01-0,03)	0,09 (0,07-0,10)	<0,001
THF (nmol/L) ²	1,15 (0,78-1,47)	0,95 (0,72-1,06)	0,087
Mefox (nmol/L) ²	7,93 (3,77-11,1)	1,28 (0,74-2,34)	<0,001
Vitamina B ₁₂ (pmol/L) ¹	391 (254 – 494)	386 (253 – 502)	0,912
Homocisteína total (µmol/L) ³	9,1 (7,2 – 10,6)	9,4 (8,6 – 11,4)	0,207

¹Microbiológico; ²LC/MS-MS; ³Quimioluminescência; UMFA: ácido fólico não metabolizado; THF: tetraidrofolato; Mefox: produto da oxidação do 5-metil-THF. *Para o folato eritrocitário, esferocitose hereditária N=26 e controles N=45 e para a forma 5,10-metenil-THF, esferocitose hereditária N=25 e controles N=18. As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses e os grupos foram comparados usando os testes Qui-Quadrado* ou teste Exato de Fisher**. O valor de corte para caracterizar os valores aumentados, no nosso estudo, foi obtido a partir do P90 dos valores obtidos nos indivíduos saudáveis utilizados como controles. Em negrito foram apresentados os valores de P<0,05.

Método microbiológico (A e B)

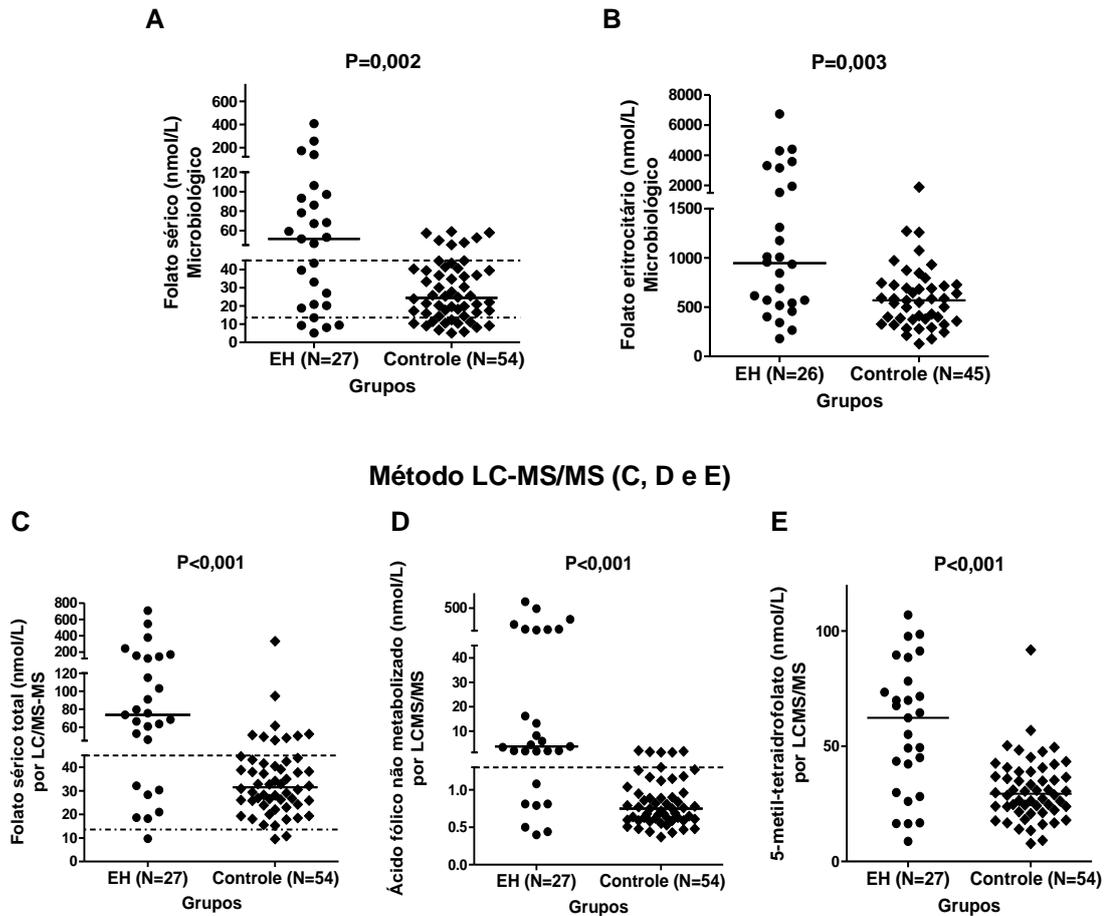


Figura 12. Concentrações de folato sérico por método microbiológico (A), folato eritrocitário (B), folato sérico total por LC-MS/MS (C), ácido fólico não metabolizado (D) e 5-metil-tetraidrofolato (E) no grupo esferocitose hereditária (EH) e controle

As linhas tracejadas horizontais correspondem aos valores de corte de deficiência e/ou concentrações suprafisiológicas de folato e às concentrações aumentadas de UMFA

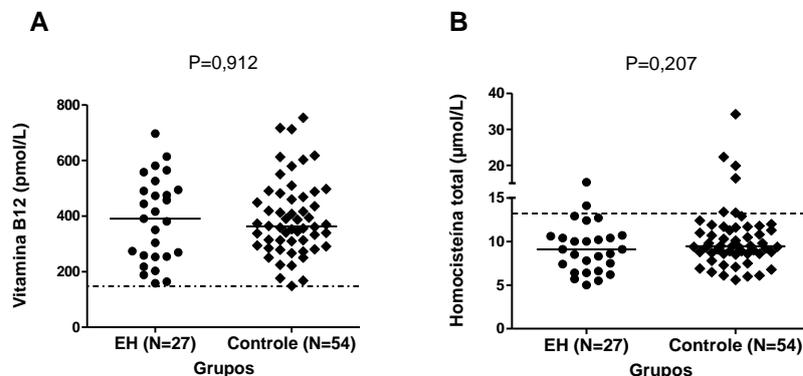


Figura 13. Concentrações séricas de vitamina B₁₂ (A) e plasmáticas de homocisteína total (B) no grupo esferocitose hereditária (EH) e controle

As linhas tracejadas horizontais correspondem aos valores de corte para deficiência de vitamina B₁₂ (A) e valores elevados de homocisteína total (B). O valor de corte para caracterizar os valores aumentados de tHcy foi obtido a partir do P90 dos valores obtidos nos indivíduos saudáveis controles

As correlações de Spearman entre as concentrações de folato sérico pelo método microbiológico e de folato sérico total e outras formas de folato por LC-MS/MS nos grupos EH e controle estão apresentadas na **Tabela 3**. É importante ressaltar as correlações significantes entre as concentrações de folato sérico determinadas por método microbiológico e as concentrações de folato sérico total determinadas por LC-MS/MS nos dois grupos avaliados (**Tabela 3**).

Tabela 3. Correlações de Spearman entre os valores de folato sérico determinados pelo método microbiológico e folato sérico total e suas formas determinados por LC-MS/MS

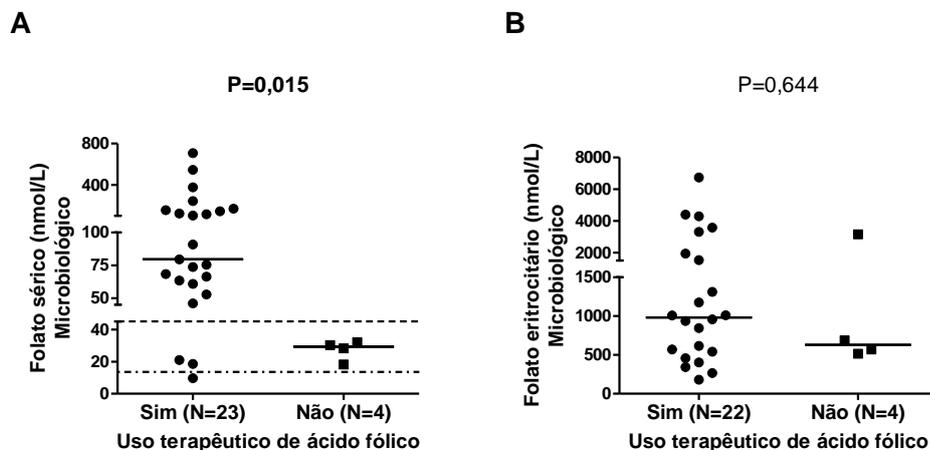
	MÉTODOS MICROBIOLÓGICO	
	Folato sérico nmol/L	
	Esferocitose Hereditária	Controle
MÉTODOS LC-MS/MS		
Folato sérico total (nmol/l)	r=0,98; P<0,001; N=27	r=0,89; P<0,001; N=54
UMFA (nmol/L)	r=0,83; P<0,001; N=27	r=0,29; P=0,032; N=54
5-metil-THF (nmol/L)	r=0,82; P<0,001; N=27	r=0,91; P<0,001; N=54
5-formil-THF (nmol/L)	r=0,21; P=0,296; N=27	r=-0,10; P=0,693; N=18
THF (nmol/L)	r=0,34; P=0,083; N=27	r=0,38; P=0,005; N=54
5,10-metilenil-THF (nmol/L)	r=0,55; P=0,004; N=25	r=-0,06; P=0,667; N=53
MeFox (nmol/L)	r=0,30; P=0,125; N=27	r=0,38; P=0,005; N=54

UMFA: ácido fólico não metabolizado; THF: tetraidrofolato; MeFox: produto da oxidação do 5-metil-THF. As correlações significantes foram apresentadas em negrito

Na **Figura 14** estão apresentados os valores de folato sérico e folato eritrocitário determinados pelo método microbiológico; e também folato sérico total, UMFA e 5-metil-THF determinados por LC-MS/MS de acordo com o uso terapêutico ou não de AF declarado pelos pacientes.

A mediana e o intervalo interquartil das concentrações de UMFA nos pacientes que fizeram uso de 5mg/dia de AF foi de 5,94 (1,92 – 76,10) nmol/L, enquanto que nos 4 pacientes com EH, que declararam não terem feito uso da vitamina, estes valores foram de 0,65 (0,46 – 1,0) nmol/L.

Método microbiológico (A e B)



Método LC-MS/MS (C, D e E)

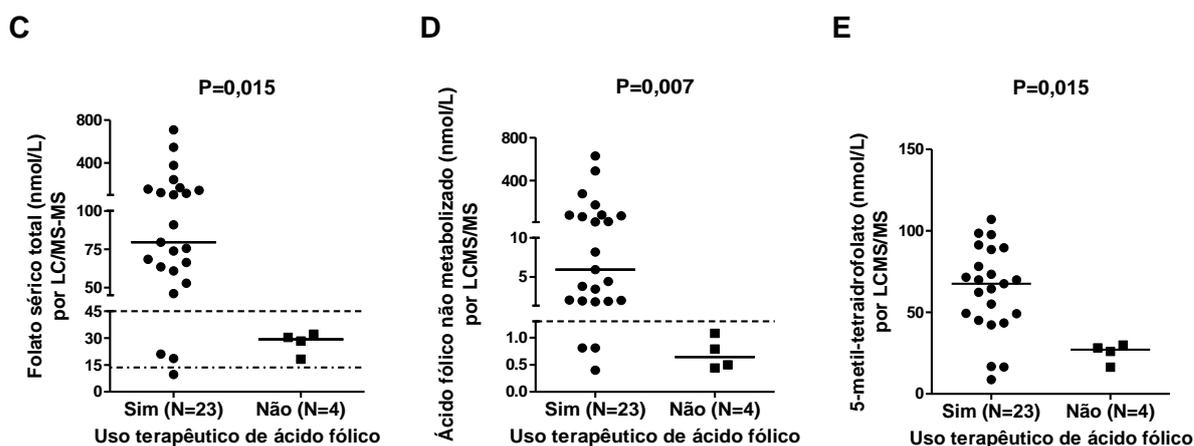


Figura 14. Concentrações de folato sérico por método microbiológico (A), folato eritrocitário (B), folato sérico por LC-MS/MS (C), ácido fólico não metabolizado (D) e 5-metil-tetraidrofolato (E) em pacientes com esferocitose hereditária segundo o uso terapêutico de ácido fólico no momento da coleta de sangue

As linhas tracejadas horizontais correspondem aos valores de corte de deficiência e/ou concentrações aumentadas

Na **Figura 15** estão apresentadas as concentrações de vitamina B12 sérica e tHcy plasmática de acordo com o uso terapêutico ou não de AF.

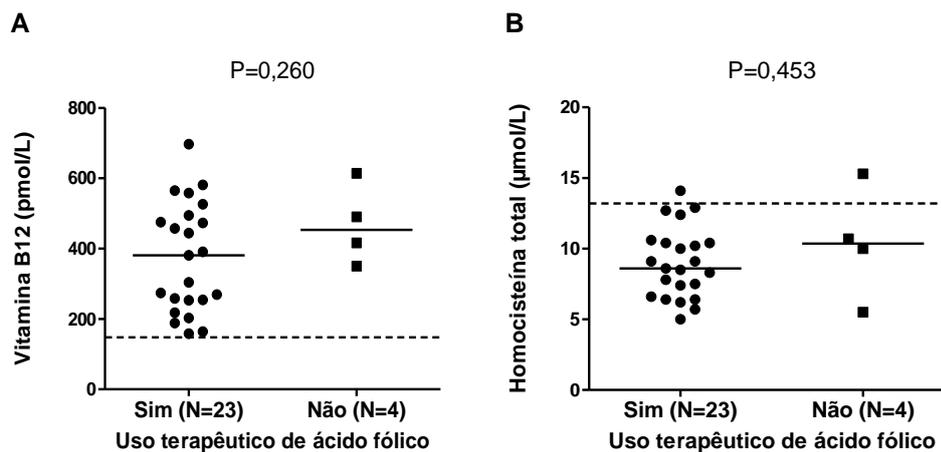


Figura 15. Concentrações séricas de vitamina B₁₂ (A) e plasmáticas de homocisteína total (B) no grupo esferocitose hereditária de acordo com o uso terapêutico diário ou não uso de AF

As linhas tracejadas horizontais correspondem aos valores de corte para deficiência de vitamina B₁₂ (A) e valores elevados de homocisteína total (B)

O consumo alimentar dos indivíduos incluídos no estudo está apresentado na **Tabela 4**. Os grupos EH e controle foram semelhantes em relação ao consumo alimentar considerando o valor calórico total, macronutrientes e micronutrientes, incluindo o consumo de folato de fontes naturais e sintético.

Foi observado uma correlação direta entre o consumo de folato sintético na dieta e as concentrações de UMFA ($r=0,230$, $P=0,040$, $N=80$), quando considerado o grupo total (EH + controles). Porém, quando analisados separadamente cada um dos grupos, não foi observada correlação significativa.

Tabela 4. Consumo alimentar de pacientes com esferocitose hereditária e seus controles

Energia, macronutrientes e nutrientes*	Esferocitose Hereditária N= 27	Controles N= 54	P valor
Energia (Kcal/dia)	1827,45 (1411,14 – 2336,04)	1909,05 (1577,04 – 2222,83)	0,806*
Carboidratos totais (g/dia)	249,28 (189,75 – 294,35)	244,09 (191,74 – 294,19)	0,792*
Proteínas Totais (g/dia)	73,91 (67,17 – 105,41)	76,25 (66,50 – 95,42)	0,867**
Proteínas animais (g/dia)	48,98 (46,81 – 66,47)	51,70 (42,96 – 68,37)	0,875**
Proteínas vegetais (g/dia)	26,48 (18,29 – 30,46)	24,03 (20,23 – 29,27)	0,650*
Gorduras Totais (g/dia)	61,80 (47,95 – 82,84)	66,10 (55,86 – 81,82)	0,390**
ÁG saturados (g/dia)	20,99 (15,21 – 28,21)	23,40 (18,76 – 30,28)	0,366*
ÁG monoinsaturados (g/dia)	21,75 (16,78 – 27,47)	22,73 (19,88 – 28,59)	0,297**
ÁG polinsaturados (g/dia)	15,65 (11,66 – 18,63)	14,78 (12,54 – 17,54)	0,835**
Colesterol (mg/dia)	257,29 (202,42 – 307,80)	253,73 (215,28 – 296,92)	0,805*
Fibras totais (g/dia)	17,08 (11,44 – 19,12)	16,13 (13,74 – 20,20)	0,472*
Ferro (mg/dia)	10,43 (8,28 – 13,57)	10,60 (8,67 – 12,69)	0,829*
Vitamina B2 (mg/dia)	1,52 (1,27 – 1,96)	1,56 (1,43 – 1,80)	0,742*
Vitamina B6 (mg/dia)	1,71 (1,12 – 2,03)	1,56 (1,21 – 2,03)	0,780**
Folato (µg DFE/dia) ¹	423,97 (351,33 – 501,66)	408,72 (338,45 – 499,88)	0,773*
Folato natural (µg/dia)	199,88 (173,24 – 225,74)	191,59 (172,25 – 231,91)	0,868*
Folato sintético (µg /dia)	128,22 (108,04 – 167,64)	116,00 (90,42 – 170,98)	0,553*
Vitamina B ₁₂ (µg /dia)	4,05 (2,89 – 4,56)	3,67 (3,06 – 4,78)	0,695**
Betaína (mg/dia)	107,82 (79,05 – 154,57)	119,25 (94,65 – 187,70)	0,270**
Colina (mg/dia)	302,67 (252,05-393,44)	305,75 (268,16 – 377,26)	0,891**
Metionina (g/dia)	1,72 (1,55 – 2,35)	1,77 (1,51 – 2,22)	0,980**

AG: ácidos graxos; * Considerado valor deatenuado pela remoção da variabilidade intrapessoal. Os valores apresentados são a mediana e intervalo interquartilico, entre parênteses. ¹Apresentado como equivalente de folato dietético (*dietary folate equivalents* – DFE). 1 DFE = 1 µg de folato natural presente nos alimentos = 0,6 µg de folato sintético proveniente dos alimentos fortificados. Os grupos foram comparados utilizando os testes * test t-Student e ** teste de Mann-Whitney.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os dados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos pacientes com EH e seus controles estão apresentados na **Tabela 5**. As diferenças encontradas nos parâmetros hematológicos no grupo EH comparado com o grupo controle é compatível com o quadro hematológico de EH. A maior atividade de LDH no grupo EH é esperado em função da maior hemólise nesse grupo.

Tabela 5. Valores hematológicos e bioquímicos dos pacientes com esferocitose hereditária e seus controles

	Esferocitose Hereditária N= 27	Controles N= 54	P valor
Eritrócitos x10 ⁶ /μL	3,47 (3,23-3,98)	4,45 (4,21-4,73)	<0,001
Hemoglobina (g/dL)	11,3 (9,6-12,3)	13,4 (12,6-14,3)	<0,001
Presença de anemia	21 (77,8)	3 (5,6)	< 0,001
Hematócrito (%)	31,5 (28,1-35,5)	39,1 (37,7-41,8)	<0,001
VCM (fL)	88,4 (84,7-95,9)	90,4 (86,5-92,2)	0,779
HCM pg/mL	31,5 (29,1-33,4)	30,4 (29,2-31,3)	0,130
CHCM (%)	34,9 (34,0-35,6)	33,9 (33,3-34,6)	0,001
RDW	19,1 (14,9-22,2)	13,2 (12,9-13,9)	<0,001
Reticulócitos (%)	6,9 (3,0-8,7)	0,9 (0,7-1,1)	<0,001
Leucócitos x10 ³ /μL	9,1 (6,6-11,8)	6,6 (5,3-7,6)	0,001
Plaquetas x10 ³ /μL	186 (166-275)	222 (194-250)	0,602
LDH (U/L)	615 (571-698)	401 (352-466)	<0,001

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW: red cells distribution width; LDH: lactato desidrogenase. As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. Os dados relativos a presença de anemia foram apresentados o número de indivíduos e a porcentagem entre parênteses, neste caso foi utilizado o Teste Exato Fischer. Considerou-se anemia quando as concentrações de hemoglobina estavam abaixo de 12g/dL para mulheres e abaixo de 13g/dL para homens. Em negrito foram apresentados os P<0,05.

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre a concentração da PCR ultrasensível nos dois grupos, os pacientes com EH apresentaram maior número de leucócitos (**Tabela 5**) e maiores concentrações séricas de IL-8 e TNF-α (**Tabela 6**) quando comparados aos seus controles, mostrando um processo inflamatório leve.

Somente nos pacientes com EH, houve correlação inversa entre as concentrações de UMFA e IL-10 ($r=-0,488$, $P=0,010$, $N=27$), assim como, correlação inversa entre as concentrações de folato sérico e IL-10 ($r= -0,393$, $P=0,043$, $N=27$) e entre folato sérico e IFN-γ ($r= -0,392$, $P=0,043$, $N=27$).

Tabela 6. Concentrações séricas de marcadores de processo inflamatório em pacientes com esferocitose hereditária e em seus controles

	Esferocitose Hereditária N= 27	Controles N= 54	P valor
PCR Ultrassensível (mg/dL)	0,16 (0,10-0,35)	0,21 (0,08-0,41)	0,492
IL-6 (pg/mL)	1,51 (0,81-1,97)	1,04 (0,66-1,67)	0,096
IL-8 (pg/mL)	19,52 (10,33-85,09)	9,24 (6,11-13,74)	< 0,001
IL-10 (pg/mL)	3,35 (1,69-6,66)	1,96 (0,74-3,90)	0,070
IFN- γ (pg/mL)	5,86 (3,02-7,28)	5,39 (2,98-8,31)	0,612
TNF- α (pg/mL)	9,76 (6,97-17,45)	5,48 (3,76-8,12)	< 0,001

PCR: proteína C reativa; IL: interleucina; IFN- γ ; interferon- γ ; TNF- α ; fator de necrose tumoral- α . As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. Em negrito foram apresentados os valores de $P < 0,05$.

Citotoxicidade das células NK

Para a análise de citotoxicidade das células NK em nosso estudo, foram utilizados os parâmetros: número de células, atividade lítica e capacidade citotóxica das células NK. Foi observado maior quantidade de células NK (mediana: 952; P25-P75: 628-1165 células NK/ μ L) no grupo EH comparado com o número de células NK no grupo controle (mediana: 515; P25-P75: 349-712 células NK/ μ L). Entretanto, mesmo com este aumento no número de células NK no grupo EH, não houve diferença significativa para a atividade lítica e para a capacidade citotóxica das células NK entre os grupos (**Figura 16**).

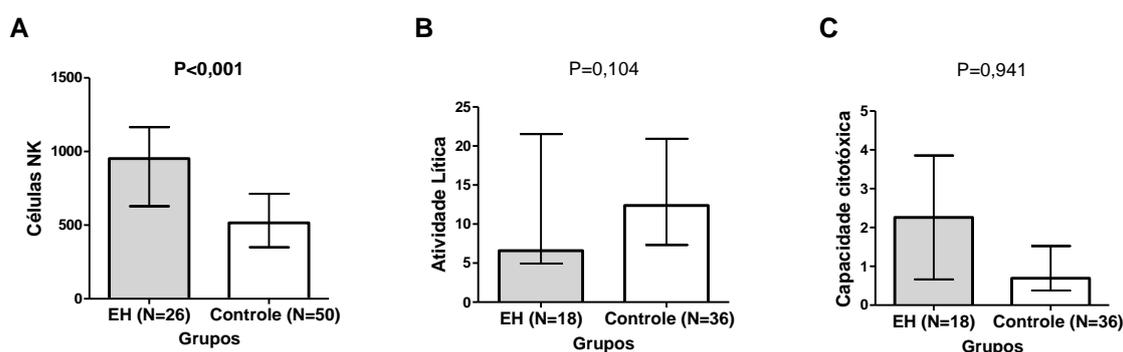


Figura 16. Número de células NK (A); atividade lítica das células NK (B); e capacidade citotóxica das células NK (C) em indivíduos com esferocitose hereditária (EH) e seus controles

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. Em negrito foram apresentados os $P < 0,05$. O número de amostras analisadas são menores devido as dificuldades com a técnica *in vitro*, a qual precisava ser realizada no dia e também devido a quantidade insuficiente de células mononucleares obtidas em alguns indivíduos. Resultados apresentados como células NK/ μ L (A), atividade lítica (10^7 cels/UL15%) (B) e capacidade citotóxica [(células NK/ μ L) / UL15%) (C)

Doze modelos de regressão linear univariada, para a variável dependente: número de células NK, foram realizados nos grupos de pacientes com EH, seus controles e no grupo total (incluindo os dois grupos), e os resultados estão apresentados na **Tabela 7**.

No grupo EH (modelo 4 da **Tabela 7**), o aumento de 1 Ln do folato eritrocitário foi associado com a redução de 0,396 no Ln do número de células NK. Esse modelo explica 28% da variabilidade dos valores de Ln do número de células NK.

Por sua vez, o modelo 11 da **Tabela 7**, que incluiu os 27 EH e 54 controles, mostrou que o aumento em 1 Ln do UMFA aumentou em 0,131 os valores de Ln do número de células NK, sendo que este modelo explicou 11,7% da variabilidade da variável dependente.

Tabela 7. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln do número de células de NK nos grupos de pacientes com EH, em seus controles e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,022	0,130	0,001	0,870
2	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	0,063	0,136	0,009	0,646
3	Ln de UMFA	0,077	0,060	0,064	0,211
4	Ln do Folato eritrocitário	-0,396	0,129	0,280	0,005
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,075	0,128	0,007	0,560
6	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	-0,180	0,150	0,029	0,236
7	Ln de UMFA	-0,146	0,230	0,008	0,528
8	Ln do Folato eritrocitário	-0,124	0,177	0,012	0,488
9	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,092	0,087	0,015	0,290
10	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	0,129	0,089	0,028	0,149
11	Ln de UMFA	0,131	0,042	0,117	0,002
12	Ln do Folato eritrocitário	-0,109	-0,123	0,015	0,317

Modelos 1 a 4: Grupo EH; Modelos 5 a 8: Grupo controle de EH; Modelos 9 a 12: EH e grupo controle EH: esferocitose hereditária; UMFA: ácido fólico não metabolizado. Valores significantes de P estão marcados em negrito

Doze modelos de regressão linear univariada, para variável dependente: atividade lítica das células NK, foram realizados nos grupos de pacientes com EH, seus controles e no grupo total (incluindo os dois grupos) e são apresentados na **Tabela 8**.

Quando considerado o grupo total (EH + seus controles), no modelo 12 da **Tabela 8**, o aumento de 1 Ln no folato eritrocitário foi associado com a redução de 0,375 nos valores de Ln da atividade lítica das células NK. Esse modelo explicou 8,5% da variabilidade dos valores de Ln da atividade lítica das células NK no grupo total.

Tabela 8. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln da atividade lítica das células NK nos grupos de pacientes com EH, em seus controles e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,015	0,238	0,000	0,952
2	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	0,043	0,246	0,002	0,863
3	Ln de UMFA	0,106	0,105	0,060	0,328
4	Ln de folato eritrocitário	-0,375	0,257	0,117	0,164
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,137	0,230	0,010	0,555
6	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	-0,315	0,370	0,021	0,400
7	Ln de UMFA	-0,029	0,499	0,000	0,953
8	Ln de folato eritrocitário	-0,205	0,324	0,013	0,533
9	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,148	0,142	0,020	0,305
10	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	-0,163	0,152	0,022	0,288
11	Ln de UMFA	-0,014	0,072	0,034	0,850
12	Ln de folato eritrocitário	-0,375	0,177	0,085	0,040

Modelos 1 a 4: Grupo EH; Modelos 5 a 8: Grupo controle de EH; Modelos 9 a 12: EH e grupo controle EH: esferocitose hereditária; UMFA: ácido fólico não metabolizado

Doze modelos de regressão linear univariada, para variável dependente: capacidade citotóxica das células NK, foram realizados nos grupos de pacientes com EH, seus controles e no grupo total (incluindo os dois grupos) e são apresentados na **Tabela 9**.

No grupo EH, no modelo 4 da **Tabela 9**, o aumento de 1 Ln no folato eritrocitário foi associado com a redução de 0,875 no Ln da capacidade citotóxica das células NK. Esse modelo explicou 30,9% da variabilidade dos valores de Ln da capacidade citotóxica das células NK.

O mesmo achado foi encontrado no modelo 12 da **Tabela 9**, o aumento de 1 Ln no folato eritrocitário foi associado com a redução de 0,533 nos valores de Ln da capacidade citotóxica das células NK. Esse modelo explicou 12,1% da variabilidade da variável dependente.

Tabela 9. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln da capacidade citotóxica das células de NK nos grupos de pacientes com EH, em seus controles e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,097	0,342	0,005	0,781
2	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	0,215	0,350	0,023	0,547
3	Ln de UMFA	0,229	0,370	0,137	0,131
4	Ln de folato eritrocitário	-0,875	0,327	0,309	0,017
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,153	0,247	0,011	0,538
6	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	-0,367	0,397	0,025	0,361
7	Ln de UMFA	-0,294	0,534	0,009	0,585
8	Ln de folato eritrocitário	-0,301	0,345	0,025	0,390
9	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,011	0,173	0,000	0,948
10	Ln de folato sérico total (LC-MS/MS)	0,044	0,184	0,001	0,813
11	Ln de UMFA	0,115	0,085	0,034	0,182
12	Ln de folato eritrocitário	-0,533	0,207	0,121	0,013

Modelos 1 a 4: Grupo controle de EH; Modelos 5 a 8: Grupo EH; Modelos 9 a 12: EH e grupo controle EH: esferocitose hereditária; UMFA: ácido fólico não metabolizado

Não foram observadas correlações entre os parâmetros de citotoxicidade e as concentrações de citocinas séricas (IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α), com exceção da correlação direta entre o número de células NK e as concentrações séricas de TNF- α observada no grupo EH ($r=0,474$, $P=0,014$, $N=26$).

Metilação global do DNA

A metilação global do DNA foi semelhante entre os grupos EH e controle (P=0,192).

Os valores da mediana do Ln da metilação global do DNA foram utilizados para estratificar cada um dos grupos EH e controle, em dois subgrupos.

O subgrupo com maiores valores de metilação global do DNA foi utilizado como variável dependente no cálculo da AUC (*Area Under Curve*) para ambos os grupos (EH e seus controles). As variáveis independentes analisadas em cada modelo foram: consumo de folato na dieta (consumo de folato total ajustado para DFE, folato natural e folato sintético, **Figura 17**) e os valores de folato (sérico, eritrocitário, UMFA e 5-metil-THF, **Figura 18**).

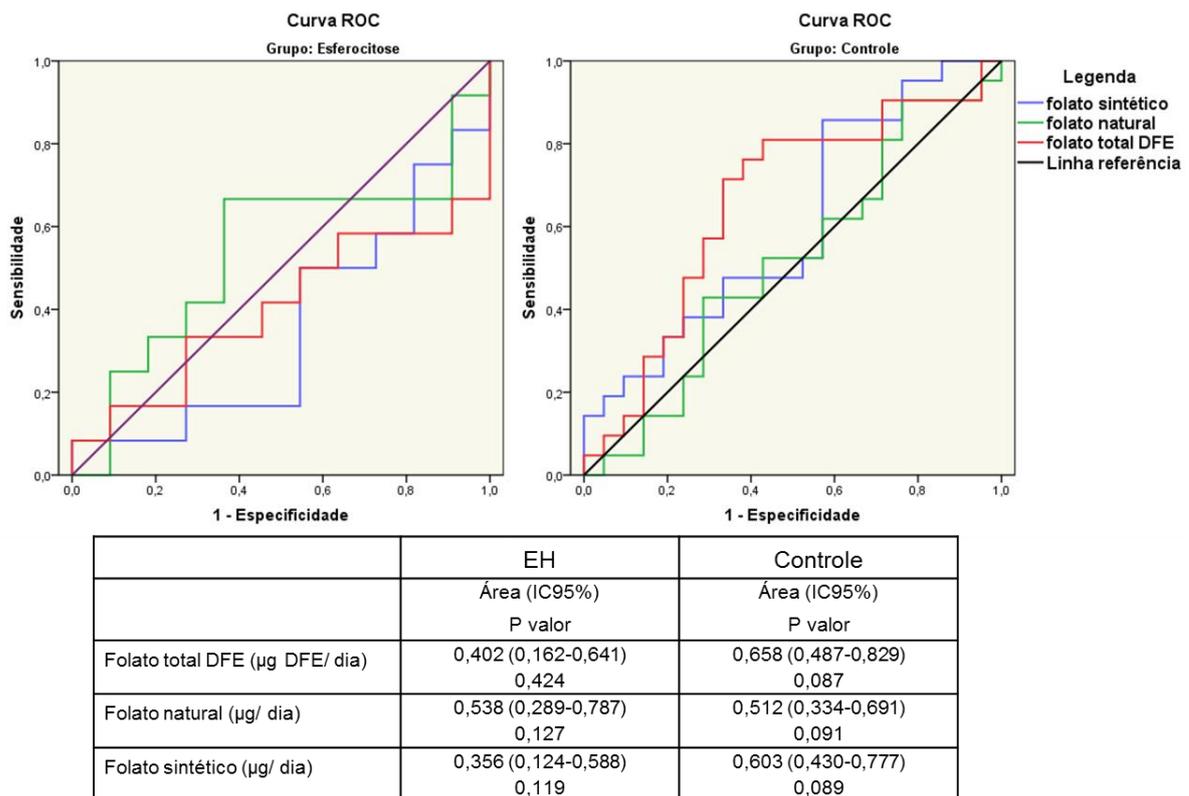


Figura 17. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do Ln de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos EH e seus controles. As variáveis independentes foram o consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)

EH: esferocitose hereditária; DFE: equivalente de folato dietético

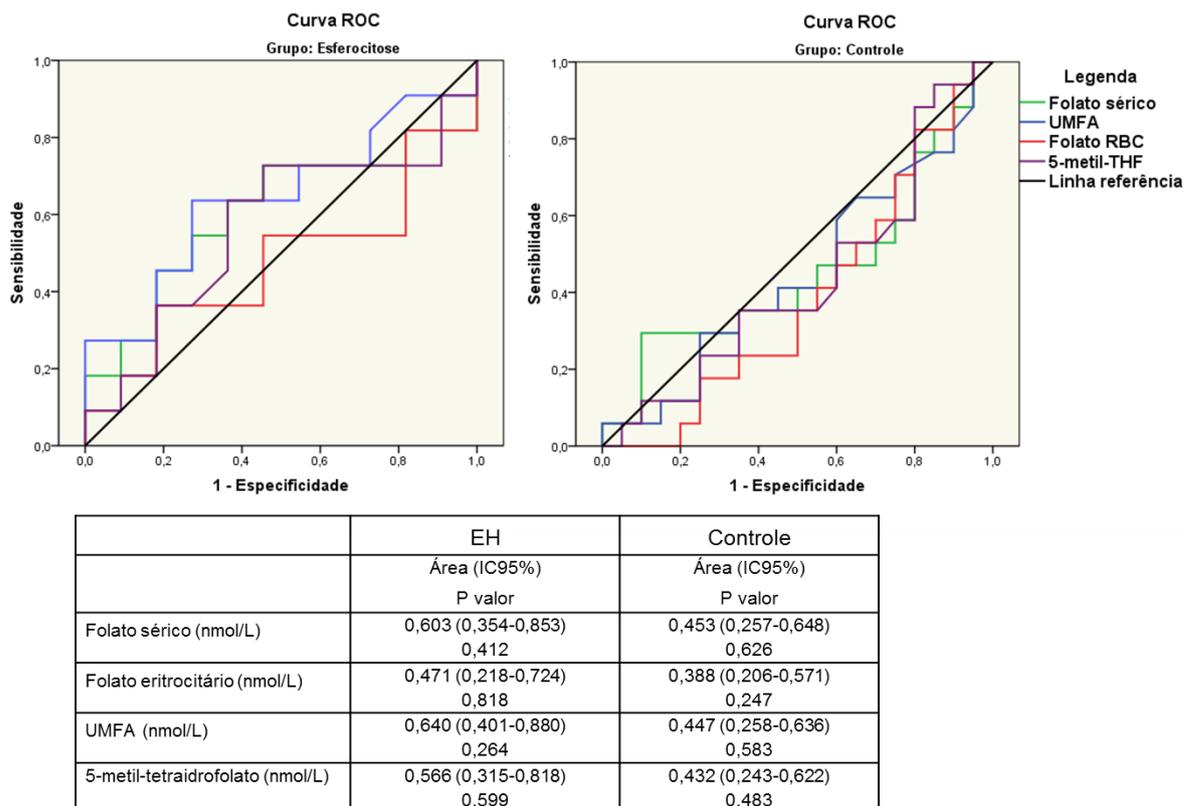


Figura 18. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do Ln de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos EH e seus controles. As variáveis independentes foram: folato sérico, eritrocitário, ácido fólico não metabolizado (UMFA) e 5-metil-tetraidrofolato

EH: esferocitose hereditária; Folato RBC: folato eritrocitário; THF: tetraidrofolato

As AUC das variáveis de consumo alimentar e também de valores de folato, não foram significantes para a variável dependente “ter maiores valores na taxa de metilação global do DNA”, tanto no grupo EH como no controle, mostrando que as variáveis do consumo de folato da dieta não foram consideradas marcadores adequados para a metilação global do DNA.

Não foi observado associação entre metilação global e as concentrações de vitamina B₁₂ e tHcy em ambos grupos.

Dois modelos de regressão logística multivariada, para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” foram realizados, sendo um para o grupo EH e outro para o grupo controle. As variáveis independentes incluídas nesses modelos foram categorizadas segundo as medianas dos Ln dos valores de expressões de RNAm de genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8.

Como resultado, apenas o aumento dos valores de expressão de TNF- α foram associados a proteção para os maiores valores de metilação global no grupo controle (**Tabela 10**).

Tabela 10. Regressão Logística multivariada para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” para grupo esferocitose hereditária e seus controles

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	P valor
1	Mediana do Ln de exp <i>DHFR</i>	1,67 (0,17-16,79)	0,663
	Mediana do Ln de exp <i>MTHFR</i>	3,09 (0,28-33,44)	0,353
	Mediana do Ln de exp <i>IFN-γ</i>	0,25 (0,03-2,36)	0,227
	Mediana do Ln de exp <i>TNF-α</i>	0,491 (0,07-3,67)	0,488
	Mediana do Ln de exp <i>IL-8</i>	0,41 (0,05-3,71)	0,425
2	Mediana do Ln de exp <i>DHFR</i>	0,73 (0,16 – 3,45)	0,694
	Mediana do Ln de exp <i>MTHFR</i>	2,38 (0,49-11,57)	0,284
	Mediana do Ln de exp <i>IFN-γ</i>	0,69 (0,16-2,98)	0,620
	Mediana do Ln de exp <i>TNF-α</i>	0,21 (0,05 – 0,82)	0,025
	Mediana do Ln de exp <i>IL-8</i>	1,20 (0,30-4,84)	0,799

Modelo 1: variáveis do grupo esferocitose hereditária; Modelo 2: Variáveis do grupo controle. DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metileno-tetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α ; IL-8: interleucina-8; exp: expressão de RNAm. As variáveis independentes foram transformadas em categóricas (0=valores menores que a mediana e 1 valores maiores ou iguais a mediana) dos Ln das concentrações das variáveis

Expressões de RNAm

As expressões dos RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 nos grupos de pacientes com EH e seus controles estão apresentadas na **Figura 19**. Observou-se que os pacientes com EH apresentaram maiores expressões de RNAm do gene da IL-8 e menores expressões de RNAm do gene da IFN- γ quando comparados aos controles.

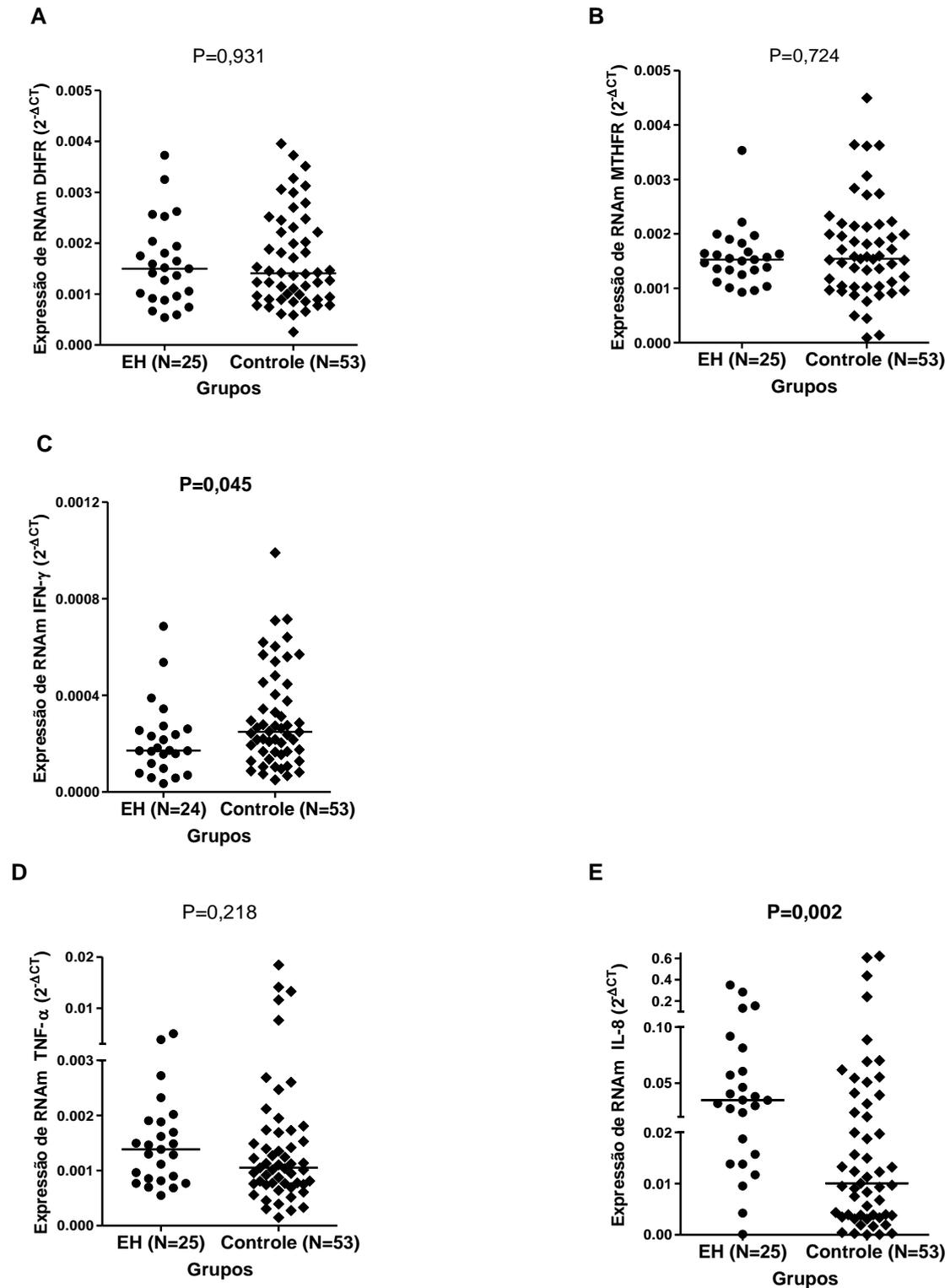


Figura 19. Expressões do RNAm dos genes da DHFR (A), MTHFR (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) e IL-8 (E) nos grupos de pacientes com esferocitose hereditária (EH) e seus controles

DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α

Foram observadas correlações diretas entre as expressões de RNAm dos genes de IFN- γ e IL-8 no grupo EH (**Tabela 11**).

Tabela 11. Correlação de Spearman entre os valores das expressões dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 no grupo esferocitose hereditária

Expressões de RNAm dos genes	<i>MTHFR</i>	<i>IL-8</i>	<i>IFN-γ</i>	<i>TNF-α</i>
DHFR	r= 0,248 P= 0,231 N= 25	r= 0,012 P= 0,956 N= 25	r= 0,165 P= 0,440 N= 25	r= 0,308 P= 0,134 N= 25
MTHFR		r= 0,143 P= 0,495 N= 25	r= 0,189 P= 0,377 N= 25	r= 0,311 P= 0,131 N= 25
IL-8			r= 0,536 P= 0,007 N= 25	r= 0,264 P= 0,203 N= 25
IFNγ				r= 0,076 P= 0,725 N= 25

DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metileno tetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . As correlações significantes estão marcadas em negrito

No grupo controle, foram observadas correlações diretas entre as expressões dos genes do TNF- α com as expressões de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, IFN- γ e IL-8; e entre as expressões de RNAm do gene da MTHFR e do gene da IFN- γ (**Tabela 12**).

Quando considerado o efeito das concentrações de UMFA sobre as expressões de genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8, não foram observadas correlações significantes em nenhum dos grupos.

Tabela 12. Correlação de Spearman entre os valores das expressões dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 no grupo controle

Expressões de RNAm dos genes	<i>MTHFR</i>	<i>IL-8</i>	<i>IFNγ</i>	<i>TNF-α</i>
DHFR	r= 0,648 P< 0,001 N= 53	r= -0,073 P= 0,605 N= 53	r= 0,272 P= 0,051 N= 53	r= 0,417 P= 0,002 N= 53
MTHFR		r= - 0,194 P= 0,164 N= 53	r= 0,391 P= 0,004 N= 53	r= 0,433 P= 0,001 N= 53
IL-8			r= 0,126 P= 0,369 N= 53	r= 0,506 P< 0,001 N= 53
IFNγ				r= 0,293 P= 0,033 N= 53

DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . As correlações significantes estão marcadas em negrito

Quando o grupo de pacientes EH foi estratificado em dois subgrupos segundo a mediana de UMFA (< e $\geq 3,78$ nmol/L), não foram observadas diferenças entre estes dois grupos para os seguintes parâmetros: número de leucócitos, eritrócitos e reticulócitos, hemoglobina, VCM, LDH, PCR-us, vitamina B₁₂, tHcy, metilação global do DNA, expressões de RNAm de genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 e citocinas séricas, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α .

Quando estes mesmos parâmetros foram avaliados comparando-se o 1^o tercil (menores valores) com o 3^o tercil (maiores valores) de UMFA no grupo EH, os pacientes pertencentes ao tercil com maiores valores de UMFA apresentaram menores concentrações séricas de IL-10 e IFN- γ .

4.2 Estudo dos 50 indivíduos com β -talassemia heterozigótica e seus 100 controles

As características gerais dos participantes com β -talassemia heterozigótica (β -TH) e seus controles estão apresentadas na **Tabela 13**.

Apenas 13 (26%) dos indivíduos β -TH declararam estar fazendo uso terapêutico com AF. Destes, 11 faziam uso diário de 1 comprimido de 5mg de AF e 2 indivíduos tomavam de forma não regular (1 a 3 comprimidos por semana). Os demais β -TH e os controles saudáveis declararam não ter feito uso de AF ou polivitamínicos pelo menos nos três meses anteriores a coleta de sangue.

A cor de pele declarada foi diferente entre os grupos, com menor frequência daqueles que se declararam como pardos no grupo β -TH.

Tabela 13. Características gerais dos pacientes com β -talassemia heterozigótica e seus controles

	β-talassemia heterozigótica N= 50	Controle # N= 100	P valor
Idade (anos)	51 (37-60)	44 (30-57)	0,105
Gênero Feminino	35 (70,0)	70 (70,0)	1,000*
Cor declarada da pele			0,004**
Branca	46 (92,0)	71 (71,0)	
Negra	2 (4,0)	3 (3,0)	
Parda	2 (4,0)	24 (24,0)	
Amarela	0	2 (2,0)	
IMC (Kg/m²)	25,5 (24,0-29,4)	25,3 (23,1-27,7)	0,209
Uso de ácido fólico (AF)	13 (26,0)	0	<0,001***
Fumantes	5 (10,0)	11 (11,0)	0,852*

IMC: índice de massa corporal. # Os indivíduos controles saudáveis foram pareados aos indivíduos β -talassêmicos heterozigóticos, quanto a idade, gênero e IMC. As variáveis numéricas (idade e IMC) foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses), os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. As variáveis categóricas (gênero, cor da pele, uso de AF e fumantes) foram apresentadas como número de sujeitos e porcentagem entre parênteses. *Teste Qui-Quadrado, **Teste Likelihood ratio, ***Teste Exato de Fisher

As mutações que caracterizam o fenótipo dos indivíduos β -TH estão apresentadas na **Tabela 14**. Foram observadas 7 diferentes mutações nos indivíduos estudados. Quatro indivíduos não foram classificados dentro das mutações pesquisadas. A mutação mais frequente foi a mutação no códon 39 (C→T).

Tabela 14. Frequências de alterações moleculares encontradas nos indivíduos com β -talassemia heterozigótica (n=50)

Alterações moleculares	Fenótipos *	Frequências
Codon 39 (C→T)	β°	35 (70)
IVS-I-1 (G→A)	β°	1 (2)
Codon 2 (CAC→CAT)	β°	1 (2)
Total β°		37 (74)
IVS1-110 (G→A)	β^{+}	6 (12)
IVS-I-6 (T→C)	β^{+}	1 (2)
-88 (C→T)	β^{+}	1 (2)
-87 (C>G)	β^{+}	1 (2)
Total β^{+}		9 (18)
Não classificada		4 (8)

Os dados de frequências foram apresentados como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses. *Jankovic *et al.*, 1990; Patrinos *et al.*, 2004

Vitaminas e homocisteína total (tHcy)

Não houve diferença entre as concentrações de folato sérico, vitamina B₁₂ e tHcy nos indivíduos β -TH e em seus controles. Entretanto, foram observadas maiores concentrações de folato eritrocitário no grupo β -TH quando comparado com o grupo controle (**Tabela 15** e **Figura 20**).

As frequências de indivíduos com concentrações suprafisiológicas de folato sérico (>45nmol/L) e com deficiência de folato (<13,6nmol/L) foram semelhantes entre os dois grupos analisados (**Tabela 15**).

Apenas 1 (2%) indivíduo β -TH apresentou deficiência de vitamina B₁₂ (concentrações séricas <148 pmol/L), enquanto 5 (10%) β -TH e 9 (9%) controles apresentaram concentrações aumentadas de tHcy (> 13,9 μ mol/L).

Tabela 15. Concentrações das vitaminas e de homocisteína total no grupo β -talassêmicos heterozigotos e no grupo controle

	β-talassemia heterozigótica N=50	Controles N=100*	P valor
Folato sérico (nmol/L)	22,3 (11,5-34,7)	23,5 (14,4-38,4)	0,667
Concentrações suprafisiológicas (>45,0nmol/L)	11 (22)	12 (12)	0,109
Deficiência (<13,6nmol/L)	15 (30)	23 (23)	0,353
Folato eritrocitário (nmol/L)	720 (535-1162)	508 (334-727)	<0,001
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	397 (314-507)	401 (301-527)	0,779
Homocisteína total (μ mol/L)	9,8 (8,5-12,5)	9,5 (8,6-11,3)	0,489

*Para o folato eritrocitário, controles N=81. As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartil (entre parênteses) e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses e os grupos foram comparados usando os testes Qui-Quadrado. Em negrito foram apresentados os valores de $P < 0,05$.

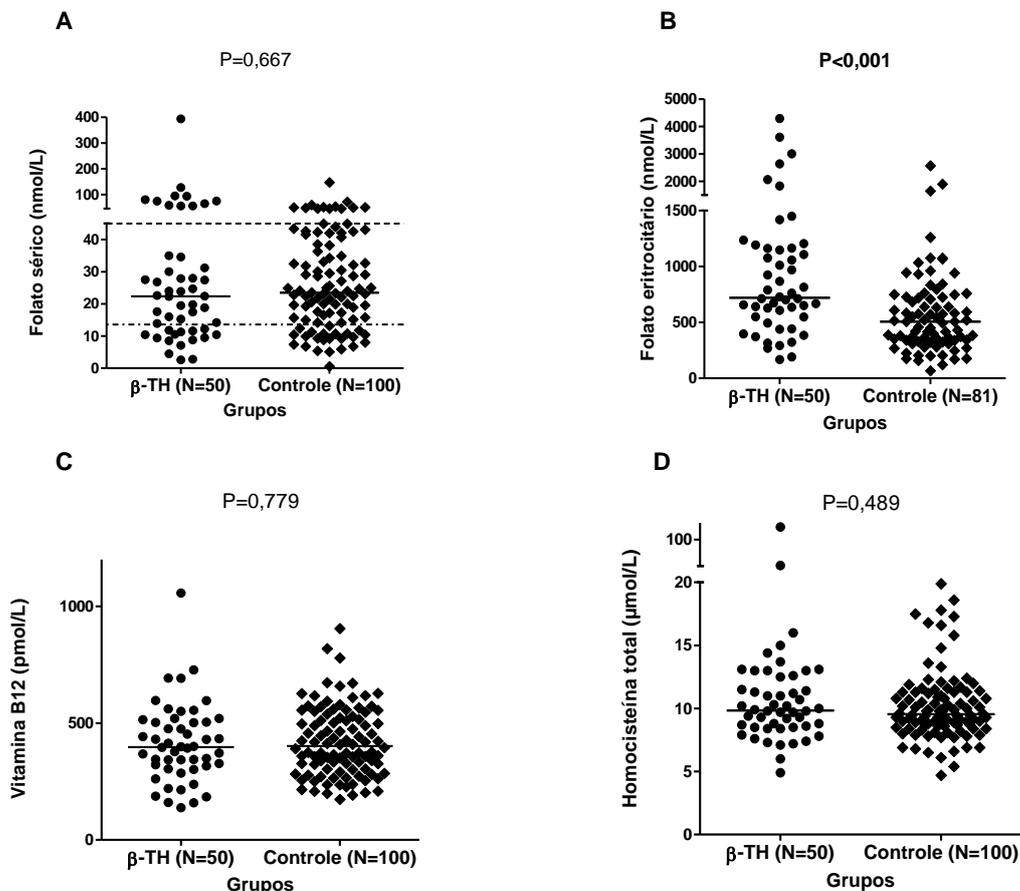


Figura 20. Concentrações de folato sérico (A) e eritrocitário (B), vitamina B₁₂ (C) e homocisteína total (D) nos grupos β -talassemia heterozigótica e controle. Os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney e as linhas horizontais são as medianas.

O consumo alimentar dos indivíduos β -TH e seus controles está apresentado na **Tabela 16**. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos β -TH e controle em relação ao consumo alimentar considerando o valor calórico total, macronutrientes e micronutrientes.

Tabela 16. Consumo alimentar de pacientes com β -talassemia heterozigótica e seus controles

Energia, macronutrientes e nutrientes*	Talassemia N= 50	Controles N= 98	P valor
Energia (Kcal/dia)	1964,94 (1765,43 – 2216,59)	1946,95 (1623,82 – 2324,34)	0,676**
Carboidratos totais (g/dia)	254, 46 (212,99 – 298,53)	244,63 (201,65 – 297,37)	0,231*
Proteínas Totais (g/dia)	81,65 (67,74 – 95,90)	83,69 (68,20 – 99,81)	0,290*
Proteínas animais (g/dia)	55,84 (45,64 – 67,90)	57,94 (45,96 – 74,36)	0,325**
Proteínas vegetais (g/dia)	26,63 (21,63 – 29,59)	24,62 (20,75 – 29,81)	0,427**
Gorduras Totais (g/dia)	68,70 (61,00 – 83,50)	67,53 (58,83 – 78,78)	0,347*
AG saturados (g/dia)	23,34 (20,58 – 29,31)	22,77 (18,94 – 27,53)	0,259*
AG monoinsaturados (g/dia)	24,81 (20,63 – 30,57)	23,82 (20,49 – 28,44)	0,494*
AG polinsaturados (g/dia)	15,61 (12,69 – 19,61)	15,32 (12,89 – 18,73)	0,471*
Colesterol (mg/dia)	253,36 (217,43 – 290,13)	256,34 (222,00 – 307,93)	0,514**
Fibras totais (g/dia)	18,44 (13,85 – 20,92)	17,53 (13,98 – 21,20)	0,964**
Ferro (mg/dia)	10,85 (9,64 – 12,34)	10,80 (8,92 – 12,73)	0,950*
Vitamina B2 (mg/dia)	1,58 (1,42 – 1,89)	1,61 (1,38 – 1,91)	0,822*
Vitamina B6 (mg/dia)	1,54 (1,33 – 1,97)	1,76 (1,41 – 2,03)	0,853*
Folato (μ g DFE/dia) ¹	413,80 (364,64 – 476,76)	410,05 (352,72 – 467,72)	0,595**
Folato natural (μ g/dia)	216,30 (174,63 – 239,48)	210,19 (181,37 – 257,94)	0,466*
Folato sintético (μ g/dia)	122,85 (101,05 – 151,87)	112,13 (83,27 – 140,33)	0,166*
Vitamina B ₁₂ (μ g /dia)	3,95 (2,95 – 4,92)	3,71 (3,07 – 5,22)	0,878**
Betaína (mg/dia)	119,39 (103,16 – 152,40)	125,31 (100,98 – 156,69)	0,666*
Colina (mg/dia)	323,17 (269,49 – 388,36)	329,32 (272,35 – 398,82)	0,331**
Metionina (g/dia)	1,87 (1,54 – 2,23)	1,89 (1,54 – 2,38)	0,432**

AG: ácidos graxos; * Considerado valor de atenuado pela remoção da variabilidade intrapessoal. Os valores apresentados são a mediana e percentis 25 e 75, entre parênteses. ¹Apresentado como equivalente de folato dietético (*dietary folate equivalents* – DFE). 1 DFE = 1 μ g de folato natural presente nos alimentos = 0,6 μ g de folato sintético proveniente dos alimentos fortificados. Os grupos foram comparados utilizando os testes: * teste de t-Student e ** teste de Mann-Whitney.

Não houve correlação entre o consumo de folato natural, folato sintético e consumo total de folato, apresentado como equivalente de folato dietético (DFE), com

as concentrações de folato sérico tanto no grupo β -TH, quanto no grupo controle. O consumo de vitamina B₁₂ não foi correlacionado com a concentração sérica desta vitamina nos dois grupos.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Foi observado maior número de eritrócitos e menores valores de hemoglobina e VCM nos indivíduos β -TH quando comparados aos controles, sendo alterações características de β -TH (**Tabela 17**). Da mesma forma, o aumento significativo das concentrações de hemoglobina A₂ (HbA₂) caracteriza os indivíduos com β -TH. Embora a frequência de reticulócitos seja mais alta do que a dos controles, este aumento é discreto e caracteriza um leve aumento da eritropoese.

Tabela 17. Valores hematológicos e bioquímicos dos pacientes com β -talassemia heterozigótica e em seus controles

	β-talassemia heterozigótica N= 50	Controles N= 100	P valor
Eritrócitos x10 ⁶ / μ L	5,47 (5,05-5,96)	4,55 (4,29-4,94)	< 0,001
Hemoglobina (g/dL)	11,6 (10,6-12,4)	13,9 (12,0-14,9)	< 0,001
Presença de anemia	38 (76,0)	7 (7,0)	<0,001
Hematócrito (%)	35,5 (32,9-37,9)	40,6 (38,7-43,2)	<0,001
VCM (fL)	64,5 (62,8-67,0)	89,1 (86,4-91,9)	< 0,001
HCM pg/mL	21,2 (20,1-21,9)	30,6 (29,4-31,6)	<0,001
CHCM (%)	32,4 (31,8-33,3)	34,2 (33,5-34,9)	<0,001
RDW	15,1 (14,4-16,1)	13,2 (12,7-13,9)	<0,001
Reticulócitos (%)	1,1 (0,8-1,8)	0,8 (0,7-1,1)	< 0,001
Leucócitos x10 ³ / μ L	7,2 (6,2-8,8)	6,8 (5,5-7,5)	0,006
Plaquetas x10 ³ / μ L	211 (179-272)	216 (191-246)	0,800
Hemoglobina A2 (%)	4,7 (4,2-5,2)	2,3 (2,1-2,6)	< 0,001
Hemoglobina fetal (%)	1,4 (0,9-4,2)	0,5 (0-0,7)	< 0,001
LDH (U/L)	428 (382-493)	426 (390-486)	0,914

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW: red cells distribution width; LDH: lactato desidrogenase. As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. A variável categórica anemia foi apresentada como número de indivíduos (porcentagem). Foi considerado anemia quando os valores de hemoglobina foram inferiores a 13,0 g/dL para os homens, e para as mulheres, valores inferiores a <12,0 g/dL. *As frequências foram comparadas entre os grupos utilizando o teste Qui-quadrado.

Em relação aos marcadores de processo inflamatório, apenas as concentrações de IL-6 e IL-8 foram maiores nos indivíduos β -TH quando comparadas com o grupo controle (**Tabela 18**).

Foi observado correlação direta entre folato eritrocitário e concentrações séricas de IFN- γ ($r=0,335$, $P=0,017$, $N=50$) no grupo β -TH e correlação direta entre as concentrações de folato sérico e de IL-8 sérica ($r=0,198$, $P=0,048$, $N=100$) no grupo controle.

Tabela 18. Concentrações de marcadores de processo inflamatório nos indivíduos com β -talassemia heterozigótica e em seus controles

	β-talassemia heterozigótica N= 50	Controles N= 100	P valor
PCR ultrasensível (mg/dL)	0,24 (0,10-0,45)	0,17 (0,07-0,40)	0,193
IL6 (pg/mL)	1,19 (0,84-1,76)	0,89 (0,48-1,30)	0,004
IL-8 (pg/mL)	12,89 (7,35-56,77)	7,13 (4,85-11,35)	<0,001
IL10 (pg/mL)	2,67 (1,04-4,58)	2,61 (1,20-4,46)	0,873
IFN- γ (pg/mL)	6,83 (3,09-10,62)	4,97 (2,62-7,93)	0,091
TNF- α (pg/mL)	5,28 (3,47-7,19)	4,22 (3,13-6,24)	0,106

PCR: proteína C reativa; IL: interleucina; IFN- γ ; interferon- γ ; TNF- α ; fator de necrose tumoral- α . As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. Em negrito foram apresentados os $P<0,05$.

Citotoxicidade das células NK

Observou-se aumento significativo no número de células NK no grupo β -TH (mediana: 634, P25-P75: 425-923 células NK/ μ L) quando comparado com os controles saudáveis (mediana: 492, P25-P75: 322-690 células NK/ μ L). Entretanto, mesmo com este aumento, não houve diferença significativa para a atividade lítica e para a capacidade citotóxica das células NK entre os grupos (**Figura 21**).

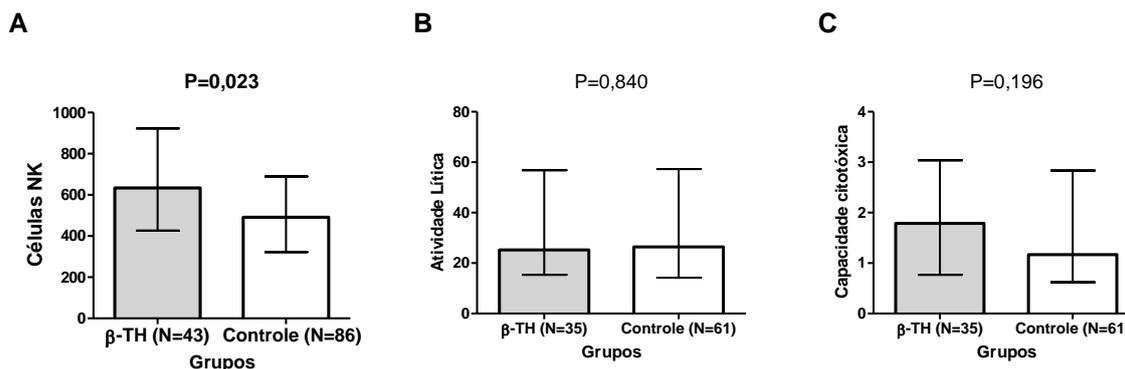


Figura 21. Número de células NK (A); atividade lítica das células NK (B); e capacidade citotóxica das células NK (C) em indivíduos com β -talassemia heterozigótica (β -TH) e seus controles

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os grupos foram comparados utilizando teste Mann-Whitney. Em negrito foi apresentado $P < 0,05$. O número de amostras analisadas são menores devido as dificuldades com a técnica *in vitro*, a qual precisava ser realizada no dia e também devido a quantidade insuficiente de células mononucleares obtidas em alguns indivíduos. Resultados apresentados como células NK/ μ L, atividade lítica (10^7 cels/ UL15%) e capacidade citotóxica ([células NK/ μ L] / UL15%)

Seis modelos de regressão linear univariada, para cada uma das seguintes variáveis dependentes: número, atividade lítica e capacidade citotóxica de células NK foram realizados nos grupos de pacientes com β -TH, seus controles e no grupo total (incluindo os dois grupos), e os resultados estão apresentados, respectivamente, nas **Tabela 19, 20 e 21**.

Não foi observada associação entre as concentrações de folato (sérico e eritrocitário) e o número das células NK, em ambos os grupos (**Tabela 19**).

Considerando o grupo total, (modelo 6 da **Tabela 20**), o aumento de 1 Ln no folato eritrocitário foi associado com a redução em 0,323 do valor do Ln da atividade lítica das células NK. Esse modelo de regressão explicou 4,9% da variabilidade da varável dependente.

Observou-se que no grupo controle (modelo 4, **Tabela 20**), que o aumento de 1 Ln no folato eritrocitário foi associado com a redução de 0,524 no Ln da atividade lítica das células NK. Esse modelo explica 11,4% da variabilidade dos valores de Ln da atividade lítica de NK.

Tabela 19 Modelos de regressão linear univariada para o Ln do número de células de NK nos grupos de indivíduos com β -TH, em seus controles e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,026	0,081	0,003	0,745
2	Ln de folato eritrocitário	0,120	0,106	0,031	0,262
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,134	0,069	0,043	0,055
4	Ln de folato eritrocitário	0,024	0,086	0,001	0,785
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,062	0,054	0,010	0,256
6	Ln de folato eritrocitário	0,112	0,064	0,026	0,085

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. As regressões lineares univariadas foram realizadas com variáveis transformadas em Logn

Tabela 20. Modelos de regressão linear univariada para o Ln da atividade lítica das células NK nos grupos de indivíduos com β -TH, em seus controles e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,001	0,178	0,000	0,996
2	Ln de folato eritrocitário	-0,171	0,270	0,012	0,530
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,213	0,170	0,026	0,213
4	Ln de folato eritrocitário	-0,524	0,194	0,114	0,009
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,106	0,121	0,008	0,386
6	Ln de folato eritrocitário	-0,323	0,149	0,049	0,033

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. Os modelos de regressão linear univariada foram realizados com variáveis transformadas em Logn

Por sua vez, o modelo 4 da **Tabela 21**, que incluiu o grupo controle dos indivíduos β -TH, mostrou que o aumento em 1 Ln de folato eritrocitário foi associado com a redução de 0,700 nos valores de Ln da capacidade citotóxica das células NK, sendo que este modelo explicou 16,5% da variabilidade dos valores da variável dependente.

Tabela 21. Modelos de regressão linear univariada para o Ln da citotoxicidade das células NK nos grupos de indivíduos com β -TH, em seus controles e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,046	0,201	0,001	0,819
2	Ln de folato eritrocitário	0,129	0,289	0,006	0,658
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,145	0,191	0,009	0,450
4	Ln de folato eritrocitário	-0,700	0,205	0,165	0,001
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,093	0,136	0,005	0,495
6	Ln de folato eritrocitário	-0,287	0,161	0,032	0,078

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. As regressões lineares univariadas foram realizadas com variáveis transformadas em Logn

Não foi observada correlação entre os parâmetros de citotoxicidade e citocinas séricas IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α nos indivíduos β -TH.

Nos indivíduos controles houve correlação direta do número de células NK com IL-6 ($r=0,274$, $P=0,011$, $N=86$) e com IL-10 ($r=0,328$, $P=0,002$, $N=86$).

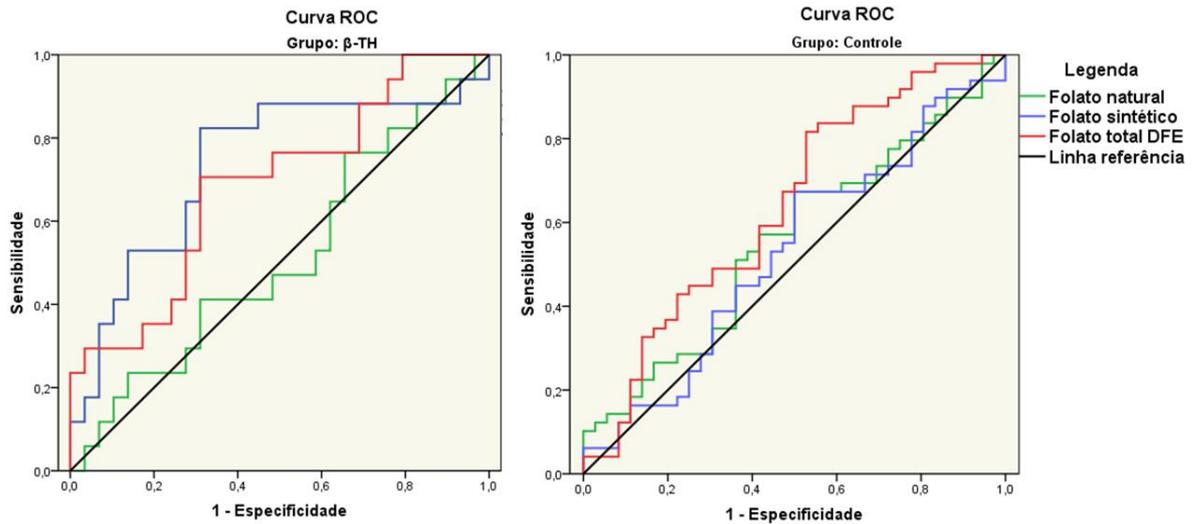
Metilação global do DNA

Não foram observadas diferenças entre as taxas de metilação global do DNA entre os grupos β -TH e controle.

Os valores da mediana da metilação global do DNA foram utilizados para estratificar os grupos β -TH e controle, em dois novos subgrupos. O subgrupo com maiores valores de metilação global do DNA foi utilizado como variável dependente no cálculo da AUC (Area Under Curve) para ambos os grupos (β -TH e seus controles). As variáveis independentes analisadas foram: consumo de folato na dieta (consumo de folato total ajustado para DFE, folato natural e folato sintético, **Figura 22**) e os valores de folato no sangue (sérico e eritrocitário, **Figura 23**).

As AUC da variável consumo alimentar de folato ajustado para DFE mostrou AUC de aproximadamente 0,700, mostrando ser um bom marcador para a variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA”, tanto no grupo β -TH

como no controle. Somente no grupo β -TH foi observado uma associação entre o consumo de folato sintético da dieta com a variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” (**Figura 21**).



	β -TH	Controle
	Área (IC95%)	Área (IC95%)
	P valor	P valor
Folato total DFE (μg DFE/ dia)	0,686 (0,525-0,846) 0,037	0,638 (0,516-0,760) 0,031
Folato natural (μg / dia)	0,511 (0,335-0,687) 0,900	0,556 (0,432-0,679) 0,383
Folato sintético (μg / dia)	0,736 (0,575-0,898) 0,008	0,530 (0,404-0,656) 0,637

Figura 21. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do Ln de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos β -TH e seus controles. As variáveis independentes foram o consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)

β -TH: β -talassemia heterozigótica; DFE: equivalente de folato dietético

Por outro lado, não foi encontrada associação entre as concentrações de folato sérico e eritrocitário com a variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA”, em ambos grupos (**Figura 23**).

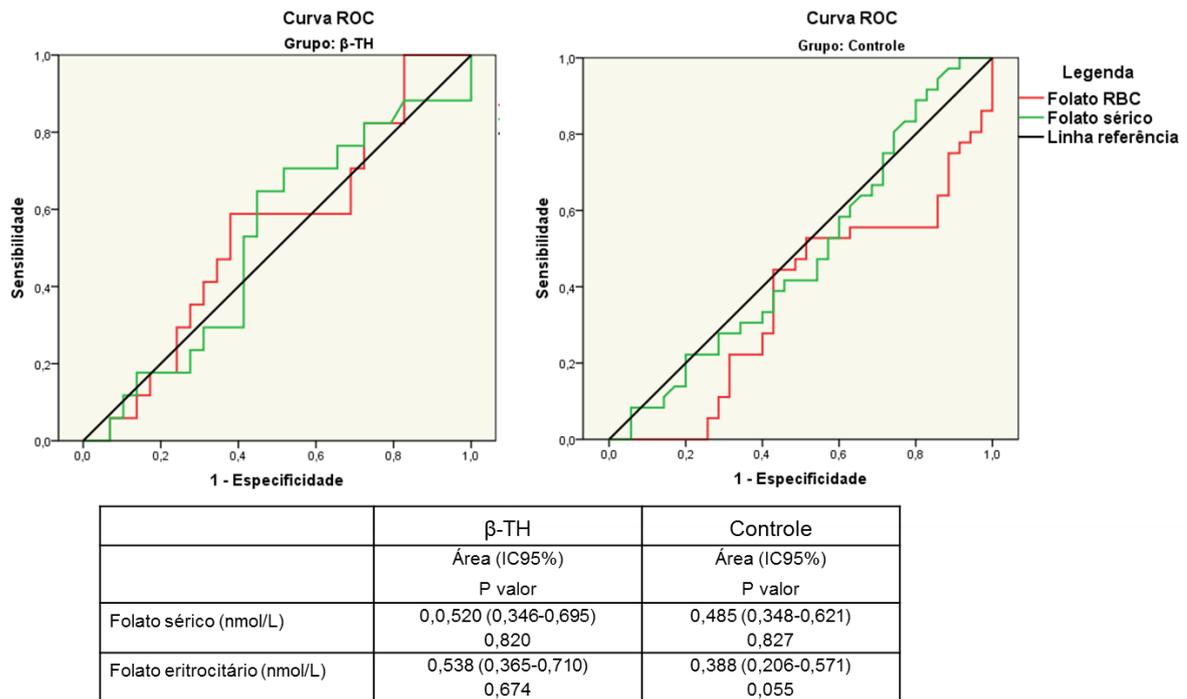


Figura 22. Curva ROC para variável dependente: ter maiores valores do LN de metilação global do DNA (\geq mediana) nos grupos β -TH e seus controles. As variáveis independentes foram: folato sérico, eritrocitário, ácido fólico não metabolizado (UMFA) e 5-metil-tetraidrofolato

β -TH: β -talassemia heterozigótica; Folato RBC: folato eritrocitário

No modelo de regressão logística multivariada em que foram incluídas as variáveis independentes folato sérico e eritrocitário, categorizadas segundo as medianas dos Ln dos valores, não foi observado associação destas variáveis com a variável dependente “possuir maiores valores de metilação global do DNA” para o grupo β -TH e em seus controles (**Tabela 22**).

Já no modelo de regressão logística multivariada para a variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” nos grupos β -TH e controle, utilizando os Ln de expressão de RNAm de genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8 como variáveis independentes estão apresentados na **Tabela 23**. Foi observado que o aumento do grupo com menores para o grupo com maiores valores de Ln da expressão de DHFR foi associado como proteção para ter maiores valores de metilação global do DNA.

Tabela 22. Regressão Logística multivariada para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” para grupo β -TH e em seus controles

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,71 (0,20-2,48)	0,593
	Ln de folato eritrocitário	1,60 (0,46-5,60)	0,461
2	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,70 (0,26-1,89)	0,481
	Ln de folato eritrocitário	0,61 (0,23-1,63)	0,324

Modelo 1: variáveis do grupo β -TH; Modelo 2: variáveis do grupo controle.

As variáveis independentes são categóricas, os LN das variáveis foram categorizadas segundo a mediana.

Tabela 23. Regressão Logística multivariada para variável dependente “ter maiores valores de metilação global do DNA” para grupo β -TH e em seus controles

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	P valor
1	Mediana do Ln de DHFR	0,82 (0,21-3,28)	0,784
	Mediana do Ln de MTHFR	0,91 (0,20-4,10)	0,905
	Mediana do Ln de IFN- γ	0,45 (0,13-1,52)	0,198
	Mediana do Ln de TNF- α	0,50 (0,12-2,04)	0,332
	Mediana do Ln de IL-8	0,94 (0,27-3,27)	0,922
2	Mediana do LN de DHFR	0,27 (0,08-0,89)	0,031
	Mediana do LN de MTHFR	0,92 (0,30-2,85)	0,888
	Mediana do LN de IFN- γ	2,55 (0,78-8,30)	0,119
	Mediana do LN de TNF- α	1,37 (0,41-4,56)	0,610
	Mediana do LN de IL-8	1,37 (0,49-3,84)	0,550

Modelo 1: variáveis do grupo β -TH; Modelo 2: variáveis do grupo controle. As variáveis independentes são categóricas, os Ln das variáveis foram categorizadas segundo a mediana

Expressões de RNAm

Observou-se aumento na expressão de RNAm dos genes de IFN- γ e IL-8 nos indivíduos β -TH quando comparado com o grupo controle. No entanto, não foi observado diferença para a expressão de RNAm de genes das enzimas do ciclo do folato DHFR e MTHFR e nem de TNF- α (**Figura 24**).

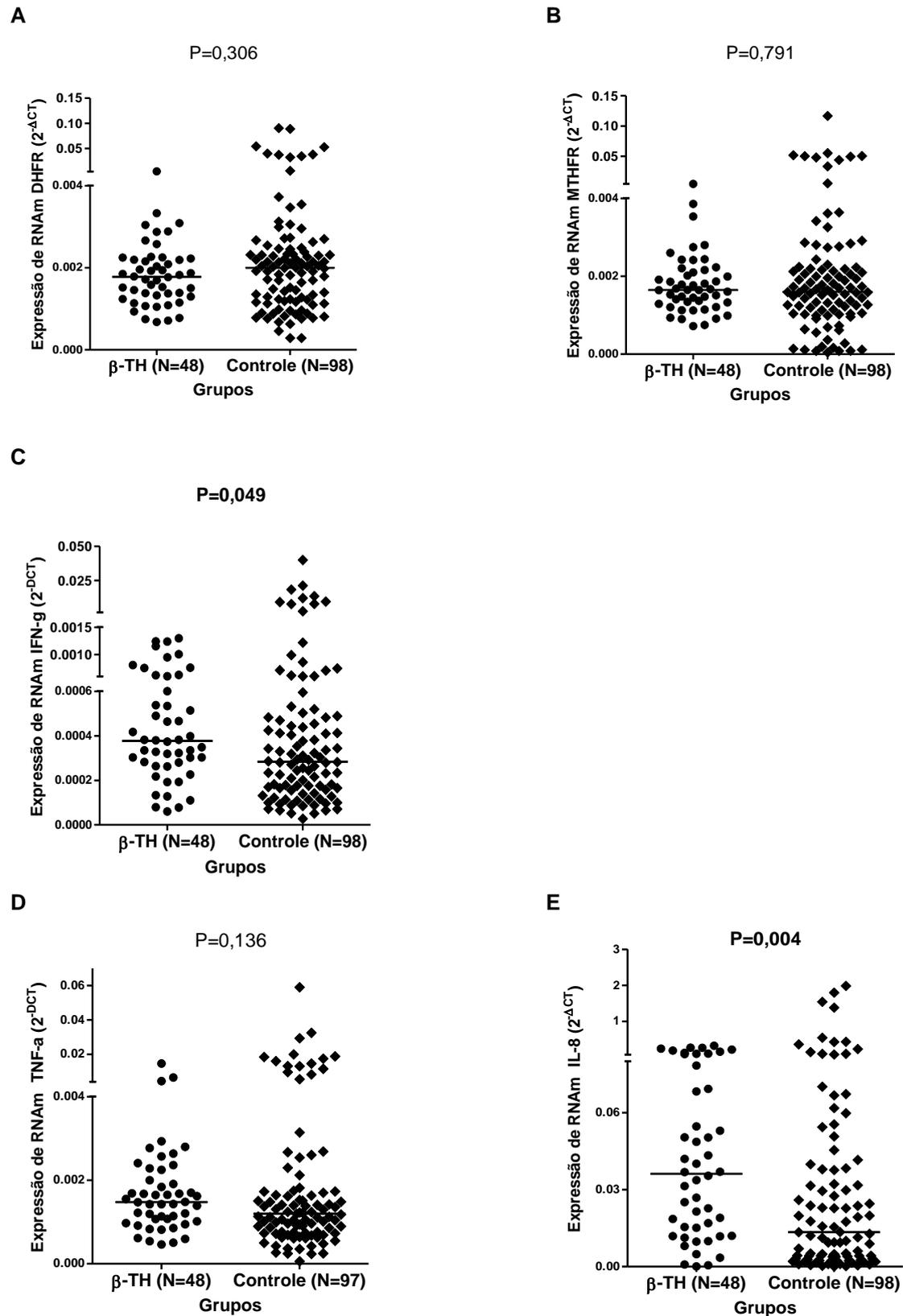


Figura 24. Expressão do RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, IFN γ , TNF- α e IL-8 nos grupos de β -talassemia heterozigótica (β -TH) e controle

DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α

Nos pacientes β -TH, foram observadas correlações diretas entre a expressão de RNAm de TNF- α com as expressões de RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ e IL-8 e entre as expressões de RNAm da DHFR com MTHFR (**Tabela 24**).

Tabela 24. Correlação de Spearman entre os valores das expressões dos RNAm de genes do ciclo do folato (*DHFR* e *MTHFR*) e de citocinas inflamatórias (*IL-8*, *IFN- γ* e *TNF- α*) no grupo β -talassemia heterozigótica

Expressões de RNAm dos genes	MTHFR	IL-8	IFN- γ	TNF- α
DHFR	r= 0,693 P< 0,001 N= 48	r= 0,033 P=0,826 N= 48	r= 0,197 P= 180 N= 48	r= 0,533 P<0,001 N= 48
MTHFR		r= -0,108 P= 0,466 N= 48	r= 0,194 P=0,187 N= 48	r= 0,603 P<0,001 N= 48
IL-8			r= 0,141 P= 0,339 N= 48	r= 0,371 P=0,009 N= 48
IFNγ				r= 0,495 P<0,001 N= 48

DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . As correlações significantes estão marcadas em negrito

Quando considerado o grupo controle, foram observadas correlações diretas entre a expressão de *DHFR* e as expressões de RNAm dos genes da MTHFR, IL-8, IFN- γ e TNF- α ; correlações diretas entre a expressão de RNAm do gene da MTHFR com as expressões de RNAm de *IFN- γ* e *TNF- α* e também entre as expressões de RNAm dos genes IL-8, IFN- γ e TNF- α entre si (**Tabela 25**).

Tabela 25. Correlação de Spearman entre os valores das expressões de RNAm dos genes do ciclo do folato (DHFR e MTHFR) e de citocinas inflamatórias (IL-8, IFN- γ e TNF- α) no grupo controle

Expressões de RNAm dos genes	<i>MTHFR</i>	<i>IL-8</i>	<i>IFNγ</i>	<i>TNF-α</i>
<i>DHFR</i>	r= 0,644 P<0,001 N=98	r= 0,287 P=0,008 N=98	r= 0,348 P<0,001 N= 98	r= 0,501 P<0,001 N= 97
<i>MTHFR</i>		r= 0,045 P=0,664 N= 98	r= 0,510 P<0,001 N= 98	r= 0,570 P<0,001 N= 97
<i>IL-8</i>			r= 0,364 P<0,001 N= 98	r= 0,578 P< 0,001 N= 97
<i>IFNγ</i>				r= 0,454 P<0,001 N= 97

DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metilenotetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . As correlações significantes estão marcadas em negrito

Seis modelos de regressão linear univariada, para cada uma das variáveis dependentes: Ln dos valores de expressão de RNAm dos genes da DHFR, IFN- γ , MTHFR, TNF- α foram realizados nos grupos de pacientes com β -TH, seus controles e no grupo total (incluindo os dois grupos). Os resultados estão apresentados na **Tabela 26, 27, 28 e 29**. Nestes modelos as concentrações de Ln de folato sérico e Ln de eritrocitário foram usados como variáveis independentes.

Foi observada associação entre o Ln das concentrações de folato eritrocitário com o Ln das expressões de RNAm do gene da DHFR tanto no grupo total (β -TH e controle) (modelo 6, **Tabela 26**) quanto em cada grupo, individualmente (modelos 2 e 4). No grupo total, o aumento de 1 Ln no valor de folato eritrocitário reduziu 0,587 dos valores de Ln da expressão de DHFR. Este modelo explicou 16,7% da variabilidade dos valores de Ln da expressão de DHFR.

Tabela 26. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da DHFR nos grupos β -TH, controle e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,059	0,063	0,018	0,358
2	Ln de folato eritrocitário	-0,259	0,079	0,190	0,002
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,030	0,155	0,000	0,846
4	Ln de folato eritrocitário	-0,799	0,196	0,173	<0,001
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,012	0,097	0,000	0,899
6	Ln de folato eritrocitário	-0,587	0,116	0,167	<0,001

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. As regressões lineares univariadas foram realizadas com variáveis transformadas em Logn

De forma semelhante, foi observada associação entre o Ln das concentrações de folato eritrocitário com o Ln das expressões de RNAm do gene de IFN- γ no grupo total (β -TH + controle) (modelo 6, **Tabela 27**). Quando cada grupo foi avaliado individualmente, foi observado que a associação acontecia no grupo controle de β -TH (modelo 4, Tabela 29). Neste grupo, o aumento de 1 Ln no valor de folato eritrocitário reduziu 0,799 nos valores de Ln da expressão de IFN- γ . Este modelo explicou 12,9% da variabilidade dos valores de Ln da expressão de IFN- γ no grupo controle de β -TH.

Tabela 27. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da IFN- γ nos grupos β -TH, controle e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,002	0,110	0,000	0,985
2	Ln de folato eritrocitário	0,221	0,148	0,046	0,142
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,126	0,192	0,004	0,514
4	Ln de folato eritrocitário	-0,799	0,234	0,129	0,001
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,069	0,123	0,002	0,577
6	Ln de folato eritrocitário	-0,360	0,148	0,044	0,017

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. As regressões lineares univariadas foram realizadas com variáveis transformadas em Logn

Foi observada associação entre o Ln das concentrações de folato eritrocitário com o Ln das expressões de RNAm do gene de MTHFR no grupo total (β -TH + controle) e controle (modelo 4 e 6, **Tabela 28**). No grupo controle, o aumento de 1 Ln no valor de folato eritrocitário reduziu 1,147 nos valores de Ln da expressão de MTHFR. Este modelo explicou 21,4% da variabilidade dos valores de Ln da expressão de MTHFR no grupo controle de β -TH.

Tabela 28. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da MTHFR nos grupos β -TH, controle e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	0,004	0,060	0,000	0,943
2	Ln de folato eritrocitário	-0,144	0,080	0,066	0,078
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,116	0,197	0,004	0,577
4	Ln de folato eritrocitário	-1,147	0,248	0,214	<0,001
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,061	0,121	0,002	0,613
6	Ln de folato eritrocitário	-0,656	0,149	0,133	<0,001

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. As regressões lineares univariadas foram realizadas com variáveis transformadas em Logn

E também foi observada associação entre o Ln das concentrações de folato eritrocitário com o Ln das expressões de RNAm do gene de TNF- α no grupo total (β -TH + controle) e controle (modelo 4 e 6, **Tabela 29**). No grupo controle, o aumento de 1 Ln no valor de folato eritrocitário reduziu 0,830 nos valores de Ln da expressão de TNF- α . Este modelo explicou 16,7% da variabilidade dos valores de Ln da expressão de TNF- α no grupo controle de β -TH.

Tabela 29. Modelos de regressão linear univariada para a variável dependente Ln dos valores da expressão de RNAm da TNF- α nos grupos β -TH, controle e no grupo total

Modelos	Variáveis independentes	Beta	Erro Padrão de beta	R ²	P valor
1	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,104	0,095	0,025	0,281
2	Ln de folato eritrocitário	-0,213	0,129	0,056	0,106
3	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,053	0,167	0,001	0,752
4	Ln de folato eritrocitário	-0,830	0,209	0,167	<0,001
5	Ln de folato sérico (microbiológico)	-0,076	0,107	0,004	0,476
6	Ln de folato eritrocitário	-0,528	0,129	0,117	<0,001

Modelos 1 e 2: Grupo β -TH; Modelos 3 e 4: Grupo controle de β -TH; Modelos 5 e 6: β -TH e grupo controle. β -TH: β -talassemia heterozigótica. As regressões lineares univariadas foram realizadas com variáveis transformadas em Logn

Quando os indivíduos β -TH foram classificados em dois grupos utilizando como valor de corte concentrações de folato sérico $>45\text{nmol/l}$ (concentrações suprafisiológicas), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para os principais parâmetros avaliados, com exceção da tHcy que foi significativamente menor no grupo com concentrações suprafisiológicas de folato, conforme apresentado na **Tabela 30**.

Tabela 30. Comparação entre variáveis hematológicas, bioquímicas, marcadores de processo inflamatório e expressões de RNAm entre os indivíduos com β -talassemia heterozigótica segundo as concentrações suprafisiológicas de folato sérico

	β -talassemia heterozigótica		P valor
	$\leq 45,0$ nmol/L N= 39	$>45,0$ nmol/L N= 11	
Leucócitos (mil/mm ³)	7,6 (6,5-9,0)	6,7 (5,6-7,5)	0,101
Eritrócitos (milhões/mm ³)	5,62 (5,06-6,15)	5,33 (4,50-5,71)	0,271
Hemoglobina (g/dL)	11,7 (10,9-12,7)	11,6 (9,8-11,9)	0,149
Volume Corpuscular Médio (fL)	64,9 (62,9-66,9)	64,2 (61,9-67,3)	0,935
Reticulócitos (%)	1,1 (0,7-1,7)	1,4 (0,9-2,1)	0,372
Lactato Desidrogenase (U/L)	423 (381-481)	482 (409-540)	0,232
PCR-Ultrassensível (mg/dL)	0,27 (0,10-0,47)	0,16 (0,09-0,38)	0,303
Vitamina B12 (pmol/L)	378 (302-475)	502 (349-551)	0,073
Homocisteína total (μ mol/L)	10,2 (8,8-13,0)	8,7 (7,2-10,2)	0,020
Metilação global (%)	4,20 (4,15-4,28)	4,16 (4,07-4,27)	0,270
Expressões do RNAm da DHFR	19,4 (14,8-26,2)	17,7 (13,7-425,1)	0,971
Expressões do RNAm da MTHFR	17,7 (13,1-25,1)	16,8 (15,1-451,5)	0,516
Expressões do RNAm da IFN- γ	3,98 (2,92-9,78)	8,09 (3,35-23,84)	0,345
Expressões do RNAm da TNF- α	16,2 (11,4-23,5)	16,8 (10,7-182,5)	0,686
Expressões do RNAm da IL-8	314,3 (139,0-870,2)	370,1 (76,5-1317,4)	0,990
Citocina IL-6 (pg/mL)	1,24 (0,86-1,94)	1,10 (0,69-1,32)	0,171
Citocina IL-8 (pg/mL)	12,52 (7,41—57,23)	15,41 (6,39-56,62)	0,991
Citocina IL-10 (pg/mL)	2,99 (1,05-4,61)	1,92 (0,3-4,24)	0,342
Citocina IFN- γ (pg/mL)	6,94 (3,88-10,68)	4,69 (2,21-10,06)	0,440
Citocina TNF- α (pg/mL)	5,45 (3,67-7,37)	4,98 (3,22-6,67)	0,412

Os indivíduos com β -talassemia heterozigota foram classificados em dois grupos de acordo com o valor de folato <45 e ≥ 45 nmol/L). Os dados apresentados são mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses). Os grupos foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney. Os P valores $<0,05$ foram apresentados em negrito. Os valores das expressões do RNAm foram calculadas pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$ e multiplicados por 10^4 . AF: ácido fólico; PCR: proteína C reativa; DHFR: diidrofolato redutase; MTHFR: metileno tetraidrofolato redutase; IFN- γ : interferon gama; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; IL-6: interleucina 6; IL-8: interleucina 8; IL-10: interleucina 10.

4.3 Estudo com 30 indivíduos saudáveis submetidos à intervenção com 5mg/dia de ácido fólico

As características gerais dos indivíduos saudáveis incluídos no estudo de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico estão apresentadas na **Tabela 31**.

Tabela 31. Características gerais dos 30 indivíduos saudáveis incluídos no estudo intervenção com 5mg/dia de ácido fólico

	Indivíduos Saudáveis N= 30
Idade (anos)	28 (26-29)
Gênero Feminino	15 (50)
Cor declarada da pele	
Branca	25 (83,3)
Negra	2 (6,7)
Parda	1 (3,3)
Amarela	2 (6,7)
IMC (Kg/m²)	22,4 (21,2-26,5)
Fumantes	0

IMC: índice de massa corporal. As variáveis numéricas (idade e IMC) foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses). As variáveis categóricas (gênero e cor da pele) foram apresentadas como número de sujeitos e porcentagem entre parênteses.

Vitaminas e homocisteína total (tHcy)

As concentrações de folato sérico, eritrocitário, UMFA e as formas 5-metil-THF, 5,10-metenil-THF e THF foram maiores após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia quando comparado com o período pré-intervenção. As concentrações de folato sérico aumentaram em torno de 4,7 vezes após 45 e 90 dias de uso de AF. O aumento das concentrações de folato eritrocitário foi de cerca 4,3 e 4,6 vezes respectivamente, após 45 e 90 dias de uso. O UMFA aumentou cerca de 5,3 e 3,1 vezes, respectivamente, após 45 e 90 dias de uso de AF (**Tabela 32**).

As frequências de concentrações suprafisiológicas de ácido fólico; de deficiência desta vitamina; e de UMFA aumentado (>1,30 nmol/L) também estão apresentadas na **Tabela 32**.

Tabela 32. Concentrações das vitaminas e de homocisteína total em 30 indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico

	Antes	Após 45 dias	Após 90 dias	P valor
Folato sérico (nmol/L) ¹	17,0 (12,0-29,8) ^a	80,2 (53,6-108,8) ^b	79,7 (61,9-115,7) ^b	<0,001
Concentrações suprafisiológicas (>45,0 nmol/L)	1 (3,3) ^a	28 (93,3) ^b	28 (93,3) ^b	<0,001*
Deficiência (<13,6 nmol/L)	9 (30) ^a	0 ^b	0 ^b	<0,001*
Folato eritrocitário (nmol/L) ¹	204 (160-279) ^a	870 (654-1151) ^b	936 (829-1169) ^b	<0,001
Folato sérico total (nmol/L) ²	24,3 (18,3-33,2) ^a	98,9 (72,0-142,8) ^b	97,6 (85,8-130,0) ^b	<0,001
Concentrações suprafisiológicas (>45,0 nmol/L) ²	2 (6,6) ^a	30 (100) ^b	30 (100) ^b	<0,001
Deficiência (<13,6nmol/L) ²	2 (6,6) ^a	0 ^b	0 ^b	<0,001
UMFA (nmol/L) ²	0,78 (0,64-0,98) ^a	4,16 (2,14-42,33) ^b	2,45 (1,61-10,43) ^b	<0,001
UMFA aumentado (>1,30 nmol/L) ²	3 (10) ^a	30 (100) ^b	29 (96,7) ^b	<0,001**
5-metil-THF (nmol/L) ²	23,0 (17,0-31,3) ^a	82,3 (66,4-103,5) ^b	86,8 (75,1-106,0) ^b	<0,001
5-formil-THF (nmol/L) ²	0,07 (0,06-0,09)	0,08 (0,07-0,10)	0,08 (0,04-0,12)	0,843
5,10-metenil-THF (nmol/L) ²	0,05 (0,04-0,06) ^a	0,05 (0,05-0,07) ^a	0,09 (0,08-0,10) ^b	<0,001
THF (nmol/L) ²	0,61 (0,40-0,83) ^a	1,17 (0,82-1,50) ^b	1,34 (1,18-1,71) ^b	<0,001
Mefox (nmol/L) ²	0,62 (0,52-1,22) ^a	1,73 (1,03-2,32) ^b	1,63 (1,30-2,23) ^b	<0,001
Vitamina B ₁₂ (pmol/L) ¹	357 (298-455)	372 (286-455)	386 (284-469)	0,852
Homocisteína total (µmol/L) ³	8,2 (6,4-10,1)	8,1 (7,1-9,2)	7,7 (6,6-10,3)	0,343

¹Microbiológico; ²LC/MS-MS; ³Quimioluminescência; UMFA: ácido fólico não metabolizado; THF: tetraidrofolato; Mefox: produto da oxidação do 5-metil-THF. As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os tempos foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pos-hoc de múltiplas comparações de Dunn`s. As variáveis categóricas foram apresentadas como número de indivíduos e porcentagem entre parênteses e os grupos foram comparados usando os testes Likelihood ratio* ou Qui-Quadrado**. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. Em negrito foram apresentados os valores de P<0,05.

As concentrações de folato sérico e eritrocitário pelo método microbiológico e de folato sérico, UMFA e 5-metil-THF por LC-MS/MS são apresentadas na **Figura 25**. Concentrações de UMFA superiores a 100nmol/L foram observadas em 5 (16,7%) indivíduos após 45 dias e em 3 (10%) indivíduos após 90 dias de uso diário de 5mg de AF.

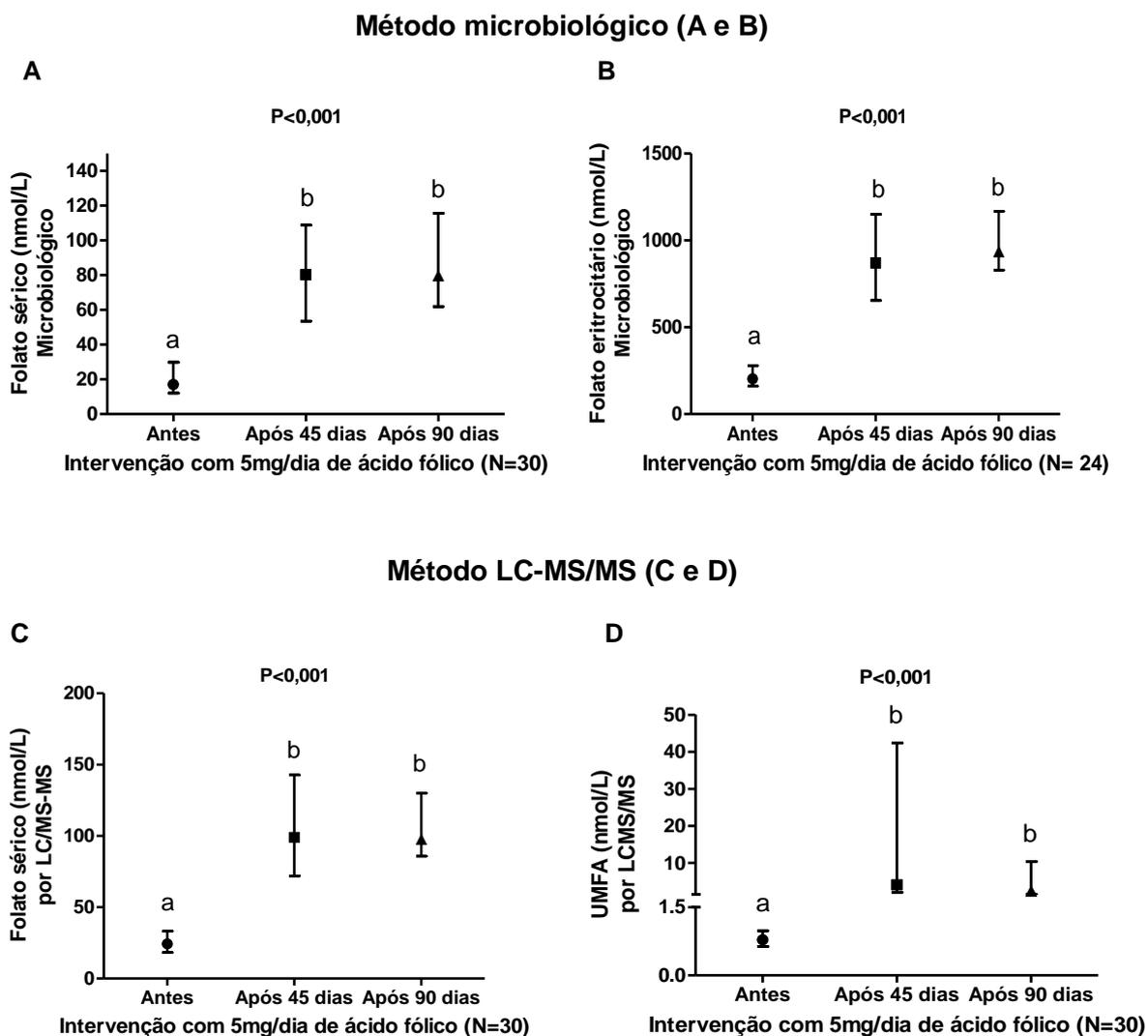


Figura 25. Concentrações de folato sérico (A), folato eritrocitário (B), ácido fólico não metabolizado (UMFA) (C), vitamina B₁₂ sérica (D) e de homocisteína total plasmática (E) em indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico

Os dados correspondem às medianas e aos intervalos interquartílicos. Os grupos pré-intervenção e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando o teste de Friedman, quando significativo foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos

As concentrações séricas de vitamina B₁₂ e plasmáticas de tHcy estão representadas na **Figura 26**. Não foram observadas diferenças significantes entre os períodos pré-intervenção e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/ dia de AF.

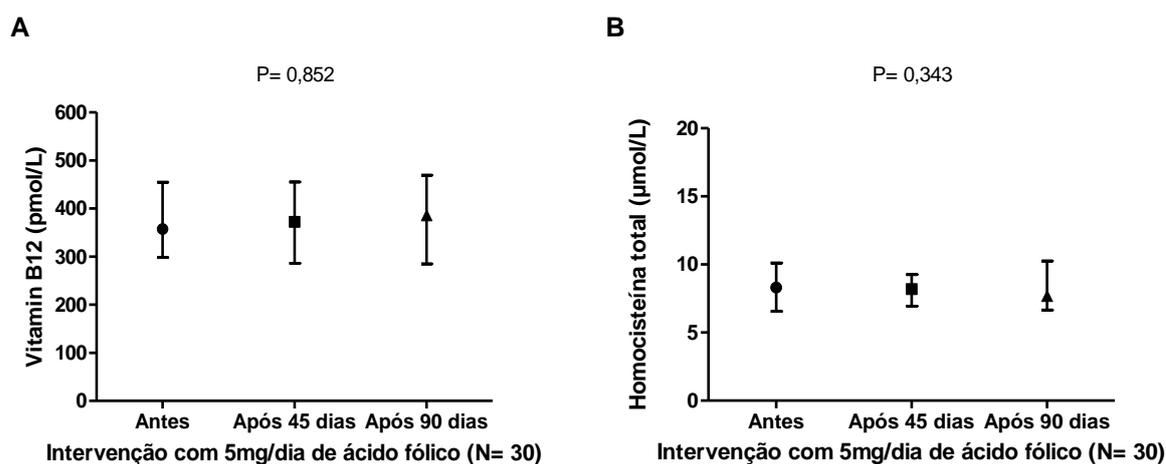


Figura 26. Concentrações séricas de vitamina B₁₂ (A) e de tHcy plasmática (B) em indivíduos saudáveis antes da intervenção e após 45 e 90 dias de uso diário de 5mg de ácido fólico

As barras correspondem às medianas e os intervalos interquartílicos. Os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando o teste de Friedman, quando significativo foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos

Nenhum dos participantes apresentou deficiência de vitamina B₁₂ nos períodos pré- e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia de AF.

As correlações de Spearman entre as concentrações de folato sérico pelo método microbiológico e de folato sérico e outras formas de folato por LC-MS/MS nos períodos pré-intervenção e após 45 dias e 90 dias de uso diário de 5mg de AF estão apresentadas na **Tabela 33**. É importante ressaltar a correlação significativa entre as concentrações de folato sérico determinadas por método microbiológico e as concentrações de folato sérico determinadas por LC-MS/MS tanto no período pré-intervenção como no período após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg dia de AF.

Tabela 33. Correlações de Spearman entre folato sérico determinado pelo método microbiológico e folato sérico e suas formas determinados por LC-MS/MS

	MÉTODO MICROBIOLÓGICO		
	Folato sérico nmol/L		
	Antes	Após 45 dias	Após 90 dias
MÉTODO LC-MS/MS			
Folato sérico total (nmol/l)	r=0,929; P<0,001; N=30	r=0,934; P<0,001; N=30	r=0,668; P<0,001; N=30
UMFA (nmol/L)	r=-0,031 ;P=0,869; N=30	r=0,606 ;P<0,001 ; N=30	r=0,267 ;P=0,154 ; N=30
5-metil-THF (nmol/L)	r=0,930 ;P<0,001 ; N=30	r=0,681 ;P<0,001 ; N=30	r=0,484 ;P=0,007 ; N=30
5-formil-THF (nmol/L)	r=0,351 ;P=0,057 ; N=30	r=0,240 ;P=0,189 ; N=30	r=0,491 ;P=0,125 ; N=11
THF (nmol/L)	r=0,531 ;P=0,003 ; N=30	r=0,861 ;P<0,001 ; N=30	r=0,261 ;P=0,163 ; N=30
5,10-metenil-THF (nmol/L)	r=0,402 ;P=0,028 ; N=30	r=0,440 ;P=0,015 ; N=30	r=0,198 ;P=0,295 ; N=30
MeFox (nmol/L)	r=0,060 ;P=0,752 ; N=30	r=-0,225 ;P=0,232; N=30	r=-0,059 ;P=0,755 ; N=30

UMFA: ácido fólico não metabolizado; THF: tetraidrofolato; MeFox: produto da oxidação do 5-metil-THF. As correlações significantes foram apresentadas em negrito

O consumo alimentar dos indivíduos incluídos no estudo está apresentado na **Tabela 34**. Embora tenha sido observado diferença significativa no consumo de folato natural e folato sintético nos três períodos estudados, o consumo alimentar total de folato apresentado como equivalente de folato dietético foi semelhante nos períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção.

O consumo de folato natural foi significativamente maior no período pré-intervenção comparado com os dois períodos de intervenção. Já o consumo de folato sintético foi significativamente maior no tempo 90 dias comparado ao tempo 45 dias.

Houve diferença ainda no consumo alimentar de proteínas vegetais, colesterol, fibras totais, ferro, vitamina B₆ e colina.

Observou-se correlação direta entre as concentrações de UMFA e a ingestão de folato sintético na dieta (r=0,550; P=0,002 e N=30) nos indivíduos saudáveis no período anterior a intervenção. Após 45 e 90 dias de uso de 5mg/dia de AF, não foi observada correlação de UMFA com o consumo de folato da dieta (natural ou sintético). Não houve associação entre o consumo de folato natural ou sintético com as concentrações séricas e eritrocitárias de folato nos períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção.

Tabela 34. Consumo alimentar dos indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico

Energia, macronutrientes e nutrientes*	Antes N= 30	Após 45 dias N= 30	Após 90 dias N=30	P valor
Energia (Kcal/dia)	2211,8 (1932,5 - 2539,1)	2003,2 (1817,5 - 2416,5)	2181,4 (1955,0 - 2291,2)	0,131
Carboidratos totais (g/dia)	291,62 (234,15 - 340,60)	262,13 (221,27 - 300,50)	271,57 (257,97 - 284,65)	0,131
Proteínas Totais (g/dia)	97,03 (78,35 - 110,71)	88,64 (79,97 - 97,95)	87,85 (77,17 - 106,87)	0,202
Proteínas animais (g/dia)	66,53 (55,52 - 73,55)	60,59 (52,19 - 77,83)	60,43 (55,79 - 65,79)	0,195
Proteínas vegetais (g/dia)	30,85 (28,07 - 32,74) ^a	27,94 (21,58 - 31,61) ^b	27,08 (23,74 - 31,51) ^b	0,001
Gorduras Totais (g/dia)	73,71 (71,16 - 77,21)	71,61 (67,00 - 81,01)	74,79 (63,92 - 90,18)	0,587
AG saturados (g/dia)	25,10 (23,77-26,00)	23,87 (21,99 - 26,70)	24,96 (20,46 - 32,12)	0,905
AG monoinsaturados (g/dia)	25,40 (24,08-27,00)	23,84 (20,78 - 26,14)	25,32 (21,93 - 28,30)	0,875
AG polinsaturados (g/dia)	17,98 (17,01-19,11)	17,87 (15,18 - 20,63)	19,28 (17,17 - 22,17)	0,515
Colesterol (mg/dia)	257,1 (225,4 - 309,4) ^a	289,8 (257,4 - 218,0) ^{ab}	251,5 (212,9 - 328,7) ^{ac}	0,016
Fibras totais (g/dia)	21,35 (18,29 - 23,67) ^a	19,67 (18,11 - 23,89) ^a	18,08 (16,03 - 19,74) ^b	<0,001
Ferro (mg/dia)	13,27 (11,21 - 16,19) ^a	11,71 (10,35 - 14,12) ^b	11,87 (10,16 - 12,93) ^b	0,002
Vitamina B2 (mg/dia)	1,67 (1,45 - 2,01)	1,77 (1,54 - 2,06)	1,75 (1,44 - 2,21)	0,767
Vitamina B6 (mg/dia)	2,03 (1,97 - 2,14) ^a	1,87 (1,80 - 2,15) ^{ab}	1,68 (1,30 - 2,07) ^b	0,007
Folato (µg DFE/dia) ¹	489,20 (432,18 - 521,26)	432,03 (321,67 - 502,76)	467,2 (390,45 - 538,80)	0,301
Folato natural (µg/dia)	278,33 (258,40 - 290,20) ^a	222,17 (202,47 - 290,29) ^b	217,89 (189,67 - 252,81) ^b	<0,001
Folato sintético (µg/dia)	114,67 (82,44 - 163,12) ^a	104,16 (76,13 - 123,94) ^{ab}	136,52(96,20 - 175,22) ^{ac}	0,003
Vitamina B ₁₂ (µg /dia)	3,90 (2,86 - 5,81)	3,99 (3,65 - 4,38)	4,22 (3,52 - 4,71)	0,662
Betaína (mg/dia)	150,86 (120,77 - 212,85)	160,91 (112,26 - 203,10)	145,6 (103,68 - 184,14)	0,740
Colina (mg/dia)	378,11 (332,71 - 446,82) ^a	371,89 (305,10 - 433,59) ^a	330,42(271,01- 387,80) ^b	0,001
Metionina (g/dia)	2,25 (1,80 - 2,51)	2,01 (1,83 - 2,20)	1,97 (1,75-2,53)	0,202

AG: ácidos graxos; *Considerado valor deatenuado pela remoção da variabilidade intrapessoal. Os valores apresentados são a mediana e intervalo interquartilico, entre parênteses. ¹ Apresentado como equivalente de folato dietético (*dietary folate equivalents* – DFE). 1 DFE = 1 µg de folato natural presente nos alimentos = 0,6 µg de folato sintético proveniente dos alimentos fortificados. Os tempos de intervenção foram comparados utilizando o teste de Friedman

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os resultados de hemograma, contagem de reticulócitos e de lactato desidrogenase estão apresentados na **Tabela 35**. Foi observado aumento da atividade de lactato desidrogenase após 90 dias de intervenção comparado com os períodos pré e após 45 dias de intervenção com AF.

Tabela 35. Valores hematológicos e bioquímicos nos indivíduos saudáveis nos três diferentes tempos de intervenção com 5mg diária de ácido fólico

	Antes	Após 45 dias	Após 90 dias	P valor
Eritrócitos (milhões/ μ L)	4,62 (4,30-4,96)	4,60 (4,29-4,87)	4,72 (4,42-5,01)	0,107
Hemoglobina (g/dL)	13,8 (13,1-15,4)	13,9 (13,1-15,1)	13,9 (13,5-15,2)	0,580
Hematócrito (%)	40,8 (38,8-43,4)	41,0 (38,8-43,5)	41,1 (38,9-44,0)	0,344
VCM (fL)	90,3 (86,6-91,7) ^{a,b}	90,6 (87,6-93,1) ^a	88,8 (86,7-90,9) ^b	0,009
HCM pg/mL	31,0 (29,6-31,8) ^a	31,0 (29,7-31,7) ^{a,b}	30,6 (29,6-31,3) ^b	0,001
CHCM (%)	34,8 (34,2-35,2)	34,3 (33,6-34,5)	34,6 (34,0-36,3)	0,081
RDW	13,2 (12,9-13,6)	13,5 (13,1-13,7)	13,5 (12,7-13,9)	0,258
Presença de anemia	2 (6,7)	0	0	
Leucócitos $\times 10^3/\mu$ L	6,4 (4,8-7,1)	5,6 (4,4-6,8)	5,7 (4,7-7,2)	0,485
Plaquetas $\times 10^3/\mu$ L	224 (170-234)	215 (176-242)	229 (193-246)	0,185
Reticulócitos (%)	0,8 (0,7-1,2)	0,8 (0,7-1,1)	0,8 (0,7-1,0)	0,375
LDH (U/L)	371 (339-408) ^a	377 (337-455) ^a	399 (373-429) ^b	0,001

VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração hemoglobínica corpuscular média; RDW: *red cell distribution width*; LDH: lactato desidrogenase. As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste Friedman, quando significativo, foi realizado o teste *post-hoc* de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. A variável categórica anemia foi apresentada como número de indivíduos (porcentagem).

Dois indivíduos (6,7%) do gênero masculino apresentaram anemia (hgb <13g/dL) normocítica antes do início da intervenção, o que foi corrigido após 45 dias de uso de 5mg de ácido fólico/ dia (**Tabela 36**). Estes dois indivíduos não apresentaram deficiência de ferro.

Tabela 36. Efeito da intervenção com 5mg/dia de ácido fólico nas concentrações de hemoglobina e folato sérico nos dois indivíduos que apresentaram leve anemia

	Intervenção com 5mg/dia de ácido fólico		
	Antes	Após 45 dias	Após 90 dias
Indivíduo 1			
Hemoglobina (g/dL)	12,2	14,7	15,0
Folato sérico (nmol/L)	11,8	51,4	82,5
Indivíduo 2			
Hemoglobina (g/dL)	12,6	14,6	15,9
Folato sérico (nmol/L)	15,0	78,5	77,8

Quando comparadas as concentrações de marcadores de processo inflamatório dos indivíduos antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg diária de ácido fólico, observou-se uma diminuição da proteína C reativa no tempo 45 dias quando comparado ao período pré-intervenção. Não foram observadas diferenças entre os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção para as citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ e TNF- α (**Tabela 37 e Figura 27**).

Tabela 37. Concentrações de marcadores de processo inflamatório em 30 indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com ácido fólico 5mg/dia

	Antes	Após 45 dias	Após 90 dias	P valor
PCR ultrasensível (mg/dL)	0,18 (0,12-0,41) ^a	0,10 (0,06-0,29) ^b	0,17 (0,09-0,38) ^{a,b}	0,004
IL-6 (pg/mL)	0,73 (0,32-1,05)	0,73 (0,38-1,13)	0,66 (0,38-1,22)	0,619
IL-8 (pg/mL)	3,68 (2,78-5,26)	4,57 (3,60-6,29)	4,25 (3,60-6,29)	0,792
IL-10 (pg/mL)	3,95 (2,58-5,48)	3,12 (1,79-5,36)	3,34 (2,03-4,79)	0,267
IFN- γ (pg/mL)	4,16 (2,34-7,41)	5,57 (2,38 (7,72)	5,12 (3,27-7,88)	0,112
TNF- α (pg/mL)	3,22 (2,27-4,55)	3,26 (2,31-4,44)	3,55 (2,50-4,94)	0,238

PCR: proteína C reativa; IL: interleucina; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α . As variáveis numéricas foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico (entre parênteses) e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste Friedman, quando significativo, foi realizado o teste *pos-hoc* de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos.

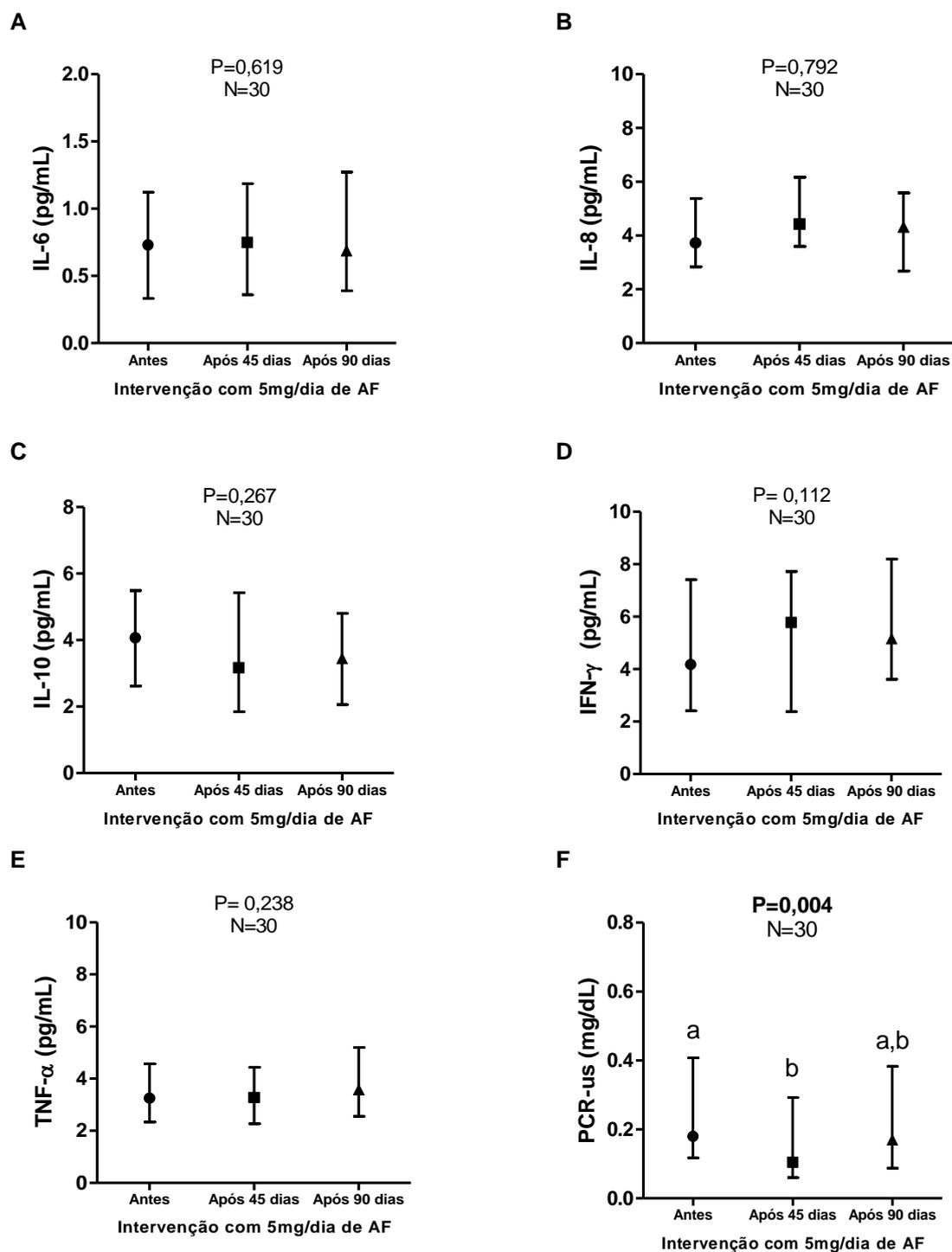


Figura 27. Concentrações séricas de IL-6 (A), IL-8 (B), IL-10 (C), IFN- γ (D), TNF- α (E) e proteína C reativa ultra sensível (PCR-us) (E) em indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 de intervenção com 5mg diária de ácido fólico

IL: interleucina; IFN- γ : interferon- γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral- α AF: ácido fólico. As barras correspondem às medianas e os intervalos interquartílicos. Os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando o teste de Friedman, quando significativo foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos

Citotoxicidade das células NK

O uso de AF 5mg/dia por 90 dias reduziu significativamente o número, e também a capacidade citotóxica das células NK quando comparados com o período anterior à intervenção. Não foi observado efeito sobre a atividade lítica das células NK (Figura 28).

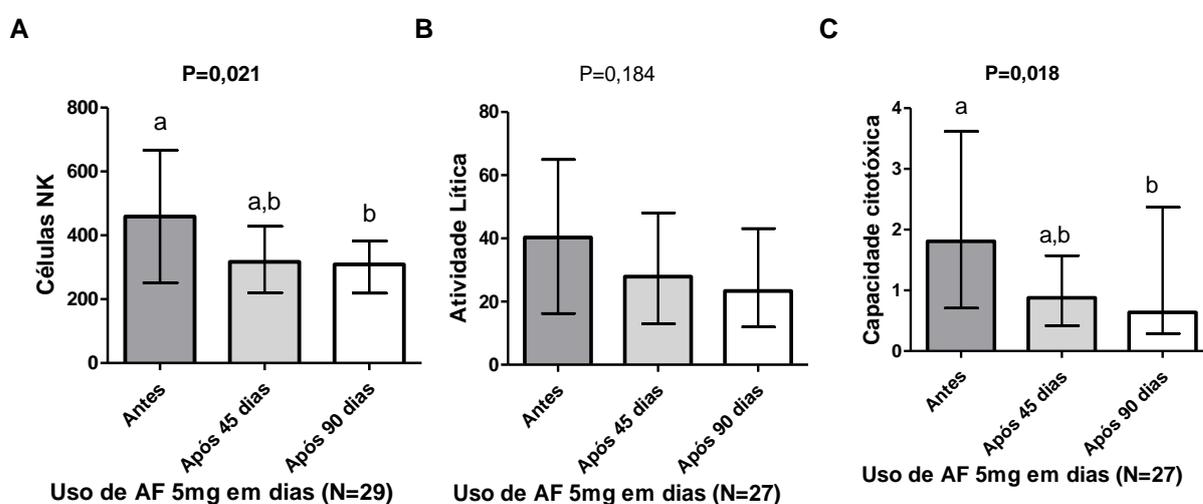


Figura 28. Número de células NK (A); atividade lítica das células NK (B); e capacidade citotóxica das células NK (C) em indivíduos saudáveis antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico (AF)

As variáveis foram apresentadas em mediana e intervalo interquartilico e os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando teste de Friedman e, quando significativo, foi realizado o teste pos-hoc de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os grupos. Em negrito foram apresentados os valores de $P < 0,05$. O número de amostras analisadas são menores devido as dificuldades com a técnica *in vitro*, a qual precisava ser realizada no dia e também devido a quantidade insuficiente de células mononucleares obtidas em alguns indivíduos. Resultados apresentados como células NK/ μL , atividade lítica (10^7 cels/UL15%) e capacidade citotóxica ([células NK/ μL] / UL15%)

Foram realizadas correlações de Spearman nos períodos pré-intervenção e após 45 e 90 dias de uso de AF entre o número, atividade lítica e capacidade citotóxica das células NK com concentrações séricas e eritrocitárias de folato, UMFA, citocinas (IL-6, IL-8, IL10, IFN- γ e TNF- α) e expressões de RNAm de genes da DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8.

As correlações significantes observadas foram:

1. *Período pré-intervenção*: correlações diretas entre número de células NK e concentrações séricas de IL-6 ($r=0,416$, $P=0,022$, $N=30$) e de IFN- γ ($r=0,574$, $P=0,001$, $N=30$);
2. *Após 45 dias de intervenção*: correlação entre capacidade citotóxica das células NK e IL-6 sérica ($r=0,366$, $P=0,047$, $N=30$) e correlação entre atividade lítica das células NK e IL-6 sérica ($r=0,386$, $P=0,035$, $N=30$);
3. *Após 90 dias de intervenção*: correlação entre capacidade citotóxica das células NK e IFN- γ sérico ($r=0,416$, $P=0,031$, $N=30$) e correlação entre atividade lítica das células NK e IFN- γ sérico ($r=0,394$, $P=0,042$, $N=30$).

Expressões de RNAm dos genes DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8

Com relação as expressões de RNAm, foi observado maior expressão de IL-8 após 45 dias de uso de AF quando comparado com o período pré-intervenção. Também foi observado aumento da expressão de TNF- α após 45 dias e após 90 dias da intervenção quando comparado ao período pré-intervenção. Não foram observadas diferenças entre os tempos para as expressões de RNAm de genes de DHFR, MTHFR e IFN- γ (**Figura 29**).

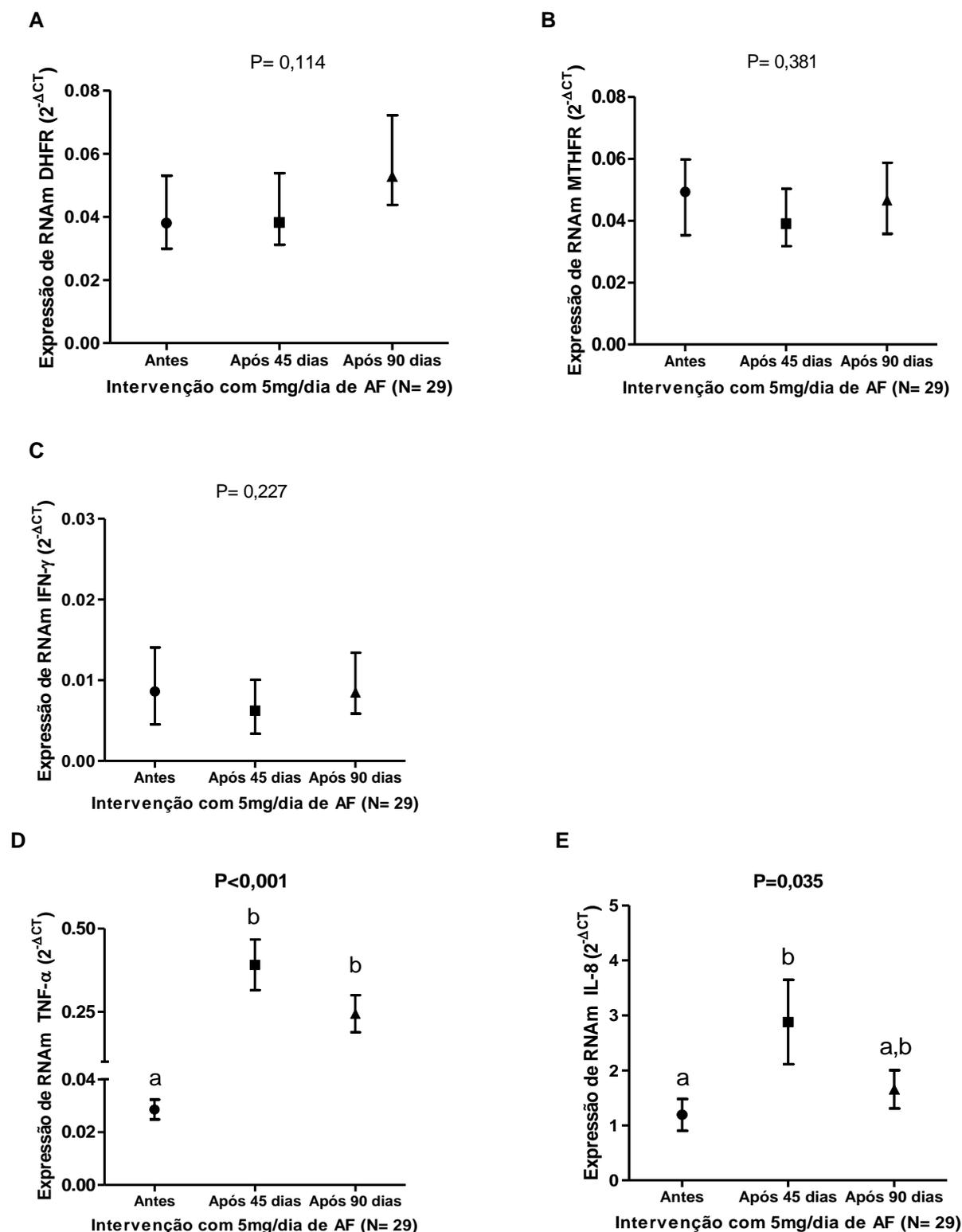


Figura 29. Expressões do RNAm dos genes de DHFR (A), MTHFR (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) e IL-8 (E) de indivíduos saudáveis, antes e após 45 e 90 dias de intervenção com 5mg diária de ácido fólico

Os dados estão apresentados com mediana e intervalos interquartílicos. Os períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico foram comparados utilizando o teste de Friedman, quando significativo foi realizado o teste de múltiplas comparações de Dunn's. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre os tempos

4.4 Somente indivíduos saudáveis cujos valores de ácido fólico não metabolizado foram determinados

Na **Tabela 38** são apresentados os resultados de folato sérico, eritrocitário, 5-metil-THF, UMFA, 5-formil-THF, THF, 5,10-metenil-THF, vitamina B₁₂ e tHcy para todos os indivíduos saudáveis com resultados de UMFA (controles saudáveis de EH e grupo intervenção com 5mg/dia antes da intervenção).

Tabela 38. Concentrações de folato sérico e eritrocitário, UMFA, outras formas de folato, vitamina B₁₂ e homocisteína total em 78 indivíduos saudáveis, cujos valores de ácido fólico não metabolizado (UMFA) foram determinados

	Mediana (P25 - P75)	Média geométrica (IC 95%)	P2,5	P10	P90	P97,5
Folato sérico (nmol/L)	19,8 (13,8 – 36,6)	20,8 (18,0 – 24,0)	5,9	7,6	45,6	57,9
Folato sérico total (nmol/L)	28,5 (22,5-38,9)	29,3 (26,1-32,9)	10,8	16,3	49,5	100,7
Folato eritrocitário (nmol/L)*	375 (222 – 640)	375 (320 – 439)	66	166	870	1399
UMFA (nmol/L)	0,77 (0,63 – 0,98)	0,79 (0,73- 0,86)	0,37	0,50	1,30	1,82
5-metil-THF (nmol/L)	26,3 (21,0-36,1)	26,4 (23,8-29,2)	9,1	14,7	46,4	57,8
5-formil-THF (nmol/L)**	0,08 (0,06-0,11)	0,07 (0,06-0,08)	0,01	0,04	0,13	0,14
THF (nmol/L)	0,84 (0,63-1,01)	0,77 (0,70-0,86)	0,25	0,40	1,35	1,55
5,10-metenil-THF (nmol/L)	0,07 (0,04-0,09)	0,06 (0,05-0,07)	0,01	0,03	0,11	0,14
Mefox (nmol/L)	1,12 (0,57-2,07)	1,08 (0,92-1,27)	0,29	0,42	3,02	3,62
Vitamina B₁₂ (pmol/L)	360 (293 – 458)	367 (340 – 397)	167	232	600	718
Homocisteína total (µmol/L)	9,2 (7,7 – 11,3)	9,4 (8,7 – 10,0)	5,6	6,4	13,2	22,6

*N=70, **N=47. UMFA: ácido fólico não metabolizado; THF: tetraidrofolato; Mefox: produto da degradação do 5-metil-THF; P2,5: percentil 2,5; P10: percentil 10; P90: percentil 90; P97,5: percentil 97,5; IC: intervalo de confiança

No grupo de 78 indivíduos saudáveis, não foram observadas correlações entre as concentrações séricas de UMFA com metilação global do DNA; com expressões de RNAm dos genes da DHFR, MTHFR, IFN γ , TNF- α e IL-8; com citocinas séricas IL6, IL-8, IL10, IFN γ , TNF- α ; e nem com número e citotoxicidade das células NK. Da mesma forma, também não foram observadas correlações entre as concentrações de UMFA e o consumo alimentar de folato sintético da dieta.

Um resumo dos principais achados do estudo estão apresentados nos **Quadros 8, 9 e 10**.

Quadro 8. Resumo dos principais achados do estudo no Grupo Esferocitose Hereditária (EH)

	Grupo EH comparado ao grupo controle	Associação com concentrações de UMFA	Outras associações
Vitaminas e tHcy	- Maiores concentrações de folato sérico e eritrocitário, UMFA, 5-metil-THF; - Sem diferenças na vitamina B12 e tHcy		- Concentrações suprafisiológicas de folato sérico em 55,% dos pacientes EH e 12,9% dos controles; - Deficiência de folato em 18,5% dos EH e 22,2% dos controles; - concentrações de UMFA 5 vezes maiores que as concentrações dos controles; - UMFA detectado em todos os pacientes EH e controles
Células NK	-Maior número de células NK; -Sem diferenças para atividade lítica e capacidade citotóxica	- Associação direta entre concentrações de UMFA e número de células NK no grupo total (EH e seus controles)	- Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e o número de células NK (grupo EH); - Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e atividade lítica no grupo total (EH + controle); - Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e capacidade citotóxica (grupo EH e grupo total);
Metilação global do DNA	- Sem diferença	- Sem associação	- Sem associação com consumo de folato da dieta ou concentrações de folato sérico e eritrocitário; - O aumento dos valores de expressão de TNF- α foi associado com proteção para os maiores valores de metilação global do DNA
Expressões de RNAm	- Maior expressão de RNAm do gene da IL-8; - Menor expressão de RNAm do gene de TNF- α .	- Sem associação	-Sem associações entre as concentrações de folato sérico e eritrocitário com as expressões de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, IFN- γ , TNF- α e IL-8.
Citocinas séricas	-Maiores concentrações séricas de IL-8 e TNF- α .	-Associação inversa de UMFA com as concentrações séricas de IL-10	- Associação inversa entre as concentrações séricas de folato e das concentrações séricas das citocinas IL-10 e IFN- γ
Consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)	- Sem diferença	- Correlação direta entre folato sintético da dieta e concentrações de UMFA no grupo total (EH + controles)	

Quadro 9. Resumo dos principais achados do estudo no Grupo β -Talassemia Heterozigótica (β -TH)

	Grupo β-TH comparado ao grupo controle	Associação com concentrações de UMFA	Outras associações
Vitaminas e tHcy	<ul style="list-style-type: none"> - Maiores concentrações de eritrocitário - Sem diferenças nas concentrações de folato sérico, vitamina B12 e tHcy 	- Não determinado	<ul style="list-style-type: none"> - Concentrações suprafisiológicas de folato sérico em 22% dos β-TH e 12% dos controles; - Deficiência de folato em 30% dos β-TH e 23% dos controles;
Células NK	<ul style="list-style-type: none"> - Maior número de células NK; - Sem diferenças para a atividade lítica; - Sem diferença para a capacidade citotóxica 	- Não determinado	<ul style="list-style-type: none"> - Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e atividade lítica no grupo total (β-TH + controle) e controle; - Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e capacidade citotóxica no grupo controle; - Correlação direta entre o número de células NK e as concentrações séricas de IL-6 e IL-10.
Metilação global do DNA	- Sem diferença	- Não determinado	<ul style="list-style-type: none"> - Sem associação com concentrações de folato sérico e eritrocitário; - O consumo alimentar de folato corrigido para DFE mostrou ser um bom marcador para a variável dependente "ter maiores valores de metilação global do DNA" tanto no grupo β-TH quanto no controle; - O aumento na expressão de RNAm do gene da DHFR mostrou proteção para ter maiores valores de metilação global do DNA.
Expressões de RNAm	<ul style="list-style-type: none"> - Maior expressão de RNAm do gene da IL-8; - Maior expressão de RNAm do gene de IFN-γ. 	- Não determinado	<ul style="list-style-type: none"> - Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e expressão de RNAm do gene da DHFR no grupo β-TH, controle e grupo total; - Associação inversa entre concentrações de folato eritrocitário e expressão de RNAm do gene da IFN-γ, TNF-α e IL-8 no grupo controle e grupo total;
Citocinas séricas	- Maiores concentrações séricas de IL-6 e IL-8	- Não determinado	<ul style="list-style-type: none"> - Correlação direta entre concentrações de folato eritrocitário e concentrações séricas de IFN-γ no grupo β-TH; - Correlação direta entre concentrações de folato sérico e concentrações séricas de IL-8 no grupo controle
Consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)	- Sem diferença	- Não determinado	- A variável consumo alimentar de folato ajustado para DFE mostrou ser um bom marcador para a variável dependente "ter maiores valores de metilação global do DNA", tanto no grupo β -TH, quanto nos controles

Quadro 10. Resumo dos principais achados do estudo de intervenção diária com 5mg de AF durante 90 dias

	Efeitos após a intervenção comparado ao período pré-intervenção	Associação com concentrações de UMFA	Outras associações
Vitaminas e tHcy	<ul style="list-style-type: none"> - Maiores concentrações de folato sérico, eritrocitário, UMFA e 5-metil-THF aos 45 e aos 90 dias; - Sem diferença para as concentrações de vitamina B₁₂ e tHcy 		<ul style="list-style-type: none"> - Deficiência de folato em 30% dos indivíduos no período pré-intervenção; - UMFA detectável em todos os indivíduos tanto pré quanto após a intervenção; - Concentrações suprafisiológicas de folato em todos os indivíduos após 45 e 90 dias da intervenção; - UMFA aumentado em 100% e em 96,7% dos indivíduos, respectivamente após 45 e 90 dias de intervenção
Células NK	<ul style="list-style-type: none"> - Menor número de células NK após 90 dias de intervenção; - Menor capacidade citotóxica após 90 dias de intervenção 	- Sem associação	<ul style="list-style-type: none"> - Correlações diretas entre o número de células NK e as concentrações de citocinas séricas IL-6 e IFN-γ no período pré-intervenção; - Correlações diretas entre a atividade lítica e a capacidade citotóxica com as concentrações séricas de IL-6 após 45 dias de intervenção; - Correlações diretas entre a atividade lítica e a capacidade citotóxica com as concentrações séricas de IFN-γ após 90 dias de intervenção;
Metilação global do DNA	Teste não realizado no estudo de intervenção		
Expressões de RNAm	<ul style="list-style-type: none"> - Maior expressão de RNAm do gene da IL-8 após 45 dias de intervenção; - Maior expressão de RNAm do gene de TNF-α após 45 e 90 dias de intervenção. 	- Sem associação	- Sem associação
Citocinas séricas	-Menores concentrações de PCR-us após 45 dias de intervenção comparado ao período pré-intervenção. concentrações séricas de IL-6 e IL-8	- Sem associação	- Sem associação

Continuação do Quadro 10.			
	Efeitos após a intervenção comparado ao período pré-intervenção	Associação com concentrações de UMFA	Outras associações
Consumo alimentar de folato (total ajustado para DFE, natural e sintético)	<ul style="list-style-type: none"> - O consumo de folato natural foi significativamente maior no período pré-intervenção comparado com os dois períodos de intervenção; - O consumo alimentar de folato sintético foi significativamente maior no tempo 90 dias comparado ao tempo 45 dias; - o consumo alimentar total de folato foi semelhante nos períodos pré e após 45 e 90 dias de intervenção. 	-Correlação direta das concentrações de UMFA e ingestão de folato sintético da dieta apenas no período pré-intervenção.	

5 DISCUSSÃO

Com início da fortificação de farinhas de trigo e milho no Brasil, em 2004, a população passou a estar exposta de maneira compulsória a maiores concentrações de ácido fólico na alimentação. Foi demonstrado em estudos anteriores de nosso grupo, que nesse período de fortificação, as concentrações médias de folato sérico praticamente dobraram na população (Lopreato et al., 2008; Britto, Cançado e Guerra-Shinohara, 2014).

Até recentemente, acreditava-se que o excesso de ácido fólico seria excretado na urina, portanto seria inócuo para o paciente/usuário, entretanto, as concentrações observadas especialmente após a adoção da política de fortificação de farinhas tem preocupado pesquisadores, especialmente pelos possíveis riscos associados a presença de UMFA no organismo (Wright, Dainty e Finglas, 2007; Smith, Kim e Refsum, 2008). As altas concentrações se tornam uma preocupação maior naquelas populações que além da exposição a fortificação de alimentos ainda fazem uso diário de terapêutica com AF.

Para avaliar o efeito do excesso de ácido fólico, que poderia ser decorrente do uso terapêutico, aliado ao consumo de alimentos fortificados com esta vitamina, incluímos três grupos (EH, β -TH e indivíduos saudáveis). Esta escolha teve como objetivo avaliar indivíduos com grande aumento da duplicação celular (EH), discreto aumento da eritropoese (β -TH) e finalmente, indivíduos submetidos apenas a fortificação compulsória das farinhas de trigo e milho com AF. Além da questão da eritropoese aumentada, procuramos escolher dois grupos com alterações hematológicas que não apresentassem um componente inflamatório importante.

A importância destes grupos está também, no fato que, no primeiro (EH) há uma indicação de uso diário de ácido fólico como terapêutica e no segundo (β -TH), a indicação de ácido fólico não é usual, uma vez que estes indivíduos não são acompanhados rotineiramente em ambulatórios de Serviços de Hematologia por serem na sua grande maioria assintomáticos.

Resultados preliminares durante o desenvolvimento do projeto nos levaram a inclusão também, de um estudo de intervenção, constituído de indivíduos saudáveis submetidos a uma intervenção com 5mg/dia de ácido fólico durante 90 dias.

A EH é caracterizada por aumento significativo da eritropoese. Para que estes pacientes possam repor os eritrócitos, são necessárias maiores quantidades de nutrientes essenciais como o AF, vitamina B₁₂, ferro entre outros. A dose terapêutica mais utilizada de AF, por estes pacientes, é de 1 comprimido de 5mg de AF por dia, apresentação da vitamina mais comum no Brasil. O intrigante é o fato desta dose ser cinco vezes superior à dose máxima tolerável (UL) que é de 1mg/dia (Institute of Medicine, 1998).

O uso crônico desta vitamina pelos pacientes com EH foi associado com concentrações cerca de duas vezes maiores de folato sérico e eritrocitário; e quatro vezes maiores de UMFA quando comparados aos seus controles com idades, gênero e IMC pareados. O aumento observado em nosso estudo para folato sérico foi semelhante às concentrações descritas anteriormente em estudo com pacientes EH portugueses (Rocha et al., 2011), os quais faziam uso terapêutico de AF, porém não estavam expostos a fortificação de alimentos com a vitamina.

Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que mostra valores tão altos de UMFA em pacientes com EH, o que é um alerta aos médicos hematologistas e uma preocupação de saúde pública, uma vez que são desconhecidos os efeitos destes valores muito elevados de UMFA nos pacientes com EH num período tão longo de tratamento com altas doses de AF. Nossos achados mostram, que ao contrário do que se pensava, o excesso desta vitamina não é excretado totalmente na urina.

Por sua vez, os indivíduos β -TH, apresentam alteração quantitativa leve na produção de cadeias β da globina. Estes indivíduos são em geral assintomáticos, porém, não é incomum apresentarem graus leves de hemólise e aumento discreto de eritropoese. É descrito que a maioria destes indivíduos não necessita de acompanhamento médico, embora alguns o façam e uns poucos usem terapêutica com AF. Quando usada, a dose de AF nos indivíduos β -TH também costuma ser de 5mg/dia.

Em nosso estudo, foi muito difícil a inclusão deste grupo, pelo fato de não serem acompanhados habitualmente em Serviços de Hematologia. A grande maioria dos indivíduos com β -TH incluídos, era de casos previamente listados em ambulatórios e que foram convidados a participar. A alta frequência de anemia (76%),

a presença de deficiência de folato (30%) e 1 indivíduo com concentração altíssima de tHcy (138 $\mu\text{mol/L}$) mostra que estes indivíduos, apesar de geralmente assintomáticos, podem se beneficiar de acompanhamento clínico e laboratorial de rotina, com avaliação periódica das concentrações de folato sérico.

Para a avaliação de excesso ou de deficiência de folato utilizamos os resultados de folato sérico determinado pelo método microbiológico, o qual é considerado padrão-ouro, uma vez que neste tipo de análise são quantificadas as formas biologicamente ativas de folato (WHO, 2015). O folato sérico total, determinado por LC-MS/MS compreende as diversas formas de folato, incluindo UMFA, 5-metil-THF, 5-formil-THF, THF, 5,10-metenil-THF além das formas oxidadas, biologicamente inativas, como Mefox. É importante salientar que os valores de folato sérico total e de 5-metil-THF, determinado por LC-MS/MS, mostraram forte e significativa correlação com os valores de folato sérico por método microbiológico, sendo adequado para avaliação das concentrações de folato.

A forma 5-metil-THF é a forma predominante de folato no plasma em indivíduos não usuários de terapêutica com AF. A mediana da forma 5-metil representa em torno de 94% da mediana de folato sérico total em não usuários de terapêutica com AF. No grupo EH, a proporção de 5-metil-THF foi de cerca de 84% do folato total devido a influência das concentrações de UMFA neste grupo. Resultados semelhantes foram descritos na população norte-americana, sendo que 15% dos indivíduos estudados eram usuários de AF (Pfeiffer et al., 2015).

O estudo de intervenção com 5mg diários de AF com indivíduos saudáveis foi muito importante no presente estudo, pois os achados encontrados no grupo EH poderiam ser decorrentes da anemia hemolítica e não do excesso de AF encontrado naquele grupo. Observou-se que no estudo de intervenção, após 45 dias de uso diário de 5mg de AF, houve aumento de aproximadamente 4,5 vezes nas concentrações de folato sérico e eritrocitário. Nota-se que este aumento foi maior que a diferença entre o grupo EH e seus controles (2,1 vezes). Isso ocorreu, muito provavelmente, porque o grupo EH apresenta maior necessidade deste nutriente pelo aumento das taxas de eritropoese e também, por se tratar de um modelo de exposição crônica ao excesso de AF, já que a maioria dos pacientes vem usando AF por dezenas de anos.

Concentrações de folato superiores a 45nmol/L são consideradas suprafisiológicas e após o período de fortificação de farinhas, tais concentrações foram observadas em 23% da população norte-americana (Smith, Kim e Refsum, 2008). No nosso estudo, as concentrações suprafisiológicas estavam presentes em cerca de 13% dos indivíduos controles saudáveis e não usuários de AF. Embora com frequências menores que do estudo norte-americano, isso demonstra que a política de fortificação de alimentos, por si só, é suficiente para produzir concentrações suprafisiológicas mesmo em indivíduos saudáveis que não estejam usando AF como terapêutica. No entanto, os benefícios no incremento das concentrações de folato sérico na população em geral e também, na redução da incidência de DFTN superam a importância do achado de concentrações suprafisiológicas.

Naqueles indivíduos que, além dos alimentos fortificados, também fazem uso terapêutico com AF (pacientes EH), as concentrações suprafisiológicas foram encontradas em 55,5% (método microbiológico) e em 74,1% (método LC-MS/MS) dos casos, mostrando o efeito do uso crônico de altas concentrações de AF nestes pacientes. A proporção de pacientes com concentrações suprafisiológicas (74,1%, pelo método de LC-MS/MS) foi exatamente a mesma de pacientes com concentrações aumentadas de UMFA. Além disso, o uso de AF 5mg/dia por 45 dias, no grupo intervenção, foi suficiente para que todos os indivíduos (100%) avaliados apresentassem concentrações suprafisiológicas de folato.

Foi observado no presente estudo, valores muito elevados de UMFA nos pacientes EH que fizeram uso de 5mg/dia de AF (mediana: 5,94 e intervalo interquartil: 1,92 – 76,10 nmol/L), enquanto que nos 4 pacientes com EH que não usavam esta vitamina estes valores foram de 0,65 (0,46 – 1,0) nmol/L. É interessante notar que todos os pacientes EH, seus controles saudáveis e todos os indivíduos do estudo de intervenção, mesmo no período pré-intervenção apresentaram concentrações detectáveis de UMFA.

Concentrações consideradas elevadas de UMFA (>1,30nmol/L) estavam presentes, principalmente nos pacientes EH em uso de terapêutica com AF, com cerca de 87% deles apresentando concentrações elevadas, e em alguns casos, apresentando concentrações de UMFA tão altas quanto 100nmol/L.

Cabe destacar, que as diferenças nas concentrações encontradas entre os grupos EH e controles e também β -TH e controles, não sofreu influência da alimentação, uma vez que o consumo tanto de folato total (apresentado como equivalente de folato dietético), quanto do consumo de folato de origem natural ou sintética foi semelhante entre os grupos.

Estes resultados em conjunto mostram a necessidade de um acompanhamento laboratorial destes pacientes para que as doses possam ser ajustadas às necessidades individuais, a fim de serem mantidas numa concentração satisfatória, de modo que não permita a deficiência da vitamina, mas também não produza concentrações tão elevadas, especialmente da forma não metabolizada (UMFA).

Apesar da preocupação com o excesso de AF, também se deve considerar a deficiência deste nutriente, que ainda é bem presente na população em geral. Na esferocitose, devido ao uso terapêutico, a frequência de deficiência de folato foi menor, entretanto, 30% dos indivíduos β -TH e em torno de 22% dos controles de ambos os grupos apresentaram baixas concentrações séricas de folato (<13,6nmol/L).

Estudo prévio de nosso grupo, com mulheres saudáveis, não usuárias de polivitamínicos, no período anterior à política de fortificação de farinhas (2003), mostrou que a frequência de deficiência de folato naquele período era de 37,3% (Barbosa *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram uma redução na deficiência para cerca de 22%, enquanto as concentrações de folato sérico foram cerca de 80% maiores do que o período pré-fortificação de farinhas.

Esses resultados mostram que, a fortificação de farinhas no Brasil levou à redução da frequência de deficiência de folato e a maiores concentrações séricas da vitamina. Por outro lado, ainda há uma parcela significativa de indivíduos apresentando concentrações inferiores às satisfatórias.

A maior incidência de deficiência de folato nos indivíduos β -TH mostra que, provavelmente, o leve aumento de eritropoese neste grupo requeira também uma compensação vitamínica maior do que aquela fornecida apenas pelas farinhas fortificadas.

Os nossos resultados mostram que, para parte significativa dos indivíduos controle e para cerca de 1/3 dos indivíduos β -TH, apenas a fortificação das farinhas

de trigo e milho, disponíveis nos últimos onze anos de política de fortificação compulsória, não foram suficientes para compensar as necessidades de parte da população. Assim, é importante destacar que a política de fortificação compulsória de farinhas com AF no Brasil, pode não estar sendo uma medida suficientemente protetora para todas as gestantes. Desse modo, é importante que campanhas alertando para a necessidade aumentada de AF durante o período reprodutivo e a suplementação com AF durante o pré-natal sejam mantidas. Todavia, da mesma forma que para os pacientes usuários crônicos de AF, a avaliação laboratorial das concentrações de folato nas gestantes seria muito importante para que as doses prescritas sejam as mais adequadas, impedindo deficiência do nutriente e, também, concentrações aumentadas de UMFA durante esse período.

As alterações observadas no hemograma dos pacientes EH são condizentes com o quadro clínico desta anemia hemolítica hereditária. A presença de anemia com redução da contagem de eritrócitos e aumento de reticulócitos reflete a condição hemolítica desta doença. O aumento de CHCM também é característico devido ao menor volume ocupado pelo esferócitos. Estes pacientes apresentam um leve grau inflamatório relacionado com a hemólise crônica o que produz um leve aumento na leucometria deste grupo, resultado semelhante ao descrito para pacientes EH em estudo descrito anteriormente na literatura (Rocha *et al.*, 2011).

Do mesmo modo, as alterações encontradas no hemograma dos indivíduos β -TH também refletem sua condição hematológica. A leve anemia microcítica e hipocrômica com eritrocitose é característica nos portadores dessa alteração genética. O aumento discreto da contagem de reticulócitos também reflete a eritropoese levemente aumentada, num grau bem menor que o visto nos pacientes EH. O aumento de hemoglobina A2 é também característico e confirma o diagnóstico da β -TH (Failace, Fernandes e Failace, 2009).

O ciclo do folato tem importância crucial na doação de grupamentos metil para todas as reações do organismo, incluindo a metilação do DNA. Já foi bem descrito que a metilação do DNA é um mecanismo importante na regulação da transcrição, interferindo na expressão e no silenciamento de genes. Além disso, alterações nos padrões de metilação poderiam facilitar o surgimento de células neoplásicas, as quais têm como característica padrões anormais de metilação do DNA (Cridler *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, não foi observado diferença na metilação global do DNA entre os grupos EH e β -TH quando comparados com seus respectivos grupos controle. Também não foi observado associação entre as concentrações de folato sérico, eritrocitário e UMFA com as taxas de metilação global do DNA no grupo EH. Além disso, o consumo de folato da dieta (natural, sintético ou total ajustado para DFE) também não foi associado com a metilação global do DNA.

Nossos resultados estão de acordo com o que vem sendo descrito na literatura. Até o presente momento não há evidências consistentes que a ingestão de grandes quantidades de folato ou ácido fólico leva à metilação aberrante do DNA, mudanças na expressão de genes ou a doenças (Crider *et al.*, 2012).

Em estudo com mulheres idosas, com alimentação controlada, a depleção de folato da dieta foi associada com redução nas taxas de metilação global do DNA (Jacob *et al.*, 1998b). Entretanto, em outro estudo semelhante com mulheres jovens essa redução não foi observada. Porém, foi encontrado aumento na metilação com a ingestão de folato durante o período da reposição da depleção e isso ocorreu apenas nos portadores do polimorfismo *MTHFR* 677 TT (Shelnutt *et al.*, 2004).

As altas concentrações de folato sérico e eritrocitário e também de UMFA encontradas no grupo de pacientes EH não foram capazes de acarretar modificações nas taxas de metilação global do DNA. Há de se considerar que diferentes regiões do genoma são reguladas de maneira distinta e as respostas de cada uma destas regiões à diferentes ofertas de doadores de grupos metil poderiam ser esperadas.

A metilação do DNA é um processo altamente regulado e dependente do tecido, da sequência do DNA, da região do genoma, de enzimas regulatórias e de diversos outros fatores (Crider *et al.*, 2012). A determinação das taxas de metilação global do DNA avalia a metilação em todo o DNA, porém, muitas vezes podem estar acontecendo hipermetilações em regiões ou genes específicos do DNA e hipometilação em outras, resultando numa compensação ao longo do DNA quando se avalia na totalidade. Ademais, novos estudos com mais indivíduos expostos a altas concentrações de UMFA são necessários para verificar os efeitos sobre a metilação do DNA na região promotora de genes específicos, de modo que, possam trazer respostas mais consistentes.

Outro aspecto importante abordado neste estudo foi efeito das concentrações de AF sobre a expressão de RNAm de genes de enzimas cruciais no ciclo do folato (MTHFR e DHFR). O AF proveniente da terapêutica ou da fortificação, tem maior biodisponibilidade em relação ao folato natural dos alimentos, porém, para que possa ser aproveitado ou incorporado ao ciclo celular de folato precisa antes ser reduzido a tetraidrofolato pela enzima DHFR. Como já mencionado anteriormente, alterações nesta enzima poderiam levar ao acúmulo de UMFA e DHF no organismo com baixo aproveitamento da vitamina. Da mesma forma, alterações no funcionamento da MTHFR prejudicaria todo o funcionamento do ciclo do folato, afetando as reações de metilação do DNA e a remetilação de homocisteína à metionina.

Em nosso estudo, as expressões de RNAm dos genes que codificam as enzimas DHFR e MTHFR foram semelhantes entre os grupos EH e β -TH quando cada um dos grupos foi comparado ao seu respectivo grupo controle. As concentrações de folato sérico e UMFA também não mostraram associação com a expressão dos genes dessas duas enzimas, mesmo no grupo intervenção.

São poucos os estudos que avaliam os efeitos do AF sobre a citotoxicidade das células NK e de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que corrobora com os achados descritos por Troen e colaboradores (Troen et al., 2006), que demonstraram, em estudo com grupo de mulheres pós-menopausa, que o excesso de ácido fólico proveniente de terapêutica estava associado à redução da citotoxicidade das células NK *in vivo*, em mulheres que consumiam maiores quantidade de folato da dieta (Troen et al., 2006).

Em nosso estudo, o uso diário de 5mg de AF durante 90 dias levou à redução significativa do número e da capacidade citotóxica das células NK. A redução relativa na capacidade citotóxica dos indivíduos do estudo de intervenção chegou a 64% comparado ao período pré-intervenção. Esta redução foi mais intensa que aquela descrita no estudo de Troen e colaboradores (2006), que incluiu mulheres pós-menopausa com sobrepeso ou obesas. Naquele estudo as mulheres com maiores concentrações circulantes de UMFA apresentaram redução de 23% na capacidade citotóxica das células NK comparadas com mulheres que não apresentavam concentrações detectáveis de UMFA. Porém, diferente do nosso estudo, as mulheres tomavam doses variáveis e concentrações menores de AF (Troen et al., 2006). Em adição aos resultados descritos na literatura, os nosso resultados fortalecem a

hipótese de que altas concentrações de AF podem levar a danos no funcionamento adequado destas células e na imunidade.

No grupo EH, constituído em sua maioria por usuários crônicos da terapêutica com AF, o efeito negativo de maiores concentrações de folato eritrocitário sobre o número e a capacidade citotóxica das células NK fortalece as evidências que há um risco das altas concentrações de AF sobre estas células. Em adição, um modelo de regressão linear univariada mostrou que o aumento no Ln do UMFA está relacionado ao aumento no número de células NK no grupo constituído por pacientes EH e seus controles. Por outro lado, o aumento do número das células NK tanto no grupo EH quanto no grupo β -TH parece ser um mecanismo compensatório do organismo à menor atividade lítica destas células individualmente.

Isso fica mais evidente se tomarmos o grupo EH como um modelo de exposição crônicas a altas doses de AF, e o grupo intervenção com 5mg/dia como um modelo agudo dessa exposição. Neste último grupo percebeu-se uma significativa redução do número e da capacidade citotóxica destas células, enquanto nos pacientes EH o número de células estava aumentado, mantendo a citotoxicidade das células NK num patamar semelhante ao de seus controles saudáveis. Nossa hipótese é que no modelo de exposição crônica (grupo EH), composto por indivíduos que usam 5mg/dia de AF continuamente por anos, ocorre um aumento compensatório do número de células NK de maneira a manter estável a citotoxicidade global destas células. É provável que o período de exposição de 90 dias utilizado no estudo de intervenção tenha sido insuficiente para produzir estas modificações adaptativas como ocorreu na exposição crônica.

Não está claro se tal magnitude de redução da capacidade citotóxica tem implicações biológicas. Da mesma forma, não se sabe se esta redução observada *in vitro* também ocorre na mesma proporção *in vivo*. Porém, é possível que esta redução leve à diminuição da vigilância contra células tumorais e reflita na produção de citocinas inflamatórias. Estudos epidemiológicos têm reportado uma relação entre a fortificação mandatória com AF e um aumento da incidência de câncer colorectal (Mason *et al.*, 2007; Hirsch *et al.*, 2009). Uma possível explicação para esta associação parece estar relacionada com a redução da capacidade citotóxica das células NK.

Também é preciso destacar que células NK são importante produtoras de algumas citocinas tais como IFN- γ , o TNF- α e IL-10 (Vivier *et al.*, 2011), e as concentrações de AF afetando as células NK poderiam levar, adicionalmente, a modificações na resposta inflamatória. Foi mostrado, no presente estudo, que a citotoxicidade das células NK estava associada diretamente com as concentrações de IL-6, IFN- γ e TNF- α no estudo de intervenção.

Entre as expressões de RNAm de genes das citocinas inflamatórias avaliadas, chama a atenção a maior expressão de RNAm do gene de IL-8 nos grupos EH e β -TH e também no grupo intervenção após 45 dias de uso diário de AF 5mg. Além do aumento de expressão, também foi observado aumento da concentração sérica de IL-8 nos grupos EH e β -TH, porém não no grupo intervenção após 45 dias.

A IL-8 é conhecida como “citocina quimiotática”, agindo como mediador do recrutamento de células para o local da infecção. O aumento de IL-8 no grupo EH poderia estar acontecendo devido a própria doença, entretanto o aumento observado na expressão do gene da IL-8 no estudo de intervenção sugere que esta alteração possa ser decorrente do aumento de AF, e que um tratamento crônico levaria também ao aumento das concentrações séricas. Ainda nesse aspecto, uma interessante correlação direta foi observada entre folato sérico e as concentrações de IL-8 no grupo β -TH.

Em estudo anterior realizado por Rocha e colaboradores (2011) com pacientes portugueses com EH, foi demonstrado que estes apresentam processo inflamatório brando, que embora não levasse a diferenças nas concentrações de PCR-us, levaram ao aumento de concentrações de TNF- α e IFN- γ (Rocha *et al.*, 2011). Nosso estudo demonstrou resultados semelhantes, com aumento de TNF- α neste grupo, sem diferenças para concentrações de PCR-us. Diferentemente do estudo português, não observamos diferenças nas concentrações de IFN- γ .

Por outro lado, o aumento da expressão de TNF- α no estudo de intervenção após 45 e 90 dias de uso de AF; e as maiores expressões de IL-6 no grupo β -TH corroboram com a hipótese de que, o AF também esteja desempenhando um papel nas diferenças observadas nestes parâmetros de inflamação. Além do mais, o efeito do AF sobre a IL-6, pode indiretamente interferir no metabolismo do ferro, uma vez que a IL-6 regula a síntese de hepcidina (Nemeth *et al.*, 2004).

Ademais, as concentrações de AF influenciaram também as concentrações da citocina anti-inflamatória IL-10, na medida em que foi observado correlação inversa das concentrações desta citocina com as concentrações de UMFA e de folato sérico no grupo EH. Estudo descrito na literatura demonstrou que a IL-10 aumenta a citotoxicidade *in vitro* de células NK contra células *Daudi* (célula de linhagem de linfoma de Burkitt) (Mocellin *et al*, 2004). Também foi descrito que a atividade *in vitro* das células NK extraídas de ratos idosos alimentados com uma sobrecarga de AF foi 50% menor que o controle. E a adição de IL-10 ao meio de cultura foi capaz de restaurar a atividade destas células (Sawaengsri *et al.*, 2014). O efeito do UMFA sobre as concentrações de IL-10 poderia ser outro modo pelo qual a sobrecarga de AF poderia influenciar a imunidade destas células. Segundo nosso conhecimento, essa é a primeira vez que se demonstra associação de concentrações aumentadas de folato e de UMFA com as concentrações de IL-10.

Sabe-se que um dos riscos de concentrações elevadas de folato sérico é o mascaramento dos sinais clínicos da deficiência de vitamina B₁₂, entretanto, apenas 1 (2%) indivíduo β -TH apresentou deficiência de vitamina B₁₂, enquanto não foi observado deficiência de vitamina B₁₂ nos pacientes EH. A vitamina B₁₂ desempenha importante papel juntamente com o folato na redução das concentrações de tHcy, porém no nosso estudo não foi observado diferença entre os grupos estudados e seus respectivos controles em relação à concentração de metabólito. Esse achado decorre provavelmente de os grupos analisados não apresentarem deficiência importante destas vitaminas e não apresentarem concentrações de tHcy elevadas. Da mesma forma, no estudo de intervenção com AF não foi observado diferença nas concentrações de tHcy com o aumento das concentrações de folato. Isso aconteceu porque as concentrações de tHcy em geral estavam dentro dos valores de referência já no período pré-intervenção.

Em síntese, o uso diário e continuado de AF em concentrações tão altas quanto 5mg levou a concentrações suprafisiológicas desta vitamina na maioria dos pacientes/indivíduos avaliados e do mesmo modo, a presença de altas concentrações de UMFA na circulação. Os achados do presente estudo são inéditos e estão entre os primeiros a mostrar que o uso de altas concentrações de AF está associado com alteração no número e capacidade citotóxica das células NK e na expressão das citocinas IL-8 e TNF- α . É muito importante que o uso terapêutico contínuo de 5 mg/dia

de AF no tratamento de anemias hemolíticas e durante a gestação seja reavaliado no Brasil de modo a impedir concentrações elevadas de UMFA nestes indivíduos, afetando parâmetros da imunidade que podem vir a perturbar mecanismos de vigilância imune. A partir dos nossos resultados fica evidente a necessidade de maior disponibilidade pela indústria farmacêutica de apresentações da vitamina contendo menores concentrações de AF para os indivíduos que necessitam de uso contínuo. Além disso, é muito importante que se faça uma monitoração laboratorial rotineira das concentrações de folato no sangue destes pacientes, de modo que seja mantido numa faixa que não permita a deficiência deste nutriente, mas que também não atinja concentrações que possam comprometer o sistema imune.

E por fim, é importante salientar que as políticas de fortificação de farinhas com AF no Brasil levaram a um aumento das concentrações de folato sérico na população de um modo geral, entretanto sem os efeitos negativos observadas nos indivíduos que usavam AF na terapêutica.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As concentrações de folato sérico e eritrocitário nos pacientes com EH foram, respectivamente, 2,1 e 1,67 vezes maiores do que em seus controles; no entanto, o uso diário de 5mg de AF em indivíduos saudáveis aumentou cerca de 4,7 vezes as concentrações de folato sérico e eritrocitário após 45 e 90 dias quando comparado com os valores anteriores da intervenção nos indivíduos saudáveis;
- ✓ As concentrações de UMFA nos pacientes com EH foram 5 vezes maiores quando comparados aos seus controles. No estudo de intervenção esse aumento foi de 5,3 e 3,1 vezes, respectivamente, após 45 e 90 dias de intervenção diária com 5mg de ácido fólico;
- ✓ As concentrações de vitamina B₁₂ e tHcy foram semelhantes nos grupos EH e seus controles, nos grupos β-TH e seus controles e no estudo de intervenção;
- ✓ As concentrações de UMFA não foram associadas com alterações nas taxas de metilação global do DNA;
- ✓ As expressão de RNAm do gene da IL-8 foi maior nos grupos com maiores concentrações de folato sérico e eritrocitário ou UMFA (grupos EH, β-TH e 45 dias após intervenção com AF). Os grupos EH e β-TH também apresentaram maiores concentrações séricas de IL-8;
- ✓ Maiores concentrações de folato sérico foram associadas a menores concentrações de IL-10 em pacientes com EH;
- ✓ O uso de altas concentrações de ácido fólico, no estudo de intervenção com 5mg de AF em indivíduos saudáveis, foi associado com a redução no número e capacidade citotóxica das células NK, o que poderia impactar na imunidade e na capacidade de vigilância antitumoral destas células;
- ✓ As concentrações de UMFA foram diretamente relacionadas com a ingestão de folato sintético da dieta em indivíduos saudáveis que não faziam uso de terapêutica com AF. Esta relação de UMFA com o consumo de folato dietético desaparece quando há uso terapêutico da vitamina;
- ✓ Por outro lado, a ingestão dietética de folato não foi associada com as concentrações de tHcy;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEGRA, C. J. et al. Inhibition of phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide transformylase by methotrexate and dihydrofolic acid polyglutamates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 15, p. 4881-5, Aug 1985.

ARAÚJO, J. R. et al. Folates and aging: Role in mild cognitive impairment, dementia and depression. **Ageing Res Rev**, v. 22, p. 9-19, Jul 2015.

ASHOKKUMAR, B. et al. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 1, p. 159-66, Jul 2007.

ATAIE-KACHOIE, P.; POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 24, n. 2, p. 163-73, Apr 2013.

AZEVEDO, D. V.; SAMPAIO, H. A. D. C. Consumo alimentar de gestantes adolescentes atendidas em serviços de assistência pré-natal. **Rev Nutr**, v. 16, n. 3, p. 7, 2003.

BAILEY, R. L. et al. Unmetabolized serum folic acid and its relation to folic acid intake from diet and supplements in a nationally representative sample of adults aged > or =60 y in the United States. **Am J Clin Nutr**, v. 92, n. 2, p. 383-9, Aug 2010.

BAILEY, S. W.; AYLING, J. E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 36, p. 15424-9, Sep 2009.

BANERJEE, D. et al. Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review. **Acta Biochim Pol**, v. 42, n. 4, p. 457-64, 1995.

BARBOSA, P. R. et al. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. **Clin Chim Acta**, v. 388, n. 1-2, p. 139-47, Feb 2008.

BARBOZA ARGÜELLO, M. E. L.; UMAÑA SOLÍS, L. M. [Impact of the fortification of food with folic acid on neural tube defects in Costa Rica]. **Rev Panam Salud Publica**, v. 30, n. 1, p. 1-6, Jul 2011.

BLENCOWE, H. et al. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. **Int J Epidemiol**, v. 39 Suppl 1, p. i110-21, Apr 2010.

BLOM, H. J. et al. Neural tube defects and folate: case far from closed. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 9, p. 724-31, Sep 2006.

BLOUNT, B. C. et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1997a.

BLOUNT, B. C. et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1997b.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 749-95, 1997.

BOLTON-MAGGS, P. H. et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. **Br J Haematol**, v. 126, n. 4, p. 455-74, Aug 2004.

BOUSHEY, C. J. et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA**, v. 274, n. 13, p. 1049-57, Oct 1995.

BOWER, C.; STANLEY, F. J. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. **Med J Aust**, v. 150, n. 11, p. 613-9, Jun 1989.

BRASIL. Resolução RDC n. 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a Fortificação das Farinhas de Trigo e das Farinhas de Milho com Ferro e Ácido Fólico. Brasília. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2002.

BRITTO, J. C.; CANÇADO, R.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Concentrations of blood folate in Brazilian studies prior to and after fortification of wheat and cornmeal (maize flour) with folic acid: a review. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n. 4, p. 275-86, 2014 Jul-Aug 2014.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, v. 97, p. 77-89, 1968.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genet Med**, v. 12, n. 2, p. 61-76, Feb 2010.

CASAS, J. P. et al. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 224-32, 2005 Jan 15-21 2005.

CASTAGNA, P. C. et al. [Behavior of blood folate in children with thalassemia major under transfusion therapy and in thalassemia trait]. **Acta Vitaminol Enzymol**, v. 6, n. 3, p. 183-8, 1984.

CASTILLO-LANCELOTTI, C.; TUR, J. A.; UAUY, R. Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. **Public Health Nutr**, v. 16, n. 5, p. 901-11, May 2013.

CAUDILL, M. A. Folate bioavailability: implications for establishing dietary recommendations and optimizing status. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 5, p. 1455S-1460S, May 2010.

CDC, C. F. D. C. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects--1983-1991. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 40, n. 30, p. 513-6, Aug 1991.

CHANDLER, C. J.; WANG, T. T.; HALSTED, C. H. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. **J Biol Chem**, v. 261, n. 2, p. 928-33, Jan 1986.

CHOI, S. W.; MASON, J. B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. **J Nutr**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2413S-2418S, Aug 2002.

COLE, B. F. et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. **JAMA**, v. 297, n. 21, p. 2351-9, Jun 2007.

COPPEN, A.; BOLANDER-GOUAILLE, C. Treatment of depression: time to consider folic acid and vitamin B12. **J Psychopharmacol**, v. 19, n. 1, p. 59-65, Jan 2005.

CORDERO, A. M. et al. Optimal serum and red blood cell folate concentrations in women of reproductive age for prevention of neural tube defects: World Health Organization guidelines. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 64, n. 15, p. 421-3, Apr 2015.

CRIDER, K. S. et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Adv Nutr**, v. 3, n. 1, p. 21-38, Jan 2012.

DARY, O. Nutritional interpretation of folic acid interventions. **Nutr Rev**, v. 67, n. 4, p. 235-44, Apr 2009.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, n. 10, p. 4192-9, Oct 2005.

DE WALS, P. et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. **N Engl J Med**, v. 357, n. 2, p. 135-42, Jul 2007.

DEVLIN, A. M. et al. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 3, p. 708-13, Mar 2006.

EICHHOLZER, M.; TÖNZ, O.; ZIMMERMANN, R. Folic acid: a public-health challenge. **Lancet**, v. 367, n. 9519, p. 1352-61, Apr 2006.

ERICSON, U. et al. High folate intake is associated with lower breast cancer incidence in postmenopausal women in the Malmö Diet and Cancer cohort. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 2, p. 434-43, Aug 2007.

FAILACE, R.; FERNANDES, F. B.; FAILACE, R. **Hemograma - Manual de interpretação**. 5. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FENECH, M. Folate, DNA damage and the aging brain. **Mech Ageing Dev**, v. 131, n. 4, p. 236-41, Apr 2010.

FISBERG, R. M.; VILLAR, B. S. **Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares: manual elaborado para auxiliar o processamento de dados de inquéritos alimentares**. São Paulo: Signus, 2002. 67.

Folic acid and neural tube defects. **Lancet**, v. 338, n. 8760, p. 153-4, Jul 1991.

FONSECA, V. M. et al. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. **Rev Bras Epidemiol**, v. 6, n. 4, p. 8, 2003.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, v. 10, n. 1, p. 111-3, May 1995.

FUJIMORI, E. et al. [Prevalence and spatial distribution of neural tube defects in São Paulo State, Brazil, before and after folic acid flour fortification]. **Cad Saude Publica**, v. 29, n. 1, p. 145-54, Jan 2013.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet J Rare Dis**, v. 5, p. 11, 2010.

GALLAGHER, P. G. The red blood cell membrane and its disorders: hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and related diseases. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M. A., *et al* (Ed.). **Williams Hematology**. 8^a. New York: McGraw-Hill Companies, 2010. cap. 45, p.617-646.

GARCÍA-ARIAS, M. T. et al. Iron, folate and vitamins B12 & C dietary intake of an elderly institutionalized population in León, Spain. **Nutr Hosp**, v. 18, n. 4, p. 222-5, 2003 Jul-Aug 2003.

GEORGE, P. M. et al. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. **Pharmacol Ther**, Mar 2012.

GOMES, S.; LOPES, C.; PINTO, E. Folate and folic acid in the periconceptional period: recommendations from official health organizations in thirty-six countries worldwide and WHO. **Public Health Nutr**, p. 1-14, Apr 2015.

GREEN, R. ABC of D's in the folate transporter. **Blood**, v. 116, n. 24, p. 5082-3, Dec 2010.

GREEN, R. Folate, cobalamin, and megaloblastic anemias. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M., *et al* (Ed.). **Williams Hematology**. 8^a. New York: McGraw-Hill, 2010. cap. 41, p.533-563.

GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism**, v. 56, n. 3, p. 339-47, Mar 2007.

HAMID, A. Folate Malabsorption and its Influence on DNA Methylation During Cancer Development. **DNA Cell Biol**, Apr 2012.

HARTTIG, U. et al. The MSM program: web-based statistics package for estimating usual dietary intake using the Multiple Source Method. **Eur J Clin Nutr**, v. 65 Suppl 1, p. S87-91, Jul 2011.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HIBBARD, B. M.; HIBBARD, E. D.; JEFFCOATE, T. N. Folic acid and reproduction. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 44, n. 3, p. 375-400, 1965.

HIRAYAMA, C. et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res**, v. 25, n. 4, p. 827-35, Apr 2008.

HIRSCH, S. et al. Colon cancer in Chile before and after the start of the flour fortification program with folic acid. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 21, n. 4, p. 436-9, Apr 2009.

HOEY, L. et al. Effect of a voluntary food fortification policy on folate, related B vitamin status, and homocysteine in healthy adults. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 5, p. 1405-13, Nov 2007.

HOFFBRAND, A. V.; WEIR, D. G. The history of folic acid. **Br J Haematol**, v. 113, n. 3, p. 579-89, Jun 2001.

HONEIN, M. A. et al. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. **JAMA**, v. 285, n. 23, p. 2981-6, Jun 2001.

HOUGHTON, L. A.; YANG, J.; O'CONNOR, D. L. Unmetabolized folic acid and total folate concentrations in breast milk are unaffected by low-dose folate supplements. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 1, p. 216-20, Jan 2009.

IMAI, K. et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. **Lancet**, v. 356, n. 9244, p. 1795-9, Nov 2000.

INGROSSO, D. et al. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. **Lancet**, v. 361, n. 9370, p. 1693-9, May 2003.

IOLASCON, A.; AVVISATI, R. A.; PISCOPO, C. Hereditary spherocytosis. **Transfus Clin Biol**, v. 17, n. 3, p. 138-42, Sep 2010.

JACOB, R. A. et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J Nutr**, v. 128, n. 7, p. 1204-12, Jul 1998a.

JACOB, R. A. et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J Nutr**, v. 128, n. 7, p. 1204-12, Jul 1998b.

JANKOVIC, L. et al. An initiation codon mutation as a cause of a beta-thalassemia. **Hemoglobin**, v. 14, n. 2, p. 169-76, 1990.

JHAVERI, M. S.; WAGNER, C.; TREPPEL, J. B. Impact of extracellular folate levels on global gene expression. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 6, p. 1288-95, Dec 2001.

JÄGERSTAD, M. Folic acid fortification prevents neural tube defects and may also reduce cancer risks. **Acta Paediatr**, v. 101, n. 10, p. 1007-12, Oct 2012.

KALMBACH, R.; PAUL, L.; SELHUB, J. Determination of unmetabolized folic acid in human plasma using affinity HPLC. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 1, p. 343S-347S, Jul 2011.

KALMBACH, R. D. et al. Circulating folic acid in plasma: relation to folic acid fortification. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 3, p. 763-8, Sep 2008.

KALMBACH, R. D. et al. A 19-base pair deletion polymorphism in dihydrofolate reductase is associated with increased unmetabolized folic acid in plasma and decreased red blood cell folate. **J Nutr**, v. 138, n. 12, p. 2323-7, Dec 2008.

KELLEHER, B. P.; BROIN, S. D. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. **J Clin Pathol**, v. 44, n. 7, p. 592-5, Jul 1991.

KELLEHER, B. P. et al. Microbiological assay for vitamin B12 with use of a colistin-sulfate-resistant organism. **Clin Chem**, v. 33, n. 1, p. 52-4, Jan 1987.

KELLY, P. et al. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. **Am J Clin Nutr**, v. 65, n. 6, p. 1790-5, Jun 1997.

KIM, Y. I. Role of folate in colon cancer development and progression. **J Nutr**, v. 133, n. 11 Suppl 1, p. 3731S-3739S, Nov 2003.

KIM, Y. I. Folate, colorectal carcinogenesis, and DNA methylation: lessons from animal studies. **Environ Mol Mutagen**, v. 44, n. 1, p. 10-25, 2004.

KIM, Y. I. Nutritional epigenetics: impact of folate deficiency on DNA methylation and colon cancer susceptibility. **J Nutr**, v. 135, n. 11, p. 2703-9, Nov 2005.

KIM, Y. I. Does a high folate intake increase the risk of breast cancer? **Nutr Rev**, v. 64, n. 10 Pt 1, p. 468-75, Oct 2006a.

KIM, Y. I. Folate: a magic bullet or a double edged sword for colorectal cancer prevention? **Gut**, v. 55, n. 10, p. 1387-9, Oct 2006b.

KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. **Mol Nutr Food Res**, v. 51, n. 3, p. 267-92, Mar 2007.

KIM, Y. I. et al. Dietary folate protects against the development of macroscopic colonic neoplasia in a dose responsive manner in rats. **Gut**, v. 39, n. 5, p. 732-40, Nov 1996.

KLEINJAN, A. et al. Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 103, n. 3 Pt 1, p. 441-50, Mar 1999.

LAANPERE, M. et al. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev**, v. 68, n. 2, p. 99-113, Feb 2010.

LANIER, L. L. NK Cell Recognition. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 225-74, 2005.

LARSSON, S. C.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Dietary folate intake and incidence of ovarian cancer: the Swedish Mammography Cohort. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 5, p. 396-402, Mar 2004.

LAUW, F. N. et al. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. **J Immunol**, v. 165, n. 5, p. 2783-9, Sep 2000.

LEE, C. H. et al. Increase in expression of IL-4 and IL-5 mRNA in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis during natural allergen exposure. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v. 106, n. 3, p. 215-9, Mar 1997.

LEE, M. S. et al. MTHFR polymorphisms, folate intake and carcinogen DNA adducts in the lung. **Int J Cancer**, Nov 2011.

LEONARD, E. J. et al. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. **J Immunol**, v. 144, n. 4, p. 1323-30, Feb 1990.

LEVY, E. M.; ROBERTI, M. P.; MORDOH, J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 676198, 2011.

LIMA, H. T.; SAUNDERS, C.; RAMALHO, A. Ingestão dietética de folato em gestantes do município do Rio de Janeiro. **Rev Bras Saude Mater Infant**, v. 2, n. 3, p. 8, 2002.

LINDZON, G. M. et al. Effect of folic acid supplementation on the progression of colorectal aberrant crypt foci. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 9, p. 1536-43, Sep 2009.

LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315-22, Nov 2009.

LIU, Z. et al. Mild depletion of dietary folate combined with other B vitamins alters multiple components of the Wnt pathway in mouse colon. **J Nutr**, v. 137, n. 12, p. 2701-8, Dec 2007.

LJUNGGREN, H. G.; KARRE, K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. **Immunol Today**, v.11, n.7, p.237-44, Jul 1990.

MACFARLANE, A. J.; GREENE-FINESTONE, L. S.; SHI, Y. Vitamin B-12 and homocysteine status in a folate-replete population: results from the Canadian Health Measures Survey. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 4, p. 1079-87, Oct 2011.

MALVEZZI, M.; ZAGO, M. A. Deficiências de vitamina B12 e de folatos: anemias megaloblásticas. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P., et al (Ed.). **Hematologia. Fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 21,

MANNINO, M. H. et al. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Lett**, v. 367, n. 2, p. 103-7, Oct 2015.

MARCHIONI, D. M.; FISBERG, R. M. **POP 3 – Críticas de inquéritos alimentares: padronização de medidas caseiras**. São Paulo: USP/ FSP/ GAC 2014.

MASON, J. B. et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 16, n. 7, p. 1325-9, Jul 2007.

MATTHEWS, R. G.; BAUGH, C. M. Interactions of pig liver methylenetetrahydrofolate reductase with methylenetetrahydropteroylpolyglutamate substrates and with dihydropteroylpolyglutamate inhibitors. **Biochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2040-5, May 1980.

MATTHIAS, C. et al. Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer. **Acta Otolaryngol**, v. 118, n. 2, p. 284-8, Mar 1998.

MCKILLOP, D. J. et al. The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. **Br J Nutr**, v. 88, n. 6, p. 681-8, Dec 2002.

INSTITUTE OF MEDICINE, I. O. **Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline** 1998.

MEYERS, C. A.; ALBITAR, M.; ESTEY, E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 104, n. 4, p. 788-93, Aug 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. **Pré-natal e puerpério - Atenção qualificada e humanizada**. ESTRATÉGICAS, D. D. A. P. Brasília: Ministério da Saúde 2006.

MIRANDA, S. R. P. et al. Hb Köln [$\alpha 2\beta 298$ (FG5) Val→Met] identified by DNA analysis in a Brazilian family. **Braz J Genet**, v. 20, n. 4, p. 4, 1997.

MITCHELL, L. E. et al. Spina bifida. **Lancet**, v. 364, n. 9448, p. 1885-95, 2004 Nov 20-26 2004.

MOCELLIN, S. et al. IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. **Genes Immun**, v. 5, n. 8, p. 621-30, Dec 2004.

MOLLOY, A. M. et al. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. **Food Nutr Bull**, v. 29, n. 2 Suppl, p. S101-11; discussion S112-5, Jun 2008.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORRIS, M. C. et al. Dietary folate and vitamin B12 intake and cognitive decline among community-dwelling older persons. **Arch Neurol**, v. 62, n. 4, p. 641-5, Apr 2005.

MORRIS, M. S. et al. Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 193-200, Jan 2007.

MOSHFEGH, A. J. et al. Improved method for the 24-hour dietary recall for use in national surveys. v. 13, n. A603 (abstr), 1999.

MOSHFEGH, A. J. et al. An improved approach to 24-hour dietary recall methodology. **Ann Nutr Metab** v. 45 (Suppl), n. 156 (abstr), 2001.

MOTIWALA, T. et al. Suppression of the protein tyrosine phosphatase receptor type O gene (PTPRO) by methylation in hepatocellular carcinomas. **Oncogene**, v. 22, n. 41, p. 6319-31, Sep 2003.

MUDGE, A. M. et al. Helping understand nutritional gaps in the elderly (HUNGER): a prospective study of patient factors associated with inadequate nutritional intake in older medical inpatients. **Clin Nutr**, v. 30, n. 3, p. 320-5, Jun 2011.

MURPHY, M. et al. The identification of the products of folate catabolism in the rat. **Br J Haematol**, v. 38, n. 2, p. 211-8, Feb 1978.

NASSER, C. et al. Semana da Conscientização Sobre a Importância do Ácido Fólico. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 11, n. 4, p. 199-203, 2005.

NAZER, J.; LÓPEZ-CAMELO, J.; CASTILLA, E. E. [ECLAMC: 30-year study of epidemiological surveillance of neural tube defects in Chile and Latin America]. **Rev Med Chil**, v. 129, n. 5, p. 531-9, May 2001.

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone Heparin. **J Clin Invest**, v. 113, n.4, p.1271-76, May 2004.

NEUHOUSER, M. L.; BERESFORD, S. A. Folic acid: are current fortification levels adequate? **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 868-72, Oct 2001.

NONAKA, M. et al. GM-CSF, IL-8, IL-1R, TNF-alpha R, and HLA-DR in nasal epithelial cells in allergic rhinitis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 153, n. 5, p. 1675-81, May 1996.

O'BROIN, S.; KELLEHER, B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 344-7, Apr 1992.

OBEID, R. et al. Concentrations of unmetabolized folic acid and primary folate forms in plasma after folic acid treatment in older adults. **Metabolism**, v. 60, n. 5, p. 673-80, May 2011.

OHKUBO, K. et al. Mechanisms of IL-6, IL-8, and GM-CSF release in nasal secretions of allergic patients after nasal challenge. **Rhinology**, v. 36, n. 4, p. 156-61, Dec 1998.

OHTOSHI, T. et al. Monocyte-macrophage differentiation induced by human upper airway epithelial cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 4, n. 3, p. 255-63, Mar 1991.

ORANGE, J. S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 9, p. 713-25, Sep 2008.

PACHECO, S. S. et al. Effects of folic acid fortification on the prevalence of neural tube defects. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 4, p. 565-71, Aug 2009.

PARLE-MCDERMOTT, A.; OZAKI, M. The impact of nutrition on differential methylated regions of the genome. **Adv Nutr**, v. 2, n. 6, p. 463-71, Nov 2011.

PATRINOS, G. P. et al. Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Database issue, p. D537-41, Jan 2004.

PEREIRA, A. C. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. **Clin Chim Acta**, v. 340, n. 1-2, p. 99-105, Feb 2004.

PERROTTA, S.; GALLAGHER, P. G.; MOHANDAS, N. Hereditary spherocytosis. **Lancet**, v. 372, n. 9647, p. 1411-26, Oct 2008.

PFEIFFER, C. M. et al. Determination of folate vitamers in human serum by stable-isotope-dilution tandem mass spectrometry and comparison with radioassay and microbiologic assay. **Clin Chem**, v. 50, n. 2, p. 423-32, Feb 2004.

PFEIFFER, C. M. et al. Unmetabolized folic acid is detected in nearly all serum samples from US children, adolescents, and adults. **J Nutr**, v. 145, n. 3, p. 520-31, Mar 2015.

PINHEIRO, A. B. V. et al. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras**. 5ª. São Paulo: Atheneu, 2008.

PIYATHILAKE, C. J. et al. Mandatory fortification with folic acid in the United States is not associated with changes in the degree or the pattern of global DNA methylation in cells involved in cervical carcinogenesis. **Cancer Biomark**, v. 2, n. 6, p. 259-66, 2006.

POGRIBNY, I. P. et al. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. **Cancer Res**, v. 55, n. 9, p. 1894-901, May 1995.

POGRIBNY, I. P.; JAMES, S. J. De novo methylation of the p16INK4A gene in early preneoplastic liver and tumors induced by folate/methyl deficiency in rats. **Cancer Lett**, v. 187, n. 1-2, p. 69-75, Dec 2002.

PUFULETE, M. et al. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. **Gastroenterology**, v. 124, n. 5, p. 1240-8, May 2003.

REYNOLDS, E. H. Benefits and risks of folic acid to the nervous system. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 72, n. 5, p. 567-71, May 2002.

ROCHA, S. et al. Erythropoiesis versus inflammation in Hereditary Spherocytosis clinical outcome. **Clin Biochem**, v. 44, n. 13, p. 1137-43, Sep 2011.

RODDIE, C.; DAVIS, B. Iron, B12 and folate. **Medicine**, v. 37, n. 3, p. 125-128, 2009.

ROMAGNÉ, F.; VIVIER, E. Natural killer cell-based therapies. **F1000 Med Rep**, v. 3, p. 9, 2011.

ROSENTHAL, J. et al. Neural tube defects in Latin America and the impact of fortification: a literature review. **Public Health Nutr**, p. 1-14, Mar 2013.

ROSS, S. A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. **Exp Oncol**, v. 29, n. 4, p. 250-6, Dec 2007.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. Beta-thalassemia. **N Engl J Med**, v. 353, n. 11, p. 1135-46, Sep 2005.

SAAD, S. T. O. Anemias por defeitos de membrana eritrocitária. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P., *et al* (Ed.). **Hematologia. Fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 26.

SALAZAR, M. D.; RATNAM, M. The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics? **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 1, p. 141-52, Mar 2007.

SANJOAQUIN, M. A. *et al*. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. **Int J Cancer**, v. 113, n. 5, p. 825-8, Feb 2005.

SANTOS, L. M.; PEREIRA, M. Z. [The effect of folic acid fortification on the reduction of neural tube defects]. **Cad Saude Publica**, v. 23, n. 1, p. 17-24, Jan 2007.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 170-81, Mar 2010.

SAWAENGSRU, H. *et al*. Reduced IL-10 production contributes to impaired NK cytotoxicity in old mice fed a high folic acid diet. **FASEB J**, v.28, n.1, Suplemento 638.3, Apr 2014.

SELHUB, J. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. **J Nutr Health Aging**, v. 6, n. 1, p. 39-42, 2002.

SELHUB, J. *et al*. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 2, p. 614S-620S, Feb 2000.

SESHADRI, S. *et al*. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 346, n. 7, p. 476-83, Feb 2002.

SHELNUTT, K. P. *et al*. Methylene tetrahydrofolate reductase 677C-->T polymorphism affects DNA methylation in response to controlled folate intake in young women. **J Nutr Biochem**, v. 15, n. 9, p. 554-60, Sep 2004.

SHENKIN, A.; BAINES, M. Vitaminas e elementos-traço. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R., *et al* (Ed.). **Tietz - Fundamentos de Química Clínica**. 6ª. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 27, p.489-521.

SMITH, A. D.; KIM, Y. I.; REFSUM, H. Is folic acid good for everyone? **Am J Clin Nutr**, v. 87, n. 3, p. 517-33, Mar 2008.

SOLOMONS, N. W. Food fortification with folic acid: has the other shoe dropped? **Nutr Rev**, v. 65, n. 11, p. 512-5, Nov 2007.

SONG, J. et al. Effects of dietary folate on intestinal tumorigenesis in the apcMin mouse. **Cancer Res**, v. 60, n. 19, p. 5434-40, Oct 2000.

SONG, J. et al. Chemopreventive effects of dietary folate on intestinal polyps in Apc+/-Msh2-/- mice. **Cancer Res**, v. 60, n. 12, p. 3191-9, Jun 2000.

SOUVEREIN, O. W. et al. Comparing four methods to estimate usual intake distributions. **Eur J Clin Nutr**, v. 65 Suppl 1, p. S92-101, Jul 2011.

SOUZA, D. M. D. S. **Mutações causadoras de β -talassemia em Ribeirão Preto-SP: identificação e correlação com o fenótipo da doença**. 2015. (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

STELUTI, J. et al. Folate, vitamin B6 and vitamin B12 in adolescence: serum concentrations, prevalence of inadequate intakes and sources in food. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 1, p. 43-9, 2011 Jan-Feb 2011.

SUITOR, C. W.; BAILEY, L. B. Dietary folate equivalents: interpretation and application. **J Am Diet Assoc**, v. 100, n. 1, p. 88-94, Jan 2000.

SUN, J. C.; LANIER, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 10, p. 645-57, Aug 2011.

SWEENEY, M. R. et al. Postprandial serum folic acid response to multiple doses of folic acid in fortified bread. **Br J Nutr**, v. 95, n. 1, p. 145-51, Jan 2006.

SWEENEY, M. R. et al. Evidence of unmetabolised folic acid in cord blood of newborn and serum of 4-day-old infants. **Br J Nutr**, v. 94, n. 5, p. 727-30, Nov 2005.

SWEENEY, M. R. et al. Measurements of sub-nanomolar concentrations of unmetabolised folic acid in serum. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 788, n. 1, p. 187-91, May 2003.

TALAULIKAR, V. S.; ARULKUMARAN, S. Folic acid in obstetric practice: a review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 66, n. 4, p. 240-7, Apr 2011.

TAM, C.; O'CONNOR, D.; KOREN, G. Circulating unmetabolized folic Acid: relationship to folate status and effect of supplementation. **Obstet Gynecol Int**, v. 2012, p. 485179, 2012.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol**, v. 47, p. 187-376, 1989.

TROEN, A. M. et al. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. **J Nutr**, v. 136, n. 1, p. 189-94, Jan 2006.

ULRICH, C. M. Nutrigenetics in cancer research--folate metabolism and colorectal cancer. **J Nutr**, v. 135, n. 11, p. 2698-702, Nov 2005.

ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Folate supplementation: too much of a good thing? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 2, p. 189-93, Feb 2006.

ULRICH, C. M.; POTTER, J. D. Folate and cancer--timing is everything. **JAMA**, v. 297, n. 21, p. 2408-9, Jun 2007.

UNICAMP, N. D. E. E. P. D. **TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** 2006.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 2002.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T. H. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes. Ácido Fólico**. BRASIL, F.-T. A. F. E. S. C. D. N. I. São Paulo: ILSI - International Life Science Institute. 10 2010.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 2011.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nat Immunol**, v. 9, n. 5, p. 503-10, May 2008.

WADDELL, L. The power of vitamins. **J Fam Health Care**, v. 22, n. 1, p. 14, 16-20, 22-5, 2012 Jan-Feb 2012.

WALD, D. S.; LAW, M.; MORRIS, J. K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. **BMJ**, v. 325, n. 7374, p. 1202, Nov 2002.

WEATHERALL, D. J. The thalasseмии: disorders of globin synthesis. In: KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M., *et al* (Ed.). **Williams Hematology**. 8^a. New York: McGraw-Hill, 2010. cap. 47, p.675-707.

WHO. **Guideline: Optimal Serum and Red Blood Cell Folate Concentrations in Women of Reproductive Age for Prevention of Neural Tube Defects**. Geneva: World Health Organization 2015.

WILKE, C. M. *et al*. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 11, p. 1529-41, Nov 2011.

WILLETT, W. C.; HOWE, G. R.; KUSHI, L. H. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr**, v. 65, n. 4 Suppl, p. 1220S-1228S; discussion 1229S-1231S, Apr 1997.

WILLIAMS, J. D. *et al*. Folate in skin cancer prevention. **Subcell Biochem**, v. 56, p. 181-97, 2012.

WRIGHT, A. J.; DAINITY, J. R.; FINGLAS, P. M. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. **Br J Nutr**, v. 98, n. 4, p. 667-75, Oct 2007.

YI, P. *et al*. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 38, p. 29318-23, Sep 2000.

ZAGO, M. A. Talassemias. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P., *et al* (Ed.). **Hematologia. Fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 31,

ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. **Alcohol Res**, v. 35, n. 1, p. 6-16, 2013.

ZHAO, R.; MATHERLY, L. H.; GOLDMAN, I. D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p. e4, 2009.

APÊNDICES

Apêndice A. Correlação de Spearman entre as concentrações de vitaminas e homocisteína total no sangue, ácido fólico total na dieta e taxa de metilação global do DNA nos pacientes com esferocitose hereditária e em seus controles

	Metilação do DNA	
	Esferocitose Hereditária	Controle
Folato sérico (nmol/L)	r= 0,119 P= 0,590 N= 23	r= -0,064 P= 0,688 N= 42
Folato eritrocitário (nmol/L)	r= -0,124 P= 0,584 N= 22	r= -0,008 P= 0,963 N= 37
UMFA (nmol/L)	r= 0,223 P=0,306 N=23	r=-0,159 P=0,315 N=42
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	r= -0,210 P= 0,335 N= 23	r= 0,036 P= 0,820 N= 42
Homocisteína total (µmol/L)	r= 0,314 P= 0,144 N= 23	r= -0,167 P= 0,292 N= 42
Folato (µg DFE/dia) ¹	r= -0,056 P= 0,799 N= 23	r= 0,378 P= 0,014 N= 42
Ácido fólico sintético (consumo) (µg/dia)	r= -0,153 P= 0,485 N= 23	r= 0,244 P= 0,120 N= 42
Folato natural dos alimentos (µg/dia)	r= 0,082 P= 0,710 N= 23	r= 0,062 P=0,695 N= 42

¹Apresentado como equivalente de folato dietético (*dietary folate equivalents* – DFE). 1 DFE = 1 µg de folato natural presente nos alimentos = 0,6 µg de folato sintético proveniente dos alimentos fortificados.

Apêndice B. Correlação de Spearman entre as concentrações de vitaminas e homocisteína total no sangue, ácido fólico total na dieta e taxa de metilação global do DNA nos indivíduos β -TH e seus controles

	Metilação do DNA	
	β -talassemia heterozigótica	Controle
Folato sérico (nmol/L)	r= -0,129 P= 0,393 N=46	r= - 0,213 P= 0,049 N= 86
Folato eritrocitário (nmol/L)	r= -0,013 P= 0,933 N= 46	r= - 0,257 P= 0,031 N= 71
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	r= 0,187 P= 0,213 N=46	r= 0,056 P= 0,609 N=86
Homocisteína (μ mol/L)	r= 0,032 P= 0,831 N=46	r= -0,235 P= 0,030 N= 86
DFE (consumo total de folato (μ g/dia)	r= 0,216 P= 0,149 N=46	r= -0,006 P= 0,956 N=76
Ácido fólico sintético (consumo) (μ g/dia)	r= 0,331 P= 0,025 N= 46	r= 0,066 P= 0,570 N=76
Folato natural dos alimentos (μ g/dia)	r= -0,065 P= 0,670 N=46	r= -0,189 P= 0,102 N=76

As correlações significantes estão marcadas em negrito

Apêndice C. Correlações de Spearman entre as expressões de RNAm e as concentrações séricas de marcadores do processo inflamatório, vitaminas e tHcy em pacientes com esferocitose hereditária

Concentração sérica	Expressões de RNAm dos genes				
	<i>DHFR</i>	<i>MTHFR</i>	<i>IFNγ</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>
IL6 (pg/mL)	r= -0,502 P= 0,010 N= 25	r= -0,246 P= 0,236 N= 25	r= -0,264 P= 0,213 N= 25	r= 0,107 P= 0,612 N= 25	r= 0,059 P= 0,778 N= 25
IL-8 (pg/mL)	r= -0,337 P= 0,100 N= 25	r= -0,453 P= 0,008 N= 25	r= -0,030 P= 0,891 N= 25	r= 0,128 P= 0,543 N= 25	r= 0,488 P= 0,013 N= 25
IL10 (pg/mL)	r= -0,179 P= 0,393 N= 25	r= 0,114 P= 0,589 N= 25	r= 0,203 P= 0,341 N= 25	r= 0,271 P= 0,190 N= 25	r= 0,278 P= 0,178 N= 25
IFN-γ (pg/mL)	r= -0,037 P= 0,859 N= 25	r= -0,177 P= 0,397 N= 25	r= -0,145 P= 0,499 N= 25	r= -0,032 P= 0,881 N= 25	r= -0,085 P= 0,687 N= 25
TNF-α (pg/mL)	r= 0,296 P= 0,151 N= 25	r= -0,076 P= 0,718 N= 25	r= -0,106 P= 0,622 N= 25	r= 0,019 P= 0,927 N= 25	r= 0,-0,158 P= 0,452 N= 25
PCR-us (mg/dL)	r= -0,271 P= 0,190 N= 25	r= -0,010 P= 0,962 N= 25	r= -0,332 P= 0,113 N= 25	r= -0,045 P= 0,832 N= 25	r= 0,148 P= 0,480 N= 25
Folato sérico (nmol/L)	r= 0,291 P= 0,159 N= 25	r= -0,030 P= 0,887 N= 25	r= 0,113 P= 0,590 N= 25	r= 0,030 P= 0,887 N= 25	r= -0,131 P= 0,533 N= 25
Folato eritrocitário (nmol/L)	r= 0,117 P= 0,585 N= 24	r= -0,036 P= 0,869 N= 24	r= -0,325 P= 0,130 N= 24	r= 0,329 P= 0,117 N= 24	r= 0,010 P= 0,965 N= 24
UMFA (nmol/L)	r= 0,288 P= 0,162 N= 25	r= -0,058 P= 0,783 N= 25	r= -0,129 P= 0,548 N= 25	r= 0,105 P= 0,619 N= 25	r= -0,142 P= 0,500 N= 25
Vitamina B₁₂ (pmol/L)	r= 0,008 P= 0,968 N= 25	r= 0,207 P= 0,321 N= 25	r= 0,306 P= 0,146 N= 25	r= 0,080 P= 0,704 N= 25	r= 0,220 P= 0,291 N= 25
tHcy (μmol/L)	r= -0,167 P= 0,424 N= 25	r= -0,145 P= 0,489 N= 25	r= 0,043 P= 0,840 N= 25	r= -0,150 P= 0,474 N= 25	r= -0,068 P= 0,745 N= 25

tHcy: homocisteína total plasmática; PCR-us: proteína C reativa ultra sensível. As correlações significantes estão marcadas em negrito

Apêndice D. Correlações de Spearman entre as expressões de RNAm e as concentrações séricas de marcadores do processo inflamatório, vitaminas e tHcy em indivíduos controles

Concentração sérica	Expressões de RNAm dos genes				
	<i>DHFR</i>	<i>MTHFR</i>	<i>IFNγ</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>
IL6 (pg/mL)	r= -0,045 P= 0,753 N= 53	r= -0,240 P= 0,084 N= 53	r= -0,136 P= 0,331 N= 53	r= 0,223 P= 0,108 N= 53	r= 0,377 P= 0,005 N= 53
IL-8 (pg/mL)	r= -0,001 P= 0,997 N= 53	r= -0,004 P= 0,979 N= 53	r= -0,099 P= 0,481 N= 53	r= 0,237 P= 0,087 N= 53	r= 0,213 P= 0,125 N= 53
IL10 (pg/mL)	r= 0,107 P= 0,450 N= 53	r= -0,121 P= 0,389 N= 53	r= 0,151 P= 0,281 N= 53	r= 0,147 P= 0,294 N= 53	r= 0,322 P= 0,019 N= 53
IFN-γ (pg/mL)	r= 0,128 P= 0,368 N= 53	r= -0,208 P= 0,135 N= 53	r= -0,028 P= 0,842 N= 53	r= 0,071 P= 0,614 N= 53	r= 0,077 P= 0,586 N= 53
TNF-α (pg/mL)	r= -0,020 P= 0,887 N= 53	r= -0,146 P= 0,296 N= 53	r= -0,263 P= 0,058 N= 53	r= 0,031 P= 0,825 N= 53	r= 0,242 P= 0,081 N= 53
PCR-us (mg/dL)	r= -0,090 P= 0,527 N= 53	r= -0,163 P= 0,243 N= 53	r= -0,225 P= 0,105 N= 53	r= 0,165 P= 0,239 N= 53	r= 0,286 P= 0,038 N= 53
Folato sérico (nmol/L)	r= 0,173 P= 0,219 N= 53	r= -0,001 P= 0,994 N= 53	r= 0,065 P= 0,643 N= 53	r= 0,186 P= 0,182 N= 53	r= 0,220 P= 0,113 N= 53
Folato eritrocitário (nmol/L)	r= 0,180 P= 0,248 N= 44	r= 0,117 P= 0,448 N= 44	r= 0,245 P= 0,110 N= 44	r= 0,239 P= 0,118 N= 44	r= 0,056 P= 0,720 N= 44
UMFA (nmol/L)	r= -0,114 P= 0,420 N= 53	r= 0,094 P= 0,504 N= 53	r= -0,087 P= 0,534 N= 53	r= 0,084 P= 0,548 N= 53	r= -0,011 P= 0,935 N= 53
Vitamina B₁₂ (pmol/L)	r= 0,163 P= 0,249 N= 53	r= 0,080 P= 0,568 N= 53	r= 0,036 P= 0,796 N= 53	r= -0,029 P= 0,839 N= 53	r= -0,038 P= 0,785 N= 53
tHcy (μmol/L)	r= -0,151 P= 0,286 N= 53	r= -0,266 P= 0,054 N= 53	r= -0,038 P= 0,788 N= 53	r= 0,215 P= 0,123 N= 53	r= 0,310 P= 0,024 N= 53

tHcy: homocisteína total plasmática; PCR-us: proteína C reativa ultra sensível. As correlações significantes estão marcadas em negrito

Apêndice E. Correlações de Spearman entre as expressões de RNAm e as concentrações séricas das citocinas, vitaminas e tHcy no grupo β -talassemia heterozigótica

	Expressões de RNAm dos genes				
	<i>DHFR</i>	<i>MTHFR</i>	<i>IFNγ</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>
Concentração sérica					
IL6 (pg/mL)	r= -0,196 P= 0,182 N= 48	r= -0,182 P= 0,217 N= 48	r= -0,161 P= 0,276 N= 48	r= -0,211 P= 0,149 N= 48	r= 0,065 P= 0,659 N= 48
IL-8 (pg/mL)	r= -0,078 P= 0,598 N= 48	r= -0,192 P= 0,192 N= 48	r= 0,003 P= 0,985 N= 48	r= 0,088 P= 0,550 N= 48	r= 0,369 P= 0,010 N= 48
IL10 (pg/mL)	r= -0,143 P= 0,332 N= 48	r= -0,107 P= 0,468 N= 48	r= 0,046 P= 0,757 N= 48	r= -0,049 P= 0,741 N= 48	r= 0,096 P= 0,518 N= 48
IFN-γ (pg/mL)	r= -0,168 P= 0,252 N= 48	r= -0,261 P= 0,073 N= 48	r= 0,145 P= 0,327 N= 48	r= -0,232 P= 0,113 N= 48	r= -0,038 P= 0,795 N= 48
TNF-α (pg/mL)	r= -0,010 P= 0,945 N= 48	r= 0,009 P= 0,953 N= 48	r= -0,084 P= 0,570 N= 48	r= 0,106 P= 0,472 N= 48	r= -0,009 P= 0,953 N= 48
PCR-us (mg/dL)	r= -0,198 P= 0,178 N= 48	r= -0,247 P= 0,090 N= 48	r= 0,176 P= 0,232 N= 48	r= -0,085 P= 0,566 N= 48	r= -0,112 P= 0,450 N= 48
Folato sérico (nmol/L)	r= -0,230 P= 0,116 N= 48	r= 0,059 P= 0,691 N= 48	r= 0,037 P= 0,800 N= 48	r= -0,098 P= 0,506 N= 48	r= -0,100 P= 0,501 N= 48
Folato eritrocitário (nmol/L)	r= -0,450 P= 0,001 N= 48	r= -0,275 P= 0,059 N= 48	r= 0,146 P= 0,321 N= 48	r= -0,205 P= 0,162 N= 48	r= -0,055 P= 0,709 N= 48
Vitamina B₁₂ (pmol/L)	r= -0,145 P= 0,325 N= 48	r= 0,005 P= 0,974 N= 48	r= -0,030 P= 0,837 N= 48	r= 0,023 P= 0,878 N= 48	r= -0,006 P= 0,967 N= 48
tHcy (μmol/L)	r= 0,186 P= 0,205 N= 48	r= -0,014 P= 0,925 N= 48	r= 0,142 P= 0,337 N= 48	r= 0,180 P= 0,220 N= 48	r= 0,108 P= 0,464 N= 48

As correlações significantes estão marcadas em negrito

Apêndice F. Correlações de Spearman entre as expressões de RNAm e as concentrações séricas das citocinas, vitaminas e tHcy em controles

	Expressões de RNAm dos genes				
	<i>DHFR</i>	<i>MTHFR</i>	<i>IFNγ</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-8</i>
Concentração sérica					
IL6 (pg/mL)	r= 0,124 P= 0,222 N= 98	r= -0,026 P= 0,797 N= 98	r= -0,024 P= 0,815 N= 98	r= 0,114 P= 0,266 N= 98	r= 0,051 P= 0,618 N= 98
IL-8 (pg/mL)	r= -0,040 P= 0,696 N= 98	r= -0,138 P= 0,176 N= 98	r= -0,246 P= 0,015 N= 98	r= 0,026 P= 0,803 N= 98	r= 0,019 P= 0,852 N= 98
IL10 (pg/mL)	r= -0,007 P= 0,944 N= 98	r= -0,023 P= 0,819 N= 98	r= 0,003 P= 0,978 N= 98	r= -0,008 P= 0,937 N= 98	r= 0,039 P= 0,701 N= 98
IFN-γ (pg/mL)	r= -0,050 P= 0,624 N= 98	r= -0,040 P= 0,694 N= 98	r= -0,038 P= 0,709 N= 98	r= 0,040 P= 0,698 N= 98	r= 0,007 P= 0,947 N= 98
TNF-α (pg/mL)	r= -0,133 P= 0,192 N= 98	r= -0,068 P= 0,507 N= 98	r= -0,304 P= 0,002 N= 98	r= 0,075 P= 0,464 N= 98	r= -0,059 P= 0,564 N= 98
PCR-us (mg/dL)	r= 0,193 P= 0,057 N= 98	r= 0,152 P= 0,134 N= 98	r= -0,036 P= 0,727 N= 98	r= 0,242 P= 0,017 N= 98	r= 0,091 P= 0,376 N= 98
Folato sérico (nmol/L)	r= 0,112 P= 0,274 N= 98	r= -0,036 P= 0,722 N= 98	r= -0,026 P= 0,797 N= 98	r= 0,005 P= 0,960 N= 98	r= -0,113 P= 0,269 N= 98
Folato eritrocitário (nmol/L)	r= -0,153 P= 0,172 N= 81	r= -0,359 P= 0,001 N= 81	r= -0,099 P= 0,378 N= 81	r= -0,250 P= 0,025 N= 81	r= -0,037 P= 0,741 N= 81
Vitamina B₁₂ (pmol/L)	r= -0,124 P= 0,223 N= 98	r= -0,087 P= 0,396 N= 98	r= 0,044 P= 0,668 N= 98	r= -0,084 P= 0,412 N= 98	r= -0,113 P= 0,272 N= 98
tHcy (μmol/L)	r= -0,098 P= 0,338 N= 95	r= -0,221 P= 0,029 N= 98	r= -0,102 P= 0,316 N= 98	r= 0,008 P= 0,939 N= 97	r= 0,110 P= 0,285 N= 97

As correlações significantes estão marcadas em negrito

Apêndice G. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coletas na UNIFESP



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIFESP

Projeto de Pesquisa: “Efeitos do ácido fólico não metabolizado sobre a metilação global do DNA, a expressão de RNAm e a citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina”

Nome: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____ Data de Nascimento: _____

Endereço: _____

N: _____ Apto: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e juntamente com o aluno de Doutorado Clóvis Paniz, estamos convidando-o (a) a participar do projeto de pesquisa que estamos desenvolvendo em colaboração com a equipe de médicos do Departamento de Hematologia e Oncologia da Escola Paulista de Medicina na UNIFESP.

Nesta pesquisa serão incluídos pacientes com esferocitose hereditária ou indivíduos portadores de traço talassêmico que estejam fazendo uso de 5 mg/dia de ácido fólico como tratamento e também serão incluídos indivíduos saudáveis. O objetivo desta pesquisa é avaliar os efeitos do ácido fólico quando administrados como tratamento ou quando consumidos na dieta habitual, uma vez que desde 2004 as indústrias vem fortificando as farinhas de milho e trigo com ácido fólico para cumprir uma norma do Brasil.

Se voce aceitar participar da pesquisa, precisaremos do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Ambulatório de Hematologia na Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. Serão colhidos 40 mL de sangue em jejum de 8 horas para a realização do hemograma, dosagem de vitaminas (folato e vitamina B12), e testes genéticos (DNA) para verificar a presença de alterações na expressão de genes, na metilação do DNA e na função de células do sistema imune. Os resultados laboratoriais obtidos serão utilizados para compreender melhor os efeitos desta vitamina no seu organismo.

O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Serão avaliadas as expressões dos genes β -globina, Interferon- γ , TNF- α , Interleucina-8, MTHFR e DHFR para verificar o efeito do ácido fólico nestas expressões. Será determinada a quantidade de substâncias relacionadas com a resposta imune (citocinas), bem como a quantidade de vitaminas no organismo. Além disso, será verificada a presença de lesões no DNA e de variações genéticas (estudo de polimorfismos) . A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de

Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em Biorrepositório sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação. Caso a amostra seja utilizada para pesquisas futuras, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e então você será consultado (a) sobre a permissão do uso deste material.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue serão enviados ao Ambulatório de Hematologia e serão colocados no seu prontuário para acompanhamento de seu médico. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Ambulatório de Hematologia não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do biorrepositorio no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos do tratamento com ácido fólico e também da fortificação de alimentos na população.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785), ou com o pesquisador Clovis Paniz (tel: 5361-7329 ou 3091-3785), ou com o Dra. Maria Stella Figueiredo ([tel: 2176-7268](tel:2176-7268)).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito voluntariamente participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ----- **SIM** ----- **NÃO**

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ----- **SIM** ----- **NÃO**

São Paulo, _____ de _____ de 20_____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepcf@usp.br ou o

Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 572 - 1º andar conj 14 – Vila Mariana – São Paulo – SP - Telefone 5571-1062 / 5539-7162

Apêndice H. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coletas na Santa Casa



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

Projeto de Pesquisa: “Efeitos do ácido fólico não metabolizado sobre a metilação global do DNA, a expressão de RNAm e a citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina”

Nome: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____ Data de Nascimento: _____

Endereço: _____

N: _____ Apto: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e junto com o aluno de Doutorado Clóvis Paniz, estamos convidando-o (a) a participar do projeto de pesquisa que estamos desenvolvendo em colaboração com a equipe de médicos da Santa Casa de Misericórdia São Paulo.

Nesta pesquisa serão incluídos pacientes com esferocitose hereditária ou indivíduos com traço talassêmico que estejam fazendo uso de 5 mg/dia de ácido fólico como tratamento e também serão incluídos indivíduos saudáveis. O objetivo desta pesquisa é avaliar os efeitos do ácido fólico quando administrados como tratamento ou quando consumidos na dieta habitual, uma vez que desde 2004 as indústrias vem fortificando as farinhas de milho e trigo com ácido fólico para cumprir uma norma do Brasil.

Se você aceitar participar da pesquisa, precisaremos do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Ambulatório de Hematologia do Hospital Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Serão colhidos 40 mL de sangue em jejum de 8 horas para a realização do hemograma, dosagem de vitaminas (folato e vitamina B12), e testes genéticos (DNA) para verificar a presença de alterações na expressão de genes, na metilação do DNA e na função de células do sistema imune. Os resultados laboratoriais obtidos serão utilizados para compreender melhor os efeitos desta vitamina no seu organismo.

O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Serão avaliadas as expressões dos genes β -globina, Interferon- γ , TNF- α , Interleucina-8, MTHFR e DHFR para verificar o efeito do ácido fólico nestas expressões. Será determinada a quantidade de substâncias relacionadas com a resposta imune (citocinas), bem como a quantidade de vitaminas no organismo. Além disso, será verificada a presença de lesões no DNA e de variações genéticas (estudo de polimorfismos). A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de

Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em Biorrepositório sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação. Caso a amostra seja utilizada para pesquisas futuras, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e então você será consultado (a) sobre a permissão do uso deste material.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue serão enviados ao Ambulatório de Hematologia e serão colocados no seu prontuário para acompanhamento de seu médico. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Ambulatório de Hematologia não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do biorrepositorio no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos do tratamento com ácido fólico e também da fortificação de alimentos na população.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785), ou com o pesquisador Clovis Paniz (tel: 5361-7329 ou 3091-3785), ou com o Dr. Rodolfo Cançado ([tel: 2176-7268](tel:2176-7268)).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito voluntariamente participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ----- SIM ----- NÃO

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ----- SIM ----- NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepcf@usp.br ou o **Comitê de Ética da Irmandade da Santa Casa de São Paulo**, Rua Santa Isabel, 305 – 4º andar – Santa Cecília – São Paulo – SP – Telefone: 2176-7688.

Apêndice I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para controles saudáveis



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo Controle

Projeto de Pesquisa: “Efeitos do ácido fólico não metabolizado sobre a metilação global do DNA, a expressão de RNAm e a citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina”

Nome: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____ Data de Nascimento: _____

Endereço: _____

N: _____ Apto: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e juntamente com o aluno de Doutorado Clóvis Paniz, estamos convidando-o (a) a participar do projeto de pesquisa que estamos desenvolvendo em colaboração com a equipe de médicos do Departamento de Hematologia e Oncologia da Escola Paulista de Medicina na UNIFESP.

Nesta pesquisa serão incluídos indivíduos em uso de farinhas fortificadas com ácido fólico (fortificação compulsória). O objetivo desta pesquisa é avaliar os efeitos do ácido fólico quando consumidos na dieta habitual, uma vez que desde 2004 as indústrias vem fortificando as farinhas de milho e trigo com ácido fólico para cumprir uma norma do Brasil.

Se você aceitar participar da pesquisa, precisaremos do seu consentimento para coletar amostras de sangue na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP ou na Faculdade de Medicina da UNIFESP e, além disso, precisaremos que você responda a um questionário simples sobre sua alimentação nas últimas 24h. Este questionário será repetido mais duas vezes por telefone em dias posteriores às coletas de sangue.

Em relação à coleta de material serão colhidos 40 mL de sangue em jejum de 8 horas para a realização do hemograma, dosagem de vitaminas (ácido fólico, vitamina B12 e B6), e testes genéticos (DNA e RNA) para verificar a presença de alterações na expressão de genes, na metilação do DNA e na função de células responsáveis pela defesa do organismo (sistema imune). Os resultados laboratoriais obtidos serão utilizados para compreender melhor os efeitos do ácido fólico no seu organismo.

O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Serão avaliadas as expressões de alguns genes do seu DNA (β -globina, Interferon- γ , TNF- α , Interleucina-8, MTHFR e DHFR), alterações no DNA (metilação, lesões e alterações de sequência – polimorfismos) para verificar o efeito do ácido fólico. Será determinada a quantidade de substâncias

relacionadas com a defesa do organismo (citocinas), bem como a quantidade de vitaminas. A sua amostra de DNA e sangue serão armazenadas no Laboratório de Hematologia da FCF/USP (biorrepositório), sob minha responsabilidade, e será usado código para identificar a amostra. Caso a amostra seja utilizada para pesquisas futuras, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e então você será consultado (a) sobre a permissão do uso deste material.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue poderão ser retirados no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP), situado na Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 17, Sala 113. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo sem quaisquer penalidades. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do biorrepositório no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos do tratamento com ácido fólico e também da fortificação de alimentos na população.

Você receberá uma cópia deste termo de consentimento esclarecido (TCLE) e outra cópia assinada por você ficará arquivada em nosso laboratório.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos da fortificação de alimentos com ácido fólico na população.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785) ou com o pesquisador Clóvis Paniz (tel: 5361-7329 ou 3091-3785).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito voluntariamente participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ----- **SIM** ----- **NÃO**

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ----- **SIM** ----- **NÃO**

São Paulo, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepcf@usp.br

Apêndice J. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para estudo de intervenção



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina”

Nome: _____

Doc de Identidade: _____ Sexo: _____ Data de Nascimento: _____

Endereço: _____

N: _____ Apto: _____ Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____ Telefone: _____

Duração da pesquisa: 2 anos

Prezado (a) senhor (a),

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e juntamente com os alunos de Doutorado Clóvis Paniz, Juliano Bertinato, Eduardo De Carli e de mestrado Maylla Rodrigues Lucena, estamos desenvolvendo um projeto de pesquisa em colaboração com a equipe de médicos do Departamento de Hematologia e Oncologia da Escola Paulista de Medicina na UNIFESP.

Nesta pesquisa estão sendo estudados pacientes (com esferocitose hereditária ou indivíduos portadores de traço talassêmico que estejam fazendo uso de 5 mg/dia de ácido fólico como tratamento) e também indivíduos saudáveis que estão servindo de controles desta pesquisa.

O objetivo desta pesquisa é avaliar os efeitos do ácido fólico quando administrados como tratamento ou quando consumidos na dieta habitual, uma vez que desde 2004 as indústrias de alimentos vem fortificando as farinhas de milho e trigo com ácido fólico para cumprir uma norma do Brasil.

Estamos agora numa segunda etapa do projeto onde serão avaliados os efeitos da ingestão de 5 mg dia de ácido fólico em indivíduos saudáveis e estamos convidando-o a participar como voluntário desta etapa.

Se você aceitar participar da pesquisa, precisaremos que:

1. Você tome um comprimido diário da vitamina ácido fólico 5 mg, o qual será distribuído gratuitamente, por um período máximo de 180 dias;
2. Você responda a uma entrevista simples sobre hábitos alimentares, antes do iniciar o uso de ácido fólico e a cada 30 dias durante o tratamento.
3. Você autorize coletar amostras de seu sangue antes do iniciar o uso de ácido fólico e a cada 30 dias durante o tratamento. Estas coletas serão realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, bloco 17. A coleta de sangue será realizada imediatamente após o seu consentimento e assinatura deste termo, por profissionais treinados (farmacêuticos), utilizando materiais descartáveis.

Serão colhidos 50 mL de sangue em jejum de 8 horas para a avaliação grau de anemia, presença ou não de inflamação e infecções, dosagens de vitaminas (ácido fólico, vitamina B6 e B12), ferro e proteínas relacionadas com este mineral e avaliação de alterações no RNA e sistema

imunológico. Os resultados laboratoriais obtidos serão utilizados para compreender melhor os efeitos do ácido fólico no organismo.

O risco deste estudo é mínimo.

A coleta de sangue poderá formar um hematoma no local da picada da agulha. Também esclarecemos que não existem riscos aos indivíduos submetidos a ingestão diária de 5 mg de ácido fólico.

Amostra de seu sangue serão armazenadas no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será usado código para identificar a amostra. Caso a amostra seja utilizada para pesquisas futuras, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e então você será consultado (a) sobre a permissão do uso deste material.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto, a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos exames realizados no sangue poderão ser retirados no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP), situado na Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 17, Sala 113. Todos os resultados serão disponibilizados a qualquer momento durante a pesquisa. Será garantida a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem dano algum, sem quaisquer penalidades e sem prejuízos pessoais. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados e amostras do biorrepositório no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento dos efeitos do tratamento com ácido fólico e também da fortificação de alimentos na população.

Você receberá uma cópia deste termo de consentimento esclarecido (TCLE) e outra cópia assinada por você ficará arquivada em nosso laboratório.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785), ou com os pesquisadores Clovis Paniz (tel: 95361-7329 ou 3091-3785) e Juliano Felix Bertinato (tel: 97962-4240 ou 3091-3785), ou com o Dra. Maria Stella Figueiredo (5576-4240).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito voluntariamente participar desta Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20_____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepcf@usp.br

Apêndice L. Formulário de coleta de dados dos pacientes esferocitose hereditária, indivíduos β -talassemia heterozigótica e controles saudáveis

Questionário

Data da entrevista: / /

Número da amostra:

Grupo: () Esferocitose hereditária () Traço talassêmico beta () Controle

Local da coleta: () Santa Casa
() UNIFESP
() USP
() _____

Nº do registro: _____
Nº do registro: _____
Nº do registro: _____
Nº do registro: _____

1. Identificação

Nome: _____
Endereço: _____
Ponto de referência: _____
Cidade: () São Paulo () Outra: _____ Telefone _____
E-mail: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Gênero: () Masculino () Feminino
Raça declarada: (0) Branca (1) Negra (2) Parda (3) Amarela (4) Índia

Peso: ___ Kg Altura: ___ cm.

Ocupação: _____
Escolaridade (anos de estudo): _____
Renda familiar mensal (reais): _____
Número de pessoas que contribuem: _____
Número de adultos na casa: _____ Número de crianças na casa: _____

Fumante: () Não () Sim

Há quanto tempo fuma: _____
Parou de fumar há _____ anos
Número de cigarros/dia: _____

Consumo de bebidas alcoólicas:

	Quantidade
(1) cerveja	_____
(2) vinho	_____
(3) cachaça	_____
(4) outra _____	_____

Uso de ácido fólico: (0) Não (1) Sim Dose: _____
Quando tomou pela última vez? Data: _____ Dose: _____
Uso de polivitamínico: (0) Não (1) Sim Qual: _____ Data: _____ Dose: _____
Uso de ferro (sulfato ferroso): (0) Não (1) Sim Qual: _____ Data: _____ Dose: _____
Uso de medicamentos: (0) Não (1) Sim Qual: _____

Você é hipertenso? (0) Não (1) Sim
Você é diabético? (0) Não (1) Sim () Tipo1 () Tipo2 Desde quando? _____
Você tem problema de tireoide: (0) Não (1) Sim () Hipotireoidismo () hipertireoidismo
Você é doador de sangue: () Sim () Não Se sim, quando doou pela última vez: _____
Você já recebeu transfusão sanguínea: (0) Não (1) Sim Motivo: () Hemorragia () Cirurgia () _____
Você teve alguma infecção no último ano: (0) Não (1) Sim _____

Apêndice M. Formulários de coleta de dados dos indivíduos participantes do estudo de intervenção com 5mg/dia de ácido fólico

Questionário 1.

Data da entrevista: / /

Número da amostra:

1. Identificação

Nome: _____

Peso: ____ Kg

Consumo de bebidas alcoólicas nos últimos 45 dias:	Quantidade	Frequência
(1) cerveja	_____ Copos	_____
(2) vinho	_____ Copos	_____
(3) cachaça	_____ Copos	_____
(4) outra _____	_____ Copos	_____

Fez uso de outra vitamina nos últimos 45 dias: (0) Não (1) Sim Qual: _____

Você doou sangue nos últimos 45 dias: () Sim () Não

Você teve alguma infecção nos últimos 45 dias: (0) Não (1) Sim _____

Uso de medicamentos (nome, dose, tempo de uso): _____

Questionário 2.**HISTÓRICO DE PERDAS OU REPOSIÇÃO DE SANGUE**

1. Nos últimos 2 anos, você doou sangue alguma vez? (1) SIM (0) NÃO

1.1. Quantas vezes você já doou sangue? (0) Nenhuma (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro (5) cinco ou +

1.1.1. Quanto tempo faz desde a sua última doação de sangue? _____

2. Nos últimos 2 anos, você recebeu transfusão de sangue alguma vez? (1) SIM (0) NÃO

2.1. Quantas transfusões você já recebeu? (0) Nenhuma (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro (5) cinco ou +

2.1.1. Quanto tempo faz desde a última transfusão de sangue? _____

3. Nos últimos 2 anos, você fez sangria alguma vez? (1) SIM (0) NÃO

4.1. Quantas vezes você já fez sangria? (0) Nenhuma (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro (5) cinco ou +

HISTÓRICO ALIMENTAR

1. Nos últimos 6 meses, você fez grandes mudanças nos seus hábitos alimentares?

(1) SIM (0) NÃO

2. Alguma vez você já foi orientado a fazer mudanças nos seus hábitos alimentares?

(0) Não (1) Sim, motivo: _____

3. Alguma vez, por conta própria, você faz mudanças nos seus hábitos alimentares?

(0) Não (1) Sim, para emagrecer (2) Sim, reduzir o consumo de carnes (3) Sim, para redução de sal (5) Sim, para redução do colesterol (6) Sim, para ganho de peso

() Outro motivo: _____

3.1. Se sim, quanto tempo faz desde que mudou seus hábitos alimentares? _____

5.2. Que classificação você dá para sua dieta atual:

(1) Onívora (consumo produtos de origem animal e vegetal sem restrições)

(2) Ovo-lacto-vegetariana (consumo leite e ovos, mas não consumo nenhum tipo de carne ou peixes)

(3) Vegetariana estrita (não consumo nenhum produto de origem animal)

(4) Outra: _____

Questionário 3.**HISTÓRICO OBSTÉTRICO-GINECOLÓGICO****1. Quando foi o primeiro dia de sua última menstruação?**

- (1) Há menos de 1 semana (2) Entre 1 e 2 semanas (3) Entre 3 e 4 semanas
 (4) Há mais de 4 semanas (5) Outro: _____

2. Você usa anticoncepcional oral / injetável / adesivos? (1) SIM (0) NÃO

2.1. Se sim, qual? _____ Há quanto tempo? _____

3. Você usa DIU? (1) SIM (0) NÃO**4. Nos último ano, sua menstruação se manteve regular (ciclo de 28±7 dias)?**

(1) SIM (0) NÃO

4.1 Se sim, quantos dias em média dura sua menstruação?

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)

4.2 Durante o período da menstruação, o fluxo menstrual é mais intenso durante quantos dias?

(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9)

5. Numa escala de 1 até 5, onde 1 corresponde a fluxo menstrual pouco intenso e 5 a fluxo menstrual muito intenso, que intensidade você atribui à sua menstruação?

(1) (2) (3) (4) (5)

6. Você já esteve alguma vez grávida? (0) Nunca (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro (5) cinco ou +

6.1. Se sim, há quanto tempo? _____

6.2. Se sim, quantos partos já teve? (0) Nenhum (1) uma (2) duas (3) três (4) quatro (5) cinco ou +

Se sim, que tipo de parto: (0) Não se aplica (1) Normal (2) Cesária

Tempo desde o último parto: _____

Quanto tempo faz desde que parou de amamentar a última vez? _____

ANEXOS

Anexo A. Informações para os Membros da Banca Julgadora de Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós- Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo B. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/69/2012
Protocolo CEP/FCF/621
CAAE: 04389512.2.0000.0067

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Aluno de Pós Graduação envolvido:	Clóvis Paniz
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

II – Apresentação do Projeto

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B que desempenha importante papel em diferentes reações no organismo. Sua deficiência produz diversas complicações clínicas, como anemia, aumento do risco de câncer colorretal e de doenças cardiovasculares, defeitos no fechamento do tubo neural, entre outros. Porém, com o início da fortificação de farinhas de trigo e milho com ácido fólico no Brasil, a partir 2004, a população passou a estar exposta de modo compulsório a quantidades desta vitamina além daquela existente normalmente nos alimentos. Sabe-se que o ácido fólico na sua forma sintética pode não ser completamente metabolizado levando ao aparecimento de uma fração não metabolizada no organismo. Isso é mais preocupante naqueles indivíduos que além da fortificação fazem uso terapêutico dessa vitamina, como aqueles com esferocitose hereditária e traço talassêmico β .

III - Os objetivos do presente estudo são:

Estudo transversal que tem como objetivo avaliar se concentrações séricas de ácido fólico não metabolizado afetam a metilação global, a expressão de RNAm dos genes β -globina, Interferon-gama, TNF-alfa, Interleucina- 8, MTHFR e DHFR em leucócitos mononucleares e a citotoxicidade de células NK em 30 pacientes com esferocitose hereditária e 100 portadores de traço talassêmico β expostos à fortificação compulsória e em uso de 5 mg/dia de ácido fólico, provenientes dos Ambulatórios de Hematologia da UNIFESP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e da Associação Brasileira de Talassemia e 260 funcionários ou voluntários saudáveis expostos à fortificação compulsória, provenientes da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo.

IV - Avaliação dos Riscos e Benefícios

Testes laboratoriais a partir de uma amostra de sangue serão efetuados em cerca de 390 participantes. Além disso, será realizada avaliação do consumo alimentar, por meio de um recordatório de 24 horas, aplicado três vezes, sendo pelo menos um no final de semana, adicionado de questionário de propensão de consumo desenvolvido a partir de questionário de frequência alimentar. A primeira medidá será realizada por entrevista pessoal e as demais por telefone. O risco é mínimo, representado pela coleta de sangue venosa que

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: cepfcf@usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

pode ocasionar mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. O projeto não trará benefícios imediatos aos indivíduos saudáveis, mas os pacientes participantes poderão ter seu tratamento ajustado as condições da fortificação mandatória com ácido fólico.

V - Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Está prevista a participação de 640 sujeitos de pesquisa, matriculados nos ambulatórios de Hematologia da UNIFESP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e da Associação Brasileira de Talassemia. Voluntários saudáveis expostos à fortificação compulsória, provenientes da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo também serão recrutados. As amostras de DNA e sangue serão armazenadas no Laboratório de Hematologia da FCF/USP (biorrepositório), sob a responsabilidade do pesquisador, usando código para identificar a amostra. Caso a amostra seja utilizada para pesquisas futuras, um novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e o pesquisador se compromete a consultar o sujeito da pesquisa sobre a permissão do uso do material. Não haverá envio de material biológico para o exterior.

VI – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 24 de setembro de 2012.

Cabe ao pesquisador responsável:

- Comunicar ao CEP:
 - A ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - A interrupção do projeto;
- Rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido termo. Da mesma forma, o sujeito de pesquisa ou seu representante legal;
- Apresentar relatórios parcial e final (modelo do CEP)

São Paulo, 25 de setembro de 2012.

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

Anexo C. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo

lataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/ Hospital São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina

Área Temática:

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

CAAE: 04389512.2.0000.0067

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 72905

Data da Relatoria: 06/07/2012

Apresentação do Projeto:

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B que desempenha importante papel em diferentes reações no organismo. Sua deficiência produz diversas complicações clínicas, como anemia, aumento do risco de câncer colorretal e de doenças cardiovasculares, defeitos no fechamento do tubo neural, entre outros. Porém, com o início da fortificação de farinhas de trigo e milho com ácido fólico no Brasil, a partir 2004, a população passou a estar exposta de modo compulsório a quantidades desta vitamina além daquela existente normalmente nos alimentos. Sabe-se que o ácido fólico na sua forma sintética pode não ser completamente metabolizado levando ao aparecimento de uma fração não metabolizada no organismo. Isso é mais preocupante naqueles indivíduos que além da fortificação fazem uso terapêutico dessa vitamina, como aqueles com esferocitose hereditária e traço

talassêmico β . Assim, o objetivo deste estudo será avaliar se concentrações séricas de ácido fólico não metabolizado afetam a metilação global, a expressão de RNAm dos genes β -globina, Interferon-gama, TNF- α , Interleucina-8, MTHFR e DHFR em leucócitos mononucleares e a citotoxicidade de células NK em 30 pacientes com esferocitose hereditária e 100 portadores de traço talassêmico β expostos à fortificação compulsória e em uso de 5 mg/dia de ácido fólico, provenientes dos Ambulatórios de Hematologia da UNIFESP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e da Associação Brasileira de Talassemia e 260 funcionários ou voluntários saudáveis expostos à fortificação compulsória, provenientes da Universidade de São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo. Serão incluídos 250 idosos com mais de 80 anos, acompanhados no Laboratório de Longevos da Disciplina de Geriatria e Gerontologia da UNIFESP, sendo utilizadas amostras armazenadas a -80°C .

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar se concentrações séricas de ácido fólico não metabolizado afetam a metilação global, a expressão de RNAm de genes (β -globina, Interferon-gama, TNF- α , Interleucina-8, MTHFR e DHFR) em leucócitos mononucleares, a citotoxicidade e o número de células NK em indivíduos saudáveis expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e em portadores de esferocitose hereditária e traço talassêmico β em uso terapêutico desta vitamina e fortificação compulsória.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo, envolvendo coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo desenvolvido por pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, tendo como co-participante UNIFESP e Santa Casa de Misericórdia. Apresenta carta de concordância com o estudo, de vários pesquisadores envolvidos, bem como carta de autorização da

Disciplina de Hematologia da UNIFESP e da Santa Casa de Misericórdia. Apresenta o instrumento de coleta de dados e descreve os procedimentos do estudo e parâmetros a serem analisados. Apresenta

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta folha de rosto da Instituição proponente. Apresenta TCLE para ser aplicado na UNIFESP, tanto para pacientes como para grupo controle.

Recomendações:

1. Aguardamos o parecer do CEP da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.
2. Apresenta autorização da Hematologia da UNIFESP para inclusão dos pacientes. Deverá apresentar autorização da UNIFESP para inclusão dos indivíduos do grupo controle, uma vez que serão incluídos funcionários e alunos.
3. Haverá utilização de material estocado coletados de projeto de 2009, com longevos, pela Disciplina de Geriatria e Gerontologia da UNIFESP. Apresenta carta de colaboração da pesquisadora responsável pelo estudo, no entanto, solicitamos carta autorizando a utilização do material estocado, na pesquisa atual.
4. Os pacientes cujas amostras estão estocadas, deverão ser contactados para obtenção de novo termo de consentimento, ou na impossibilidade de novo contato, apresentar justificativa.
5. Acrescentar ao TCLE os procedimentos nutricionais
6. Anexar ao projeto os formulários que serão utilizados no projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto só poderá ser iniciado após aprovaçãp da Instituição Proponente, acatando as recomendações deste comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acatou o parecer do relator

SAO PAULO, 13 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

Anexo D. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICÓRDIA DE SÃO
PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina

Pesquisador: Elvira Maria Guerra Shinohara

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 04389512.2.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 230.882

Data da Relatoria: 27/02/2013

Apresentação do Projeto:

O ácido fólico, uma vitamina do complexo B, começou a ser suplementada no Brasil através da fortificação de farinhas a partir de 2004. A população passou a estar exposta ao ácido fólico e a uma fração não metabolizada desta vitamina. O presente projeto visa entender como a fortificação compulsória pode atuar em indivíduos que recebem terapeuticamente o ácido fólico.

Objetivo da Pesquisa:

Contribuir para o melhor entendimento do metabolismo do folato e compreender os riscos associados à fortificação dos alimentos e terapêutica com ácido fólico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo envolvendo a coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo desenvolvido por pesquisadora da F.C.Farmacêuticas da USP tendo a ISCMSP e a UNIFESP como co-participantes

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão de acordo com as normas; porém, é necessário apresentar o Formulário de Autorização da ISCMSP.

Endereço: SANTA ISABEL

Bairro: VILA BUARQUE

CEP: 01.221-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2176-7689

Fax: (11)2176-7688

E-mail: eticamedbernadete@santacasasp.org.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICÓRDIA DE SÃO
PAULO



Recomendações:

É necessário anexar o formulário de autorizações da ISCMSP constando o nome do pesquisador responsável pelo projeto na Santa Casa de São Paulo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto só poderá ser iniciado acatando as recomendações deste Comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 27 de Março de 2013

Assinador por:

**Maria Helena Vianello Richtzenhain
(Coordenador)**

Endereço: SANTA ISABEL

Bairro: VILA BUARQUE

CEP: 01.221-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2176-7689

Fax: (11)2176-7688

E-mail: eticamedbernadete@santacasasp.org.br

Anexo E. Cópia do Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo relativo ao adendo com o estudo de intervenção



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa**

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina

Pesquisador: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP

Data da Reunião: 28/07/2014

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora solicita a inclusão de 30 indivíduos saudáveis como participantes da pesquisa ao projeto intitulado “Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina”, aprovado por este CEP em 25/09/2012 (parecer número 69/2012; CAAE 04389512.2.000.0067). Este grupo será submetido à intervenção com um comprimido de 5mg de ácido fólico/dia, por um período máximo de seis meses.

A justificativa para a inclusão deste grupo baseia-se na tentativa de confirmar os achados obtidos até o presente momento com a pesquisa, na qual foi verificado aumento da expressão da dihidrofolato redutase em pacientes com esferocitose hereditária e com maiores concentrações de ácido fólico circulante. Este achado, embora sugestivo da ação do ácido fólico nesta maior expressão gênica, não é suficientemente forte para validar e/ou confirmar o efeito do excesso da vitamina nestes indivíduos, uma vez que este aumento de expressão poderia de alguma forma estar relacionado com a própria condição hematológica destes indivíduos, que apresentam uma eritropoese aumentada. Desta forma, para confirmar este achado inédito na literatura científica, seria necessário analisar esses efeitos em indivíduos saudáveis submetidos a concentrações aumentadas de ácido fólico.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar se as concentrações séricas de ácido fólico não metabolizado afetam a metilação global e a formação de adutos do DNA, a expressão de RNAm dos genes da β -globina, interferon- γ , TNF- α , interleucina-8, MTHFR e DHFR em leucócitos mononucleares, a citotoxicidade e o número de células NK em indivíduos aparentemente saudáveis expostos a fortificação compulsória com ácido fólico, e em pacientes com esferocitose hereditária e indivíduos portadores de β -talassemia menor em uso terapêutico desta vitamina e também sob fortificação compulsória.

Avaliação dos Riscos:

Os voluntários saudáveis serão recrutados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, tomando as devidas precauções para não criar constrangimento



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa

ou coação sobre os participantes. Será realizada uma coleta de sangue anterior à primeira administração de ácido fólico e a cada 30 dias após o início da intervenção por um período máximo de seis meses. Nos dias de coleta serão coletados cerca de 50 mL de sangue em jejum de 8 horas para a realização de: hemograma, contagem de reticulócitos, atividade de lactato desidrogenase, proteína C reativa ultrasensível, ensaios de expressão gênica, análise de citotoxicidade de células NK, avaliação de estresse oxidativo, além da determinação da atividade da dihidrofolato redutase. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. A pesquisadora anexa carta da Dra. Maria Stella Figueiredo, Professora Associada da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UNIFESP, esclarecendo que a dosagem proposta de ácido fólico a ser administrada neste grupo de participantes da pesquisa não traz efeitos indesejáveis aos indivíduos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante, pois poderá fornecer dados sobre os mecanismos e efeitos do ácido fólico em indivíduos expostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora responsável apresenta novo TCLE para este grupo de participantes da pesquisa. O TCLE encontra-se sob a forma de convite, está em linguagem acessível ao participante e contempla todos os requisitos descritos na Resolução 466/12.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do adendo da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

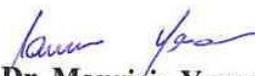
Situação do Parecer:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o adendo pode ser aprovado.

São Paulo, 30 de julho de 2014.


Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Coordenador do CEP/FCF/USP

Anexo F. Ficha do Aluno

03/10/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7913964/1 - Clóvis Paniz

Email: clovis.paniz@usp.br
Data de Nascimento: 21/06/1979
Cédula de Identidade: RG - 1057941898 - RS
Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico Bioquímico - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2002
Mestrado: Mestre em Bioquímica Toxicológica (1) - Universidade Federal de Santa Maria - Rio Grande do Sul - Brasil - 2007

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 02/02/2012
Início da Contagem de Prazo: 02/02/2012
Data Limite para o Depósito: 02/02/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 02/02/2012 até o presente.
 Email: emguerra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 27/03/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 02/02/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 03/10/2015 16:24:58

03/10/2015

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7913964/1 - Clóvis Paniz

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
FBC5793-10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	90	A	N	Concluída
EDM5102-2/8	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/03/2012	25/04/2012	60	4	80	A	N	Concluída
BMI5841-5/3	Tópicos Avançados em Imunologia Fundamental (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	30/04/2012	20/05/2012	45	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5723-5/1	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais, Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-Oclusivos	11/06/2012	01/07/2012	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5771-7/1	Bioinformática Aplicada às Análises Clínicas	10/07/2012	23/07/2012	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5736-2/2	Alterações Bioquímicas e Moleculares nas Anemias	14/08/2012	18/09/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	100	A	N	Concluída
MPT5793-1/2	Citogenômica I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	19/09/2012	13/11/2012	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5705-4/2	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/12/2012	09/12/2012	30	2	90	B	N	Concluída
FBC5755-1/3	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	01/04/2013	05/05/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BIO5784-4/1	Organização do Genoma Humano (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	02/08/2013	29/11/2013	120	8	86	A	N	Concluída
FBC5733-3/2	Ciências Farmacêuticas na Educação em Saúde	07/10/2013	20/10/2013	60	0	-	-	N	Turma cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	43
Estágios:			
Total:	0	20	43

Créditos Atribuídos à Tese: 167

03/10/2015

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 2878, de 26.08.2005..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2015

Impresso em: 03/10/2015 16:24:58

Anexo G. Currículo Lattes

Dados pessoais

Nome Clóvis Paniz
Nascimento 21/06/1979 - Ilópolis/RS - Brasil
CPF 932.480.160-00

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Ciências (Análises Clínicas).
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm e na citotoxicidade das células NK em indivíduos expostos a fortificação compulsória com ácido fólico e/ou em uso terapêutico desta vitamina
 Orientador: Elvira Maria Guerra Shinohara
- 2005 - 2007** Mestrado em Bioquímica Toxicológica.
 Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
 Título: Avaliação do estado micronutricional e de estresse oxidativo em idosos, Ano de obtenção: 2007
 Orientador: Solange Cristina Garcia
- 2004 - 2005** Especialização em Laboratório Clínico II.
 Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
 Título: Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e o seu diagnóstico laboratorial
 Orientador: Solange Cristina Garcia
- 1998 - 2002** Graduação em Farmácia Análises Clínicas.
 Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil

Formação complementar

- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Análise de dados utilizando o SPSS.
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Biologia Molecular.
 Portal Farmácia e Portal Educação, PFPE, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Citologia Clínica.
 Portal Farmácia e Portal Educação, PFPE, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Curso de Metodologia do Ensino.
 Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Hematologia Geral.
 Conselho Regional de Farmácia do Estado de Mato Grosso do Sul, CRF/MS, Brasil,
 Ano de obtenção: 2005
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Imunohematologia Eritrocitária.
 Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil, Ano de obtenção:
 2004
- 2003 - 2004** Curso de curta duração em Curso de Docência Em Ensino Superior.
 Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil, Ano de obtenção:
 2004

2002 - 2002	Curso de curta duração em Técnicas p/ coleta de secreções do Sistema TELELAB. Ministério da Saúde, MS, Brasília, Brasil
2002 - 2002	Monitor de Hematologia Clínica. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
2002 - 2002	Extensão universitária em Curso de extensão em Línguas Estrangeiras. Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil, Ano de obtenção: 2002

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: estudante de doutorado , Carga horária: 40h, Regime: Integral

2. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Vínculo institucional

2004 - Atual Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Farmacêutico-Bioquímico, Carga horária: 40h, Regime: Integral

2009 - 2010 Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor substituto, Carga horária: 20h, Regime: Parcial

2002 - 2004 Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Técnico de laboratório de análises clínicas, Carga horária: 40h, Regime: Integral

2002 - 2004 Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor substituto, Carga horária: 20h, Regime: Parcial

1999 - 2002 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20h, Regime: Parcial

1998 - 1999 Vínculo: Estagiário Voluntário, Enquadramento funcional: Estagiário Voluntário, Carga horária: 16h, Regime: Parcial

Atividades

01/2004 - Atual Serviço Técnico Especializado, Hospital Universitário, Laboratório do Hospital Universitário de Santa Maria
Especificação:
Farmacêutico -Bioquímico

11/2002 - 11/2004 Graduação, Farmácia Análises Clínicas
Disciplinas ministradas:
Estágio supervisionado em Laboratório de Análises Clínicas , Hematologia Clínica , Bioquímica Clínica I

01/2002 - 02/2002 Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Banco de Sangue
Estágio:
Estágio em Banco de sangue do Hospital Universitário de Santa Maria, totalizando 120 horas.

12/1998 - 09/1999 Estágio, Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Santa Maria
Estágio:
Estágio em Laboratório de Análises Clínicas do Laboratório do Hospital Universitário de Santa Maria totalizando 560 horas.

3. Base Aérea de Santa Maria - BASM

Vínculo institucional

2002 - 2002 Vínculo: Estagiário Voluntário, Enquadramento funcional: Estagiário voluntário, Carga horária: 8h, Regime: Parcial

Atividades

04/2002 - 08/2002 Estágio, Hospital da Base Aérea, Laboratório de Análises Clínicas
*Estágio:
 Estágio Voluntário em Análises Clínicas.*

4. Cooperativa Educacional de Professores de Santa Maria - CEPISM

Vínculo institucional

2007 - 2010 Vínculo: Professor horista , Enquadramento funcional: Professor horista , Carga horária: 15, Regime: Parcial

Atividades

11/2007 - Atual Aperfeiçoamento
*Especificação:
 Boas Práticas em Análises Clínicas , Microbiologia , Bioquímica*

5. Universidade Regional Integrada - Campus Erechim - URI - ERECHIM

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor visitante, Regime: Parcial

6. Universidade Regional Integrada - Campus Santo Ângelo - URI - S. ÂNGELO

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor visitante, Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. NASCIMENTO, S., CHARÃO, M., MORO, A., ROEHRS, M., **PANIZ, Clóvis**, BAIERLE, M., BRUCKER, N., GIODA, A, JR., F., BOHRER, D., ÁVILA, D., GARCIA, S. Evaluation of Toxic Metals and Essential Elements in Children with Learning Disabilities from a Rural Area of Southern Brazil. International Journal of Environmental Research and Public Health. , v.11, p.10806 - 10823, 2014.
2. GARCIA, S.C., GROTTTO, D., BULCÃO, R. P., MORO, A., ROEHRS, M, VALENTINI, J, **PANIZ, Clóvis**, DE FREITAS, F. A., BUBOLS, G.B., CHARÃO, M. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. Drug and Chemical Toxicology (New York, N.Y. 1978). , v.36, p.306 - 312, 2013.

3. VICENTINI, J. T., VALENTINI, J., GROTTTO, D., **PANIZ, Clóvis**, ROEHRS, M., BRUCKER, N., CHARAO, M. F., MORO, A. M., TONELO, R., MOREIRA, A. P. L., BUFFON, A., BECK, M., GARCIA, S. C. Association Among Microalbuminuria and Oxidative Stress Biomarkers in Patients With Type 2 Diabetes. *Journal of Investigative Medicine*. v.1, p.1 - , 2011.
4. ROEHRS, M., VALENTINI, J., **PANIZ, Clóvis**, MORO, Angela Maria, MORO, A. M., CHARAO, M. F., BULCAO, R. P., FREITAS, F. A., BRUCKER, N., DUARTE, M., LEAL, M.B., BURG, G., GRUNE, T., GARCIA, S. C. The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*. v.12, p.59 - , 2011.
5. BAIERLE, M., VALENTINI, J., **PANIZ, Clóvis**, MORO, A. M., BARBOSA JUNIOR, F., GARCIA, S. C. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (Impresso)*, v.46, p.463 - 470, 2010.
6. BULCAO, R. P., ARBO, M. D., ROEHRS, M., **PANIZ, Clóvis**, SERVI, F. L., THIESEN, F. V., LEAL, M. B., GARCIA, S. C. Procaina: efeitos farmacológicos e toxicológicos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.32, p.297 - 303, 2010.
7. GROTTTO, D., MARIA, L. S., VALENTINI, J., **PANIZ, Clóvis**, SCHMITT, G., POMBLUM, V. J., ROCHA, J. B. T., FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova (Impresso)*. v.32, p.169 - 174, 2009.
8. GARCIA, S. C., WYSE, A. T. S., VALENTINI, J., ROEHRS, M., MORO, A. M., **PANIZ, Clóvis**, SCHMITT, G, GROTTTO, D., POMBLUM, V. J. Butyrylcholinesterase activity is reduced in haemodialysis patients: is there association with hyperhomocysteinemia and/or oxidative stress?. *Clinical Biochemistry*, v.41, p.474 - 479, 2008.
9. FARIAS, I. L. G., COLPO, E., **PANIZ, Clóvis**, ALVES, T. P., DANIELI, G. L., SILVA, J. E P., GARCIA, S. C. Comprimidos mastigáveis de ferro carbonila como alternativa para melhor adesão ao tratamento da anemia ferropriva: análise de dois estudos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.30, p.496 - 497, 2008.
10. VALENTINI, J., GROTTTO, D., ROEHRS, M., **PANIZ, Clóvis**, BURG, G., GARCIA, S. C. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.62, p.378 - 382, 2008.
11. GROTTTO, D., VALENTINI, J., BOEIRA, S. P., **PANIZ, Clóvis**, MARIA, L. D. S., VICENTINI, J. T., MORO, A. M., CHARAO, M. F., GARCIA, S. C., CARDOSO, S. G. Avaliação da estabilidade do marcador plasmático do estresse oxidativo - malondialdeído. *Química Nova*. v.31, p.275 - 279, 2007.
12. **PANIZ, Clóvis**, BAIROS, A. V., VALENTINI, J., CHARAO, M. F., BULCAO, R. P., MORO, A. M., GRUNE, T., GARCIA, S. C. The influence of the serum vitamin C levels on oxidative stress biomarkers in elderly women. *Clinical Biochemistry*. , v.40, p.1367 - 1372, 2007.
13. SCHMITT, G, **PANIZ, Clóvis**, GROTTTO, D., VALENTINI, J., SCHOTT, K. L., POMBLUM, V. J., GARCIA, S. C. Aspectos gerais e diagnóstico clinicolaboratorial da intoxicação por paraquat. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v.42, p.235 - 243, 2006.
14. **PANIZ, Clóvis**, GROTTTO, D., SCHMITT, G, VALENTINI, J., SCHOTT, K. L., POMBLUM, V. J., GARCIA, S. C. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e o seu diagnóstico laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v.41, p.323 - 334, 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BERTANHA, M. L. G., LUCENA, M., **PANIZ, CLOVIS**, SHINOHARA, E. M. G. Associação entre polimorfismos em genes de enzimas chaves do metabolismo da homocisteína e concentrações de folato em indivíduos submetidos à suplementação e fortificação com ácido fólico In: *Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2014, São Paulo. Anais do Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP*, 2014.

2. **PANIZ, CLOVIS**, LUCENA, M., BERTINATO, J. F., Amorim, P. M. S., FIGUEIREDO, M. S., SONATI, M. F., BLAIA-DAVILA, V. L., CANCADO, R. D., DOMINGOS, C. B., SHINOHARA, E. M. G. B Vitamin levels and mRNA expression of DHFR in patients with different degrees of erythropoiesis In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis. **Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular 2014**, 2014.
3. LUCENA, M., **PANIZ, CLOVIS**, BERTINATO, J. F., Amorim, P. M. S., COSTA, P. L. B., BERTANHA, M. L. G., FIGUEIREDO, M. S., SHINOHARA, E. M. G. Deletion of 19bp in DHFR gene was not associated with alteration on DHFR mRNA expression In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, 2014, Florianópolis. **Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular 2014**. 2014.
4. **PANIZ, CLOVIS**, LUCENA, M., BERTINATO, J. F., AMORIM, P. M. S. , GOMES, G. W., FIGUEIREDO, M. S., GREEN, R., CANÇADO, R. D., DOMINGOS, C. B., BLAIA-DAVILA, V. L., CLIQUET, M., SHINOHARA, E. M. G. Elevated Serum Folic Acid Concentrations Were Associated with Higher mRNA Expression of DHFR Gene in Patients with Hereditary Spherocytosis In: 56th ASH Annual Meeting & Exposition, 2014, San Francisco, CA. **2014 ASH Annual Meeting Abstracts**. 2014.
5. LUCENA, M., **PANIZ, Clóvis**, BERTINATO, J. F., Amorim, P. M. S. , JORGE, T. R., FIGUEIREDO, M. S., CANCADO, R. D., SONATI, M. F., SANTOS, M. N. N., BLAIA-DAVILA, V. L., SHINOHARA, E. M. G. No Association Was Found Between MTHFR and MTHFD1 SNPs and Vitamin Levels in People with Increased and Normal Erythropoiesis, after Compulsory Flour Fortification with Folic Acid In: 56th ASH Annual Meeting & Exposition, 2014, San Francisco. **Blood Journal**. , 2014. v.124.
6. CARVALHO, J. A. M., BOCHI, G. V., TATSCH, E., **PANIZ, Clóvis**, MORESCO, R. N. Avaliação dos níveis dos produtos proteicos da oxidação avançada (AOPP) no líquido pleural e sua associação com a contagem de células (CL) In: 47º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial, 2013, São Paulo. **Anais do 47º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial**. 2013.
7. SAUER, E., MORO, A. M., GAUER, B., BRUCKER, N., CHARAO, M. F., **PANIZ, Clóvis**, ROEHRS, M., GARCIA, S. C. Parâmetros hematológicos em trabalhadores expostos ao benzeno In: VI Congresso Internacional de Bionálises, IX Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XIII Semana Gaúcha de Biomedicina, 2013, Novo Hamburgo. **Anais do VI Congresso Internacional de Bionálises, IX Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina e XIII Semana Gaúcha de Biomedicina**. 2013.
8. BULCAO, R. P., MORO, A. M., **PANIZ, Clóvis**, BAIROS, A. V., MORESCO, R. N., BARBOSA JUNIOR, F., GARCIA, S. C. Alterations in hematologic, hepatic and cardiac parameters in painters exposed to metals In: III Congresso Internacional de Bioanálises, VI Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina, X Semana Gaúcha de Biomedicina, 2010, Novo Hamburgo. **Anais do III Congresso Internacional de Bioanálises, VI Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina, X Semana Gaúcha de Biomedicina**. 2010.
9. FREITAS, F. A., ROEHRS, M., **PANIZ, Clóvis**, ALMEIDA, F. L., MORO, A. M., BAIROS, A. V., CHARAO, M. F., TONELO, R., GARCIA, S. C. Atividade da delta aminolevulinato desidratase sanguínea em pacientes com infarto agudo do miocárdio In: 14º FARMAPOLIS - XII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, 2009, Florianópolis. **Anais do 14º FARMAPOLIS**. 2009.
10. **PANIZ, Clóvis**, FREITAS, F. A., ROEHRS, M., SOCCAL, R. M., SCHMITT, G, MOREIRA, A. P. L., GARCIA, S. C. Avaliação de alguns parâmetros nutricionais em idosos institucionalizadas em um asilo público de Santa Maria - RS In: 14º FARMAPOLIS - XII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos. **Anais do 14º FARMAPÓLIS**. 2009.
11. FREITAS, F. A., ROEHRS, M., **PANIZ, Clóvis**, VALENTINI, J., MORO, A. M., CHARAO, M. F., BAIROS, A. V., GARCIA, S. C. Avaliação vitamínica em pacientes submetidos a hemodiálise In: FeSBE 2009, 2009, Águas de Lindóia. **XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. 2009.
12. POZZOBON, R., BRASS, K. E., RUBIN, M. I. B., DE LA CORTE, F. D., **PANIZ, Clóvis**, SOCCAL, R. M., AZEVEDO, M. A., MILANELLO, E. R., SILVA, G. B. Meloxicam and ketoprofen did not alter coagulation and haematological parameters of healthy ponies In: 11th Congress of the World Equine

Veterinary Association, X Conferência Anual da Abreveq and V Congresso Internacional FEI/CBH, 2009, Guarujá. **11th Congress of the World Equine Veterinary Association, X Conferência Anual da Abreveq and V Congresso Internacional FEI/CBH.** 2009.

13. BULCAO, R. P., **PANIZ, Clóvis**, BAIROS, A. V., ROEHRS, M., MORO, A. M., CHARAO, M. F., ALMEIDA, F. L., RIBEIRO, G. L., MOREIRA, A. P. L., FREITAS, F. A., BAIERLE, M., RUTSATZ, M., GARCIA, S. C. Os níveis de IBE e parâmetros hematológicos e enzimáticos em indivíduos expostos ocupacionalmente a solventes orgânicos In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.

Anais do XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2009.

14. MORO, A. M., **PANIZ, Clóvis**, BAIROS, A. V., CHARAO, M. F., ROEHRS, M., GARCIA, S. C. Avaliação do estado nutricional e biomarcadores do estresse oxidativo em idosas institucionalizadas e não institucionalizadas. In: 23ª Jornada Acadêmica Integrada - JAI 2008, 2008, Santa Maria. **23ª Jornada Acadêmica Integrada – JAI,** 2008.

15. PANIZ, Clóvis, MORO, A. M., CHARAO, M. F., SOCCAL, R. M., VICENTINI, J. T., ALMEIDA, F. L., GARCIA, S. C. Avaliação do estresse oxidativo e níveis vitamínicos em idosas institucionalizadas em um asilo público e em idosas pertencentes a um grupo de terceira idade de Santa Maria -RS. In: I Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial, 2008, Porto Alegre. **Anais do I Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial.** 2008.

16. CHARAO, M. F., **PANIZ, Clóvis**, MOREIRA, A. P. L., MORO, A. M., ROEHRS, M., GARCIA, S. C. Estado micronutricional e avaliação do estado mental de idosos institucionalizados e não institucionalizados de Santa Maria. In: 23ª Jornada Acadêmica Integrada - JAI 2008, 2008, Santa Maria. **23ª Jornada Acadêmica Integrada - JAI 2008.** 2008.

17. BULCAO, R. P., PANIZ, Clóvis, ROEHRS, M., CHARAO, M. F., MORO, A. M., LIMBERGER, R., GARCIA, S. C. Exposição de pintores a solventes orgânicos e a relação com o estresse oxidativo In: I Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial, 2008, Porto Alegre. **Anais do I Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial.** 2008.

18. ROEHRS, M., BAIROS, A. V., FREITAS, F. A., PANIZ, Clóvis, BULCAO, R. P., VALENTINI, J., GARCIA, S. C. O estresse oxidativo e sua relação com o leucograma em pacientes com infarto agudo do miocárdio In: I Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial, 2008, Porto Alegre. **Anais do I Congresso Sul de Toxicologia Clínico Laboratorial.** 2008.

19. CHARAO, M. F., **PANIZ, Clóvis**, MORO, A. M., BULCAO, R. P., TONELO, R., GARCIA, S. C. Avaliação da deficiência micronutricional e parâmetros do estresse oxidativo em idosas In: XXI JAI - Jornada Acadêmica Integrada, 2007, 2007, Santa Maria. **XXI JAI - Jornada Acadêmica Integrada,** 2007.

20. **PANIZ, Clóvis** Avaliação do déficit cognitivo, depressão e estresse psicológico e suas correlações em idosos institucionalizados na cidade de Snta Maria - RS In: XXII Jornada Acadêmica Integrada - JAI, 2007, Santa Maria. **Anais do XXII JAI.** 2007.

21. **PANIZ, Clóvis** Determinação dos indicadores biológicos de exposição urinários de pintores por CLAE-UV In: XXII Jornada Acadêmica Integrada - JAI, 2007, Santa Maria. **Anais da XXII JAI.** 2007.

22. CHARAO, M. F., **PANIZ, Clóvis**, BULCAO, R. P., BOEIRA, S. P., SCHMITT, G, VICENTINI, J. T., GARCIA, S. C. Determinação dos níveis séricos de vitamina B12 e folatos e estado nutricional em idosas institucionalizadas. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2007, 2007, Águas de Lindóia - SP. **XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE,** 2007.

23. MORO, A. M., BULCAO, R. P., **PANIZ, Clóvis**, MARIA, L. D. S., CHARAO, M. F., GARCIA, S. C. Determinação simultânea de dissulfiran e benzodiazepínicos por CLAE-UV em casos de emergência toxicológica. In: XXII JAI - Jornada Acadêmica Integrada, 2007, 2007, Santa Maria. **XXII JAI - Jornada Acadêmica Integrada,** 2007.

24. VICENTINI, J. T., GROTTTO, D., VALENTINI, J., MORO, A. M., PANIZ, Clóvis, GARCIA, S. C. Evaluation of the oxidative stress in type 2 diabetic subjects In: Free Radicals in Montevideo - 2007; V Meeting of SFRBM; V Internacional Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. **Free Radicals in Montevideo - 2007.**
25. BULCAO, R. P., **PANIZ, Clóvis**, MORO, A. M., CHARAO, M. F., MARIA, L. D. S., ARBO, M. D., GARCIA, S. C. Intoxicação acidental em criança por dissulfiran e benzodiazepínicos - Relato de Caso. In: XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007, 2007, Búzios - RJ. **XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2007.**
26. PANIZ, Clóvis, BOEIRA, S. P., TESSELE, F. F., BULCAO, R. P., CHARAO, M. F., TONELO, R., ALMEIDA, F. L., ROEHRS, M., GARCIA, S. C. Relation between antioxidants vitamins and cognitive impairments in institutionalized elderly women in Santa Maria - Brazil In: Free Radicals in Montevideo - 2007; V Meeting of SFRBM; V Internacional Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. **Free Radicals in Montevideo - 2007.**
27. BOEIRA, S. P., GROTTTO, D., MARIA, L. D. S., PANIZ, Clóvis, POMBLUM, V. J., GARCIA, S. C. Comparação metodológica dos níveis de TBARS e MDA em plasma de mulheres idosas institucionalizadas em asilo de Santa Maria In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE., 2006, Águas de Lindóia. **XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia. XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. 2006.**
28. PANIZ, Clóvis, VALENTINI, J., GROTTTO, D., BAIRROS, A. V., CHARAO, M. F., GARCIA, S. C. Estresse oxidativo em idosos institucionalizados e não institucionalizados de Santa Maria - RS In: 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba. **Anais do 40º CBPCML, 2006.**
29. VALENTINI, J., SCHMITT, G, PANIZ, Clóvis, POMBLUM, V. J., GARCIA, S. C. Hiperhomocisteinemia como fator contribuinte para inibição da atividade da enzima ALA-D em pacientes hemodializados. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2006, Águas de Lindóia. **Anais da XXI FeSBE - 2006.**
30. ALMEIDA, F. L., PANIZ, Clóvis, BULCAO, R. P., VICENTINI, J. T., VALENTINI, J., POMBLUM, V. J. Incidência de anemia em idosos institucionalizados em abrigos geriátricos de Santa Maria - RS In: 21ª Jornada Acadêmica Integrada, 2006, Santa Maria. **21ª Jornada Acadêmica Integrada, 2006.**
31. TONELO, R., PANIZ, Clóvis, ALMEIDA, F. L., VALENTINI, J., GARCIA, S. C. Níveis de vitamina E em idosos institucionalizados de Santa Maria In: 21ª Jornada Acadêmica Integrada, 2006, Santa Maria. **21ª Jornada Acadêmica Integrada. 2006.**
32. PANIZ, Clóvis, CHARAO, M. F., MORO, A. M., GROTTTO, D., MARIA, L. D. S., BAIRROS, A. V., VICENTINI, J. T., BULCAO, R. P., POMBLUM, V. J., BOEIRA, S. P., PIVA, S. J., GARCIA, S. C. Perfil do estresse oxidativo em idosos institucionalizados em abrigo da cidade de Santa Maria - RS. In: XXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE., 2006, Águas de Lindóia. **Anais da XXI FeSBE - 2006.**
33. PANIZ, Clóvis, MORO, A. M., MARIA, L. D. S., BULCAO, R. P., BOEIRA, S. P., GARCIA, S. C. Perfil lipídico em idosas institucionalizadas em abrigos da cidade de Santa Maria - RS. In: 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial, 2006, Curitiba. **Anais do 40º CBPCML, 2006.**
34. FORNO, N. L. F. D., PANIZ, Clóvis, GODOY, L. P. Alcance da vantagem competitiva em associações e redes interlaboratoriais. In: XIV congresso brasileiro da qualidade e produtividade- XX congresso nacional da círculos de controle de qualidade, 2004, Gramado - RS. **XIV congresso brasileiro da qualidade e produtividade- XX congresso nacional da círculos de controle de qualidade. 2004.**

35. FORNO, N. L. F. D., PANIZ, Clóvis, CAMPOS, M. M. A., GODOY, L. P. Erros pré-analíticos em laboratório de microbiologia: um estudo de caso no Hospital Universitário de Santa Maria In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 2003, 2003, Florianópolis - SC. **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 2003.

36. PANIZ, Clóvis, FORNO, N. L. F. D., RIGHI, R., SALLA, A., MENEGUETTI, B., DALMOLIN, A. J., CAMPOS, M. M. A. Freqüência de isolamento de patógenos microbianos e sensibilidade a antimicrobianos de Staphylococcus aureus e Staphylococcus epidermidis isolados em hemoculturas de pacientes do HUSM In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 2003, 2003, Florianópolis - SC. **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 2003.

37. PANIZ, Clóvis, MENEZES, C. R., RESER, M. R., LIMA, C. S. Levantamento das Condições Sociais da Fazenda Santa Marta, no município de Santa Maria - RS In: IX CONGRESSO CATARINENSE DE FARMACÊUTICOS E BIOQUÍMICOS, 2000, Florianópolis - SC. **IX CONGRESSO CATARINENSE DE FARMACÊUTICOS E BIOQUÍMICOS**, 2000.

38. PANIZ, Clóvis, PEREIRA, L. T., GONÇALVES, L. O., MACHADO, M. M., SANTOS, Â. I. Estudo da Variação da Taxa de Glicose em Pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria no período de 23 a 25 de fevereiro de 1999 In: 51ª Reunião Anual da SBPC, 1999, Porto Alegre - RS. **51ª Reunião Anual da SBPC**, 1999.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. PANIZ, Clóvis

Envelhecimento da População Brasileira, 2008. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Marcelo Rodrigues Reser. **Interferência de analgésicos e antiinflamatórios em exames laboratoriais**. 2008. Monografia (Especialização em Análises Clínicas) - Colégio Brasileiro de Estudos Sistêmicos

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Fabianne Fontella Pasetto. **A evolução farmacológica no tratamento da LMC**. 2011. Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Santa Maria

2. Juliana Machado Bochi. **Folato: Uma revisão sistemática**. 2011. Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Santa Maria

3. Emanuele Villetti Vintacourt. **Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares em doadores e receptores de sangue de Santa Maria**. 2011. Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Santa Maria

4. Laura Viêlmo. **Frequência de alterações detectadas nos pacientes atendidos pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal no período de 2007/2009 em Santa Maria, RS**. 2010. Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Santa Maria

5. Tiago Valcorte. **Levantamento de dados sobre tipagem sanguínea de recém nascidos coletadas de sangue de cordão umbilical**. 2009. Curso (Farmácia) - Universidade Federal de Santa Maria

Anexo H. Ata de defesa



Janus

Universidade de São Paulo

ATA DE DEFESA

Aluno: 9136 - 7913964 - 1 / Página 1 de 1

Ata de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Clóvis Paniz no Programa: Farmácia (Análises Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 27 dias do mês de novembro de 2015, no(a) Auditório FCF/USP, realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Clóvis Paniz, apresentada para a obtenção do título de Doutor intitulada:

"Efeitos do ácido fólico não metabolizado na metilação global do DNA, na expressão de RNAm dos genes de DHFR, MTHFR, interferon- γ , TNF- α e interleucina-8, e na citotoxicidade das células NK"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Elvira Maria Guerra Shinohara	Presidente	FCF - USP	<u>Aprovado</u>
Ana Campa	Titular	FCF - USP	<u>aprovado</u>
Paulo Augusto Achucarro Silveira	Titular	HC - Externo	<u>APROVADO</u>
Jean Pierre Schatzmann Peron	Titular	ICB - USP	<u>Aprovado</u>
Maria Stella Figueiredo	Suplente	UNIFESP - Externo	<u>aprovado</u>

Resultado Final: APROVADO

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Irineu Ruel de Oliveira _____, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 27 dias do mês de novembro de 2015.


Ana Campa


Paulo Augusto Achucarro Silveira


Jean Pierre Schatzmann Peron


Maria Stella Figueiredo


Elvira Maria Guerra Shinohara
Presidente da Comissão Julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

A defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 27.11.2015 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Doutor em Ciências obtido no Programa Farmácia (Análises Clínicas) - Área de concentração: Análises Clínicas.


Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Profa. Dra. Irineu da Silva Soares
Presidente da CPG/FCF/USP