ANA PAULA VIEIRA DIAS ALVES

**Associação entre
fatores genéticos e risco aumentado de prematuridade em
pacientes com antecedente de incompetência cervical**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de
Carvalho

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Ana Paula Vieira Dias

Associação entre fatores genéticos e risco aumentado de prematuridade em
pacientes com antecedente de incompetência cervical / Ana Paula Vieira Dias
Alves. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mario Henrique Burlacchini de Carvalho.

Descritores: 1.Incompetência do colo do útero 2.Prematuro 3.Trabalho de
parto prematuro 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Genética 6.Colágeno
7.Metaloproteases

USP/FM/DBD-147/16

Dedicatória

A meus pais, **Paulo Henrique** e **Nadir** e minha querida avó **Cecy** (*in memoriam*), por todo amor incondicional que recebi e, por tudo, que fizeram por mim...

A meus filhos, **Caio** e **Lara**, melhor parte de mim, maior e melhor presente desta vida.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realizar mais uma conquista.

Ao Departamento de Obstetrícia, chefiado pelo Prof. Dr. Marcelo Zugaib, por me receber de braços abertos e permitir a realização deste estudo.

A meu orientador, que me mostrou os caminhos da ciência, Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho, pelas críticas e conselhos, mas, sobretudo, pelo estímulo e confiança.

Ao José Eduardo Levi, pela parceria, orientação técnica e também pelo apoio e incentivo diante das adversidades.

À pesquisadora Mara Sandra Hoshida do LIM 47 da Obstetrícia, pela colaboração, sobretudo nos momentos críticos, ouvindo-me, ajudando e acolhendo e também Ana Cristina e Jane, pela ajuda com os procedimentos laboratoriais.

À FAPESP, pelo financiamento e incentivo à pesquisa.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Aos Laboratórios de Virologia e Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical e toda equipe, onde tive a oportunidade de realizar as etapas práticas.

À Profa. Sueli Oba, pelo auxílio com os testes de controle de qualidade.

À Renata Romão, Renata Wendel, Roberto Ribeiro, Lucas Franco e Marcela Ribeiro, por toda ajuda e assessorias laboratoriais prestadas.

Ao Leonardo Varuzza, pelo suporte na bioinformática e análise dos resultados.

Ao Vinícius Fernando, pela assessoria estatística.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia Luciano, Débora, Sônia e Maria, por todo auxílio e por estarem sempre a postos.

Aos membros de minha banca de qualificação, Prof. Dr. Roberto Eduardo Bittar, Prof. Dr. Marco Anonio Borges, Dr. Edécio Armbruster, pela disponibilidade e por todas as contribuições.

Ao Dr. Antonio Gomes de Amorim, pelas contribuições no projeto, pela amizade e por me auxiliar com paciência e dedicação sempre que precisei.

À Dra. Thaís Fonseca Borghi, minha amiga e companheira da pós-graduação, por toda ajuda com os dados, com as amostras, mas, sobretudo, por ser minha cúmplice.

À Dra. Monica Fairbanks, também minha amiga, obstetrícia a fora, por cuidar de mim em uma fase muito especial dessa jornada e compartilhar com tanta destreza e carinho o momento único e inesquecível do nascimento de minha filha.

A todos os médicos assistentes da Clínica Obstétrica, professores, residentes, pós-graduandos e alunos de graduação, por tantos ensinamentos e por toda excelência na arte da obstetrícia e da medicina fetal que tive a oportunidade de vivenciar durante todo esse período.

Às enfermeiras do ambulatório, em especial a Graça, por me auxiliarem na coleta das amostras e me tornarem com sua prática, uma “especialista” em puncionar veias.

Às incansáveis Soraia, Raquel, Marina, Inês e Lucinda, por todo trabalho na secretaria e assessoria aos alunos e também ao Alan, da informática.

A meus amigos que, em minha cidade natal deixei mas, continuam fazendo parte de mim e de minha história, sempre me abençoando - Viviane, Gabrielle, Angélica, Daniela, Jarbas e Mariana.

Aos amigos que aqui formei, em especial, Luanne e Roberto Meirelles, pela torcida, pelo carinho, pelos momentos de descontração e por representarem muitas vezes minha própria família.

As minhas amigas de trabalho, a famosa quarta magia, pelo dia a dia corrido, mas, repleto de muita parceria e ótimas risadas, tornando meus dias mais leves – Renata Lopes, Ana Paula Mosconi, Juliana Mendonça, Fernanda Telles, Carolina Freire, Julianny Nery, Amanda Amaral, Stela Sgavioli e Maria Cláudia Nogueira.

Às pacientes do ambulatório do Aborto Habitual e suas acompanhantes pela colaboração e entendimento do projeto e, literalmente, pelo sangue que doaram.

A minha família, base de tudo que sou, para sempre toda minha gratidão. Meus pais, Paulo Henrique e Nadir, meu irmão Fábio e a Higia, que mesmo de longe como sempre vibram comigo a cada etapa e a cada conquista, sem vocês hoje não estaria aqui !

Aos queridos Líliam, Edvaldo, Júnior, Marcela, Cléia, Joel e minha sobrinha Giovana, por também compartilharem tanto amor.

A meu marido Jefferson Alves, por ter permanecido a meu lado, desde a época da faculdade, acompanhando-me tão de perto em todas as minhas jornadas, tornando-me realizada como pessoa, como mãe, por me proporcionar os dias mais felizes que já tive, compartilhando alegrias e angústias, mantendo firme seu amor e estendendo sua mão amiga em todos os momentos.

A meus filhos Caio e Lara, por me mostrarem o verdadeiro amor e o verdadeiro sentido da vida e tornarem meus dias sempre imperdíveis.

Epígrafe

*Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.*

Friedrich Nietzsche

Esta dissertação está de acordo as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	10
2.1	Geral.....	11
2.2	Específicos	11
3	Revisão da literatura.....	12
4	Ética.....	18
5	Métodos.....	21
5.1	Desenho do estudo	22
5.2	Cálculo amostral	22
5.3	Casuística	22
5.3.1	Critérios de inclusão.....	23
5.3.2	Critérios de exclusão.....	23
5.4	Coleta de sangue	24
5.5	Extração de DNA de sangue total	24
5.6	Determinação da concentração e pureza do DNA.....	25
5.7	Desenho dos <i>primers</i>	26
5.8	Padronização das reações.....	29
5.9	Reação de PCR convencional das amostras.....	34
5.10	Pool das amostras	37
5.11	Construção da biblioteca.....	37
5.12	Ligação aos adaptadores.....	39
5.13	PCR real time (qPCR) e quantificações das amostras.....	39
5.14	PCR de emulsão (Etapa One Touch)	41
5.15	Sequenciamento PGM no Ion Torrent.....	41

6	Resultados.....	45
6.1	Comparação dos grupos casos e controles em relação aos SNPs	49
6.2	Comparação do antecedente obstétrico das gestantes do grupo caso e os SNPs	53
7	Discussão	64
8	Conclusão.....	70
9	Anexos.....	72
10	Referências.....	78
11	Apêndices	86
	Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - casos	
	Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - controles	
	Apêndice 3 - Aprovação CAPPesq	

Listas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

% -	porcentagem
µg -	micrograma
µL -	microlitro
A -	nucleotídeo adenina
C -	nucleotídeo citosina
CEP -	Comitê de Ética e Pesquisa
COL1A1 -	colágeno 1 isoforma alfa1
COL4A3 -	colágeno 4 isoforma alfa 3
DNA -	ácido desoxirribonucleico
dNTP -	deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA -	ácido etilenodiamino tetra-acético
Et al. -	e outros (mesmo que e colaboradores)
Fig.-	figura
G -	nucleotídeo guanina
HC - FMUSP -	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IL6-R -	receptor de interleucina 6
IMT -	Instituto de Medicina Tropical
mL -	mililitro
mM -	milimolar
MMP -	metaloproteinase
nm -	nanômetro
°C -	graus Celsius
pb -	pares de bases
PCR -	reação em cadeia da polimerase
Rev. -	revista
SNP -	polimorfismo de nucleotídeo único (<i>single nucleotide polymorfismo</i>)
T -	nucleotídeo timina
TCLE -	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β -	fator de transformação de crescimento beta

TIMP2 -	Fator inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2
T _m -	temperatura de anelamento (<i>melting</i>)
USG -	ultrassonografia
USP-	Universidade de São Paulo
V -	volts

Lista de tabelas

Tabelas 1 e 2 - Descrição da sequência de <i>primers</i> COL1A1, COL4A3, TGF-B, todos no formato <i>senso e antissenso</i> (ou <i>forward e reverse</i>) delimitados com o programa GenBank”, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov); identificação do SNP correspondente, localização no cromossomo e tamanho em pares de bases	28
Tabela 3 - SNPs lidos após o sequenciamento pelo Ion Torrent e suas respectivas características: cromossomo, gene associado, identificação, alelo selvagem, alelo mutante e posição no gene	44
Tabela 4 - Análise descritiva das características da idade materna e antecedente obstétrico das pacientes dos grupos caso e controle (HCFMUSP 2013 - 2016)	47
Tabela 5 - Análise descritiva da cor da pele das pacientes dos grupos caso e controle (HCFMUSP 2013 - 2016)	48
Tabela 6 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP COL1A1 (HCFMUSP 2013 - 2016)	49
Tabela 7 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP COL4A3 (HCFMUSP 2013 - 2016)	50
Tabela 8 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP TIMP2 (HCFMUSP 2013 - 2016)	51
Tabela 9 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP TGF-B (HCFMUSP 2013 - 2016)	52
Tabela 10 - Comparação e teste de independência entre o SNP COL4A3 e o antecedente obstétrico de abortamento nas pacientes do grupo caso (HCFMUSP 2013 - 2016)	53
Tabela 11 - Teste de independência entre o SNP COL4A3 e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)	54
Tabela 12 - Teste de independência entre o SNP COL4A3 e o antecedente obstétrico de parto prematuro (HCFMUSP 2013 - 2016)	55

Tabela 13 - Teste de independência entre o SNP COL1A1 e o antecedente obstétrico de abortamento (HCFMUSP 2013 - 2016)	56
Tabela 14 - Teste de independência entre o SNP COL1A1 e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)	57
Tabela 15 - Teste de independência entre o SNP COL1A1 e o antecedente obstétrico de prematuridade (HCFMUSP 2013 - 2016)	58
Tabela 16 - Teste de independência entre o SNP TIMP2 e o antecedente obstétrico de abortamento (HCFMUSP 2013 - 2016)	59
Tabela 17 - Teste de independência entre o SNP TIMP2 e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)	60
Tabela 18 - Teste de independência entre o TIMP2 e o antecedente obstétrico de prematuridade (HCFMUSP 2013 - 2016)	60
Tabela 19 - Teste de independência entre o SNP TGF-B e o antecedente obstétrico de abortamento (HCFMUSP 2013 - 2016)	61
Tabela 20 - Teste de independência entre o SNP TGF-B e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)	62
Tabela 21 - Teste de independência entre o SNP TGF-B e o antecedente obstétrico de parto prematuro (HCFMUSP 2013 - 2016)	62
Tabela 22 (anexo A) - Concentração de DNA e relação 260/280 obtidas por medida espectrofotométrica pelo Thermo Scientific Nanodrop 2000, das amostras de sangue total das pacientes com incompetência cervical e grupo controle.....	73
Tabela 23 (anexo B) - Taxa Frequência dos novos SNPs descritos no grupo de casos. SNPnovo1-COL4A3; SNPnovo2-COL4A3; SNPnovo3-COL4A3; SNPnovo4-COL1A1	77

Lista de figuras

- Figura 1 -** Imagem referente ao gel de agarose a 1,5%, corada com brometo de etídio - *Primer* COL1A1 e COL4A3 após amplificação por PCR, na fase de padronização das reações. COL4A3 = colágeno tipo 4 isoforma alfa 3 31
- Figura 2 -** Imagem referente ao gel de agarose 1,5% corada com brometo de etídio - *Primer* TGF- beta após amplificação por PCR na fase de padronização da reação TGF-B = fator de transformação de crescimento beta..... 32
- Figuras 3 e 4 -** Imagens referentes aos géis de agarose a 1,5% - *Primer* TIMP2 após reação por PCR na fase de padronização das reações. Primeira imagem com formação das bandas em fraca intensidade. Segunda imagem releitura em gel com ajuste da dose de brometo de etídio TIMP2= inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2 33
- Figura 5 -** Imagem referente ao gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio -*Primer* TIMP 2 após amplificação por PCR na fase de amplificação protocolo Hotstart Mix das amostras.Timp2 = inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2..... 36
- Figura 6 -** Imagem referente à corrida de sequenciamento no equipamento Ion Torrent 42

Resumo

Alves APVD. *Associação entre fatores genéticos e risco aumentado de prematuridade em pacientes com antecedente de incompetência cervical* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A incompetência istmo cervical é uma importante causa de prematuridade. Atualmente, o componente genético está relacionado ao parto prematuro, dentre os quais os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de alguns genes candidatos estão associados. Os SNPs nos genes do colágeno, da matrix extracelular e das interleucinas têm relação direta com o comprimento do colo uterino podendo relacionar-se com o encurtamento do colo uterino, como também ocorre na incompetência cervical. Este estudo tem o objetivo de associar a frequência dos SNPs dos genes do COL1 A1, COL 4A3, TGF-B e TIMP2 à história de incompetência cervical. Foi realizado estudo de caso controle com grupo de pacientes, que realizaram cerclagem do colo uterino na última gestação e o grupo de pacientes com antecedente de gestação a termo (controle). Em sangue periférico, foi extraído DNA, realizadas reações de PCR com *primers* específicos para os SNPs de interesse em 62 amostras preparadas para sequenciamento de última geração pelo Ion Torrent. Houve leitura satisfatória em 57 amostras, sendo 28 casos e 29 controles. A frequência do SNPS do COL1A1 no grupo caso foi de 70,4% versus 33,3% no grupo controle ($p=0,03$). Os SNPs do COL4A3 e do TIMP2 apresentaram associação com o antecedente de abortos totais ($p=0,02$ e $p=0,023$) e abortos tardios ($p=0,001$ e $p=0,034$); para os demais SNPs não houve diferença em frequência entre os grupos caso e controle. Foram identificados SNPs exônicos ainda não descritos na literatura. O presente estudo observou uma maior taxa de homozigose T/T para o SNP COL1A1 no grupo caso, que é um gene associado ao metabolismo do colágeno, além de identificar SNPs ainda não descritos na literatura, que poderão ser objeto de estudo no futuro para conhecimento da sua repercussão na composição do colágeno.

Descritores: incompetência do colo do útero; prematuro; trabalho de parto prematuro; polimorfismo de nucleotídeo único; genética; colágeno; metaloproteases.

Abstract

Alves APVD. *Association between genetic factors and high risk of prematurity in women with cervical insufficiency* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Cervical incompetence is one of the most important causes of prematurity. It has already been suggested that genetic factors plays a significant role in determining the risk of preterm birth and the single nucleotide polymorphisms (SNPs) from candidate genes are associated. Polymorphisms in several genes such as the collagen, the extracellular matrix and the interleukins, are related to abnormal cervical length, as it occurs in cervical incompetence. The aim of this study, was to associate the frequency of the SNPs in the COL1A1, COL4A3, TGF- β and TIMP2 genes to the cervical incompetence. We conducted a case control study with patients submitted to cervical cerclage and a control group with women who delivery at term. DNA was isolated from blood samples and amplifications of the genomic DNA were performed by PCR protocol with specific primers for the SNPs. DNA sequencing of 62 samples, was obtained from next generation sequencing on the Ion Torrent. A total of 57 samples, including 28 cases and 29 controls had results available. The frequency of the SNP in COL1A1 in the case group was 70,4% versus 33% in the control group ($p=0,03$). The SNPs in COL4A3 and TIMP2 were significant related to the history of miscarriages ($p=0,2$ and $p=0,023$) and fetal losses ($p=0,001$ and $p=0,034$) No significant differences were observed in the frequencies for the others SNPs in the two groups. In the present study, non described exonic SNPs were discovered. Higher frequencies of the homozygous T/T genotype in COL1A1 were observed in the case group involving the collagen metabolism and the non described exonic SNPs might be associated to collagen abnormalities in future studies.

Descriptors. uterine cervical incompetence; infant, premature; obstetric labor, premature; polymorphism, single nucleotide; genetics; collagen; metalloproteases.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A prematuridade, definida como o nascimento antes de 37 semanas gestacionais completa ou 259 dias, é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo inteiro ^(1, 2). Sua incidência varia de acordo com a população estudada, entre 5% e 12%. O nascimento prematuro é descrito como um evento dramático, tanto para o recém-nascido como também aos familiares. Quanto mais prematuro o nascimento, maiores serão os custos, maiores as chances de morte e maiores as chances de sequelas às crianças ao longo da vida. A etiologia da prematuridade é multifatorial, sendo a incompetência cervical e o histórico de partos prematuros prévios importantes causas ^(3, 4, 5).

A incompetência cervical é definida como a inabilidade do colo uterino em manter-se convenientemente fechado e reter o conceito até o termo, o que invariavelmente resulta em abortamento ou nascimento prematuro.

A fisiopatologia da dilatação cervical prematura é complexa e incompletamente compreendida. A cérvix uterina é uma estrutura anatômica dinâmica que serve durante a gravidez como barreira para o feto e o meio ambiente. Durante esse tempo, a cérvix é uma estrutura firme, que consiste predominantemente de colágeno, em menor proporção músculo liso e fibroblastos, mas, nos prelúdios do trabalho de parto, este

colágeno é degradado e a cérvix torna-se flácida suficiente para dilatar. O estudo da cérvix pode ser útil ainda na predição de parto prematuro ^(6, 7).

A incompetência istmo cervical está presente entre 10% e 20% de todas as perdas fetais de segundo trimestre e estima-se que sua incidência varia em torno de 2% ⁽⁸⁾.

Pode ocorrer por anormalidade traumática do colo uterino, como por curetagens, roturas, cirurgias ou amputações do colo, anormalidades anatômicas, como tumores e miomas e, finalmente, por anormalidades congênitas ou funcionais que se justificam pelas propriedades constitucionais do tecido conectivo do colo uterino. Tanto as anormalidades congênitas como as traumáticas estão associadas ao aumento do risco de parto prematuro ⁽⁶⁾.

A prematuridade pode ser classificada em espontânea e eletiva, quando sua ocorrência está relacionada à interrupção da gestação por doenças maternas ou fetais que imponham a interrupção prematura da gestação. A prematuridade espontânea corresponde a cerca de 70% dos casos e, muitas vezes, ocorre na ausência de uma causa específica ^(9, 10, 11).

A insuficiência istmo cervical clássica é diagnosticada pela história obstétrica de perda fetal recorrente de segundo trimestre, seguida de dilatação cervical indolor, prolapso ou rotura de membranas ovulares e expulsão de feto vivo, às custas de atividade uterina mínima ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Na ausência da recorrência, o termo insuficiência cervical também é usado, sendo o diagnóstico mais trabalhoso, desde que o episódio único

possua as mesmas características da história clássica e que as demais causas de prematuridade e perdas recorrentes tenham sido todas excluídas⁽¹⁵⁾.

Uma vantagem na realização do diagnóstico de insuficiência cervical, apesar da ausência de um teste objetivo, é a possibilidade de realização da cerclagem. Para tal, se faz necessário o correto diagnóstico e planejamento terapêutico para futuras gestações^(14, 16).

A cerclagem cervical foi descrita por Shirodkar, em 1955, Mc Donald, em 1957, e modificada por Marshall e Evans, em 1967, e, finalmente, por Pontes, em 1990. Para Pontes, a cerclagem corresponde a duas suturas circulares, sendo a primeira em nível do orifício interno do colo e a segunda, 1 cm abaixo. A cerclagem reduz o risco de parto prematuro em 25%^(6, 17).

Estudos observacionais evidenciam que, nos casos clássicos, a sobrevida do RN pode chegar a 93% após a cerclagem efetiva, comparando-se com 27% dos casos em que a cerclagem não é realizada. Dessa forma, observa-se a importância do diagnóstico da incompetência cervical. Do mesmo modo também, há evidências de não haver redução da perda fetal se o diagnóstico correto não for insuficiência cervical^(12, 18).

O antecedente de parto prematuro espontâneo em gestação anterior é considerado o principal e mais importante indício clínico para a prematuridade⁽³⁾. Por esse motivo, o histórico pessoal obstétrico assume notável importância^(19, 20, 21). Evidências epidemiológicas indicam que

fatores genéticos têm um papel significativo na etiologia, tanto do parto prematuro como também da incompetência cervical ^(9, 12).

A história de incompetência cervical é reconhecida como um importante fator de impacto para o nascimento pré-termo ⁽²⁾; com consequências desastrosas para o nascimento e cursa, necessariamente, com histórico obstétrico de perdas gestacionais recorrentes no início do segundo trimestre ⁽²²⁾.

A lacuna no conhecimento sobre a prematuridade, nos lança na busca de procurar formas de identificar, compreender e tentar conter sua ocorrência ⁽²³⁾. No presente estudo, pelo pilar da incompetência cervical daremos continuidade à busca por estas respostas.

O polimorfismo de base única é a variação na sequência do DNA que ocorre quando um único nucleotídeo (adenina, citosina, timina ou guanina) em uma determinada sequência difere entre indivíduos da mesma espécie ou entre os cromossomos homólogos em um mesmo indivíduo. São definidos como variantes genéticas que estão presentes na população em uma frequência maior que 1%, pois as variantes presentes em uma frequência menor que 1%, dependendo da variante descrita, são chamadas apenas de mutação. Os SNPs constituem 90% de todas as variações genômicas humanas e aparecem, em média, uma vez a cada 1.000 pares de bases.

Existem milhões de polimorfismos no genoma humano, e a capacidade em detectar estes polimorfismos vêm modificando os estudos da

genética. Além das mudanças morfológicas, estas substituições podem influenciar a resposta ao organismo frente a diferentes patologias ⁽²⁴⁾.

A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionados a parto prematuro e síntese do colágeno podem identificar gestantes com incompetência cervical e de maior risco para prematuridade, ou direcionar para o diagnóstico de incompetência cervical pacientes sem a história clássica ⁽²⁵⁾.

As membranas fetais e o colo uterino são compostos sobretudo por colágeno e há necessidade de um equilíbrio dinâmico da degradação do colágeno para acomodar o volume expandido, à medida que a gestação evolui. Todo esse processo de degradação do colágeno é mediado por metaloproteinases (MMP), capazes de degradar a matriz extracelular ⁽²⁶⁾.

O colágeno tipo I e o colágeno tipo III são componentes predominantes da matriz extracelular do colo uterino, dando-lhes a tensão e o comprimento. Colagenases da matriz, conhecidas como metaloproteinases, degradam o colágeno, amolecendo o colo, um processo denominado remodelamento do colo, de fundamental importância no preparo para a dilatação e nascimento. As mutações do colágeno tipo I também estão relacionadas à Síndrome de Ehlen-Danlos, distrofia miotônica, neurofibromatose e osteogênese imperfeita ^(27, 28).

Inicialmente, as metaloproteinases tipo 2 (MMP-2) foram descritas na degradação do colágeno e a metaloproteinase tipo 9 (MMP-9), na degradação dos produtos do colágeno. Recentemente, estas mesmas

proteínases foram descritas na degradação tanto do colágeno tipo I como do colágeno tipo III ⁽²⁹⁾.

O metabolismo do colágeno e dos componentes da matriz extracelular, estão diretamente relacionados à dinâmica do colo uterino, sendo esta relação mais expressivas nas pacientes com incompetência cervical. Essas modificações alertam para a possibilidade de associação entre os genes relacionados às conexões da matriz celular e a incompetência cervical do colo.

Outro marcador de interesse, que pode ser secretado de macrófagos diante de um estímulo inflamatório envolvido na dinâmica da remodelação do colo uterino, é o fator de transformação de crescimento beta (TGF-B).

O conhecimento no remodelamento do colo nos nascimentos a termo e pré-termo é importante no desenvolvimento de estratégias para prevenir o nascimento prematuro ⁽¹⁸⁾.

A associação entre o comprimento do colo uterino e o parto prematuro também já foi previamente estabelecida em diversos estudos. O colo curto foi associado a altos índices de citocinas, e isso pode explicar a associação entre marcadores inflamatórios e parto prematuro. Desta forma, diversos marcadores inflamatórios foram descritos como preditores de parto prematuro em mulheres com colo curto ⁽³⁰⁾.

A dilatação prematura pode ser seguida de infecção mas, em algumas mulheres, a infecção ascendente parece ser causa primária da dilatação ⁽³¹⁾. Distúrbios no padrão de resposta inflamatória podem contribuir

diretamente para a etiologia do parto prematuro, e o polimorfismo em determinados genes pode justificar este padrão. Os polimorfismos nos genes das citocinas, envolvidas neste processo, também podem afetar a resposta imunológica e seu papel na suscetibilidade de várias condições obstétricas vem sendo amplamente estudado ⁽³²⁾.

Vários estudos já identificaram o componente genético na ocorrência da prematuridade e relacionam uma série de SNPs de genes do colágeno e interleucinas ^(27, 33, 34).

Poucos estudos fazem referência especificamente a polimorfismo genético e incompetência cervical. Em razão da notória relação dos mesmos mecanismos que culminam com a dinâmica do remodelamento do colo e ocorrência de prematuridade, faz-se razoável propor a correlação destes mesmos SNPs descritos nos estudos de prematuridade aos casos de incompetência cervical.

Na frequência dos SNPs, há variação entre diferentes populações, sendo inédito o estudo na população brasileira para estes genes que possam estar relacionados à prematuridade e às pacientes com incompetência cervical.

A predisposição genética para o parto prematuro foi proposta com base na hereditariedade, diferenças raciais e identificação de genes. A explicação genética para o evento contempla, desde a modulação gênica para o padrão de resposta inflamatória a polimorfismo genético em genes

relacionados ao colágeno, citocinas e interleucinas que já foram descritas em diversos estudos ⁽³³⁾.

Classicamente, as pacientes com incompetência cervical são identificadas por meio da história clínica de abortamento no início do segundo trimestre. A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) relacionados a parto prematuro e síntese do colágeno podem identificar gestantes com incompetência cervical de maior risco para prematuridade ou direcionar para o diagnóstico de incompetência cervical pacientes sem história clássica, auxiliando na decisão terapêutica da cerclagem e na identificação daquelas gestantes que, mesmo submetidas à cerclagem cervical, teriam maior risco de desfecho desfavorável na gestação, abortamento ou parto prematuro em idade inferior a 32 semanas. Isso permitiria a programação terapêutica, direcionamento para centros terciários e como consequência a redução nas taxas de prematuridade e óbito neonatal.

Assim, desde a grande promessa do sequenciamento do genoma humano há mais de 10 anos, a busca por uma medicina personalizada, capaz de diagnosticar doenças, como a incompetência istmo cervical, prever riscos, como os da prematuridade, traduz-se também nos atuais questionamentos da genética.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Associar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados nos genes do COL1 A1, COL 4A3, TGF-B e TIMP2 ao antecedente de incompetência cervical.

2.2 Específicos

1. Comparar a frequência dos SNPs dos genes do COL 1 A1, COL 4 A3, TGF-B e TIMP2 nas pacientes com antecedente de incompetência cervical com pacientes com antecedente de gestação a termo.
2. No grupo de pacientes com antecedente de incompetência cervical, comparar a frequência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com os antecedentes obstétricos.

3 Revisão de Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

Recentemente, foi sugerido pelos autores Daniela Horst e Yves Garnier, em estudo publicado em 2008, que a interação gene meio ambiente tem papel significativo no parto de nascimento prematuro. O polimorfismo (SNP) de certos genes pode ser responsável pelo padrão de resposta inflamatória, modulando a mesma para um acréscimo ou decréscimo no risco de parto prematuro ⁽³⁵⁻³⁷⁾.

A importância do colo uterino para o advento do nascimento prematuro já foi extensamente avaliada e reportada em diversos estudos ^(2, 38). Uma das formas de avaliar o colo é pela ultrassonografia transvaginal. Esse tipo de avaliação do colo uterino como preditor de nascimento pré-termo também já foi extensamente descrito, mas, o colo curto não significa sempre incompetência cervical ou nascimento prematuro ^(39, 40).

Entretanto, a etiologia da incompetência cervical é incerta, assim como o nascimento prematuro e representa via comum de um heterogêneo grupo de desordens ⁽²⁷⁾.

Outra importante referência quanto ao estudo do colo uterino e incompetência cervical é a possibilidade de resultados promissores com a utilização da cerclagem ^(25, 41). A cerclagem cervical reduz o parto prematuro recorrente em mulheres com histórico de incompetência cervical ^(22, 42).

Há poucas descrições de polimorfismo genético especificamente relacionado ao grupo de pacientes com incompetência cervical, mas, por analogia, há considerações bastante relevantes quanto a esta análise em relação ao grupo de pacientes com prematuridade. Os polimorfismos dos genes do colágeno, das interleucinas e metaloproteinases já foram descritos com forte associação com a prematuridade e podem ter correlação direta com os mecanismos da dinâmica de remodelação do colo uterino. Por esse motivo, há interesse na correlação destes mesmos polimorfismos e os casos de incompetência cervical ⁽⁴³⁻⁴⁷⁾.

Estudo realizado, em 2010, na população do Chile, por Roberto Romero et al. com o objetivo de identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos associados ao parto prematuro evidenciou associação positiva para polimorfismos em vários genes ⁽³³⁾.

Nesse estudo, a associação com 223 mulheres e 179 fetos com parto prematuro e membranas intactas em idade gestacional inferior a 37 semanas e 599 mulheres e 628 fetos que deram à luz de parto normal a termo foram analisados 190 genes candidatos e 775 SNPs. Houve associação positiva com o IGF2 fetal (fator de crescimento insulina-like F2) e o Col4A3 (Alfa 3 Isoforma 1 do colágeno 4) materno e a ocorrência de prematuridade. Romero et al. concluem ainda que, na população chilena, foi evidente a associação de polimorfismos localizados nos genes IL-6 R e o TIMP2, associados ao fator inibidor da metaloproteinase 2, praticamente, dobrando o risco de prematuridade em mulheres com membranas ovulares intactas no grupo estudado.

Em 2008, Digna Velez et al. descreveram em outro trabalho a relação entre a frequência de prematuridade em dois grupos populacionais americanos afrodescendentes e europeu descendentes, constatando uma maior frequência de prematuridade no primeiro grupo. A análise de dois genes candidatos nesse estudo, na codificação da IL6 e da IL6-R, foi analisada em mulheres e fetos em 496 nascimentos no grupo populacional europeu descendente (149 casos e 347 controles) e em 347 nascimentos no grupo afrodescendente (76 casos e 321 controles). Esta avaliação caso controle evidenciou um SNP no IL6-R associado ao parto prematuro ^(44, 48).

As reduções dos níveis de colágeno, ácido hialurônico e glicosaminoglicanos já foram descritas, nas modificações próprias do colo uterino na gestação, sendo ainda mais evidentes nas pacientes com incompetência cervical. Tais modificações alertam para a possibilidade de associação entre os genes relacionados às conexões da matriz celular e a incompetência cervical do colo, que vai levar também à prematuridade ⁽³⁸⁾.

Polimorfismos no gene do COL1A1 e do TGF-B associam-se a distúrbios na matriz celular. A mudança de G para T no SNP localizado na região de ligação SP1 do gene COL1A1 leva à alteração na regulação gênica do colágeno, desencadeando uma produção anormal dessa proteína (homotrímeros em lugar de heterotrímeros), levando ao encurtamento do colo. O polimorfismo do gene TGF- B causa alterações nos níveis de TGF- B e também pode influenciar toda a interação da matriz celular. O conhecimento desta via é uma sabida alteração na conexão celular e causa

interesse na função cervical descrita em mulheres com incompetência cervical^(27, 28).

Warren et al. descrevem ainda, em estudo com pacientes com incompetência cervical, que o polimorfismo Arg 25 Pro no exon 1 do gen TGF- β 1 altera o transporte de proteínas por meio do retículo endoplasmático celular, afetando assim diretamente a conexão celular. Desta forma, neste estudo, postulam ser biologicamente plausível que esses polimorfismos podem aumentar o risco de incompetência cervical⁽²⁸⁾.

Em estudo caso controle de Warren et al., realizado com 121 mulheres com incompetência cervical e 165 mulheres controle sem esse histórico, os autores concluem que 34 amostras de 125 (27,2%) dos casos de incompetência cervical possuíam parente de primeiro grau com o mesmo histórico e que a frequência de homozigoto TT no Col1A1 foi também maior no grupo de casos, quando comparado ao grupo de controles (10,8% comparado com 3,1%), além do polimorfismo TGF- β maior no grupo de casos (38,3% nos casos comparados com 14,6% nos controles). O estudo conclui que, em parte, a incompetência cervical é mediada por fatores genéticos, com grau de evidência II⁽²⁸⁾.

Nas gestações a termo, um complexo sistema de remodelamento do colo uterino permite que o canal cervical dilate para o nascimento. Esse remodelamento é direcionado pela qualidade e quantidade das fibras do colágeno e outras substâncias da matriz extracelular e sua interposição, que influem diretamente no comportamento biomecânico da cérvix, inclusive em condições patológicas, como na incompetência cervical⁽³⁸⁾.

Wang et al. descrevem que estudos com genes candidatos demonstram que os polimorfismos, que favorecem a atividade promotora de genes relacionados a metaloproteinases, podem promover a quebra do colágeno, o que estaria associado a risco aumentado, tanto para rotura prematura de membranas ovulares como também de trabalho de parto prematuro ⁽²⁹⁾.

Estudo realizado com a população da Noruega por Myking et al., em 2011, evidenciou que a interação entre o genoma fetal e materno pode afetar o risco de parto prematuro, sendo incerto o papel do genoma paterno. No mesmo estudo, foram considerados os papéis do genoma materno e fetal em conjunto e separados na análise de 1.430 SNPs em 140 genes. A coorte Moba inclui mais de 107.000 gestantes, recrutadas de 1999-2008 e considerou 53.711 gestações, com a seleção de genes candidatos baseada em descrições prévias de associação com parto prematuro. Após algumas exclusões, a amostra final de 407 amostras fetais e maternas (196 casos, 211 controles), e 186 amostras paternas (apenas referentes a casos), associou o COL5A2 fetal e a combinação do COL5A1 fetal e materno com a ocorrência de trabalho de parto espontâneo ⁽⁹⁾.

4 ÉTICA

As pacientes com história de incompetência cervical e que realizam seguimento no ambulatório de abortamento habitual do Hospital das Clínicas da FMUSP foram convidadas para o estudo por meio de um convite verbal do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice 1**).

As pacientes sem o histórico de incompetência cervical e com, pelo menos, dois partos a termo (grupo controle) também foram convidadas no próprio Ambulatório de Obstetrícia do HC-FMUSP. Algumas pacientes do grupo controle são pacientes em seguimento na clínica, mas, não necessariamente, gestantes, já que o objetivo do estudo é genético e não envolve a análise de SNPs fetais. Necessariamente, as pacientes do grupo controle não têm nenhum grau de parentesco com as pacientes do grupo de casos. Foram convidadas também por meio de contato verbal no ambulatório e também pelo TCLE específico (**Apêndice 2**).

O projeto de pesquisa que originou esta dissertação foi previamente aprovado pelo CEP, Comitê de Ética e Pesquisa da FMUSP sob Parecer Consubstanciado Protocolo nº 202.060 (**Apêndice 3**) e contou ainda com o financiamento da FAPESP, processo número 2012/24.029 e bolsa de auxílio à pesquisa do programa regular CAPES.

Além do TCLE, foi anexada uma ficha clínica complementar para coleta de demais informações sociodemográficas e histórico pessoal e

obstétrico das pacientes, incluindo as seguintes variáveis: idade materna, procedência, endereço, telefone de contato, cor autodeclarada, grau de escolaridade, ocupação, antecedentes obstétricos, informações sobre partos, intercorrências e nascimentos. Todas estas informações puderam ser ainda complementadas com os dados do prontuário.

5 Métodos

5 MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

A proposta desta dissertação foi a avaliação dos SNPs por meio de um estudo de caso controle prospectivo. Foram colhidas 150 amostras entre casos e controles, e a análise das primeiras 62 amostras foi realizada.

5.2 Cálculo amostral

Este estudo faz parte do projeto que tem como objetivo final a correlação da presença dos SNPs estudados no grupo de gestantes submetidas à cerclagem por incompetência cervical com o desfecho da gestação em relação à idade gestacional do parto. Por amostra de conveniência, está sendo apresentado um total de 62 pacientes, em que foi obtido sucesso para amplificação dos 4 *primers* de interesse para os SNPs-alvo, no total de 150 indivíduos incluídos no estudo.

5.3 Casuística

Este estudo de caso controle prospectivo foi realizado com 150 amostras de sangue periférico, sendo 81 casos de pacientes com histórico de incompetência cervical e 69 controles de pacientes sem este histórico, atendidas na Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) no período entre abril de 2013 e janeiro de 2016, que se encaixaram nos critérios de inclusão descritos abaixo:

5.3.1 Critérios de inclusão

Grupo Caso:

Pacientes com gestação simples e histórico de incompetência cervical e/ou submetidas à cerclagem em sua última gestação ou na gestação atual.

Ausência de intercorrências clínicas e obstétricas, do tipo hipertensão arterial, diabetes, colagenose, óbito fetal, malformação fetal na última gestação, como causas de prematuridade.

Grupo Controle:

Ausência de parto prematuro eletivo em sua última gestação.

Pacientes com antecedente obstétrico de parto a termo sem antecedente de aborto habitual .

5.3.2 Critérios de exclusão

Não obtenção da concentração de DNA necessária;

Impossibilidade técnica para obter os fragmentos de DNA de interesse para análise; e

Parto prematuro eletivo na gestação atual.

5.4 Coleta de sangue

As amostras de sangue periférico foram coletadas de todas as pacientes convidadas a participar do estudo que aceitaram e assinaram o termo. As amostras foram de 5 a 10 ml de sangue periférico (em um único tubo), coletadas pelo próprio pesquisador, em tubos contendo anticoagulante EDTA.

Logo após a coleta, as amostras devidamente identificadas foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical e armazenadas no freezer a -20 graus para posterior análise.

5.5 Extração de DNA de sangue periférico

A extração do ácido nucleico (DNA) materno das amostras de sangue total, que ocorre nos leucócitos, foi realizada utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini (QIAGEN) e 200 µL de amostra.

O método é composto por quatro etapas: lise, ligação, lavagem e eluição do ácido nucleico. O DNA presente no sangue total encontra-se ligado a proteínas e requer a lise para permitir a ligação seletiva à coluna QIAamp que vem no kit e, finalmente, ficar disponível.

Antes de iniciar o processo, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, em ambiente próprio para extração de DNA no IMT e catalogadas em arquivo.

Após esta etapa, as amostras foram lisadas sob condições desnaturantes e incubadas a 56 °C por 10 minutos, com 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão de lise (ambos são também parte do kit), que garantem a inativação de enzimas que degradam o DNA (DNases). A seguir, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 600G e adicionados 200 µL de etanol com nova etapa de centrifuga.

As amostras são transportadas para as colunas de gel (coluna QIAamp do kit) e submetidas a nova etapa de centrifuga. Retiram-se os tubos de sobra, contendo parte dos reagentes e restos celulares e, a seguir, o DNA é ligado à membrana de sílica da coluna QIAamp do kit, em condições ajustadas por um tampão específico e iniciam-se as etapas de lavagem.

Contaminantes são lavados nas etapas subsequentes, utilizando 500 µL de dois tampões próprios de lavagem, enquanto os ácidos nucleicos permanecem aderidos à membrana.

Por último, adicionamos 100 µL tampão de eluição e desprezamos as colunas de gel, armazenando subsequentemente o DNA no tubo próprio para estocagem com a devida identificação da amostra, conforme previamente catalogada.

5.6 Determinação da concentração e pureza do DNA

A determinação da concentração e da pureza do DNA extraído das amostras de sangue total foi realizada por meio de uma medida

espectrofotométrica no equipamento Thermo Scientific NanoDrop 2000, seguindo as recomendações do fabricante, utilizando-se 2 µL de amostra.

As concentrações foram determinadas em nanogramas por microlitros e variaram de acordo com o especificado na tabela em anexo (**Anexo A**).

As amostras 102 e 117 perderam a identificação durante o congelamento e foram desconsideradas na análise.

As amostras, em que a concentração de DNA ficou abaixo de 10 ng/ml, ou a relação 260/280 distanciou-se muito do padrão 1,5, totalizaram 35 e foram submetidas a nova extração e já ajustadas à tabela anexada (**Anexo A**).

5.7 Desenho dos *primers*

Os *primers* ou sequências de nucleotídeos iniciadores, para a amplificação dos fragmentos de interesse, foram desenhados com base nas sequências dos genes já descritos e disponíveis no “GenBank”, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Com esta ferramenta, para cada *primer* foi desenhado um formato senso e outro anti (ou forward e reverse, conforme as descrições em estudos) que correspondem às sequências de *primers* em sua versão iniciadora em um extremo da fita e no outro extremo da fita de DNA e ainda uma segunda opção, caso o *primer* não contemple a região do SNP necessária na primeira etapa de padronização das reações.

A partir deste molde inicial, o *primer* foi adquirido comercialmente pela empresa DNA Express[®] e armazenado em freezer para futura utilização.

O desenho dos *primers* levou em consideração um fragmento do SNP, com 20 pares de bases, o não pareamento dos *primers* senso e antissenso entre si, e não emparelhamento dos *primers* com eles mesmos, respeitando uma proporção de 40% de C G para evitar a formação de dímeros. Além disso, uma temperatura de *melting* (que corresponde à temperatura necessária para a quebra da fita do DNA) semelhante, para o *primer* senso e o antissenso.

Os *primers* desenhados, seus tamanhos, o gene e os SNPs associados estão descritos a seguir.

Tabelas 1 e 2 - Descrição da sequência de *primers* COL1A1, COL4A3, TGF-B, todos no formato senso e antissenso (ou *forward* e *reverse*) delimitados com o programa GenBank”, banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); identificação do SNP correspondente, localização no cromossomo e tamanho em pares de bases

<i>Primer</i>	Sequência
COL1A1-F	CCCTAGAAGGGAAGGACAGG
COL1A1-R	GAGGGGCTGTTTGGGATAAT
COL4A3-F	CTGCGGATCTTTCTGCTACC
COL4A3-R	CAAGGTCACCTGGCTCCTAA
TGFB-F	TGGGGACACCATCTACAGTG
TGFB-R	GACCCCGAGGTCCTAGAAAG
TIMP2-F	TCCTCCTCCTTGTCTTTCCA
TIMP2-F	TACCCTGCCTCACTGTTCT

GENE	SNP	CROMOSSOMO	TAMANHO
COL1A1	rs25866490	17	290
COL4A3	rs18822435	2	283
TGF-B	rs18004668	19	277
TIMP2	rs2277698	17	261

Col1a1= colágeno 1 isoforma alfa 1

Col4a3= colágeno 4 isoforma alfa3

TGF-B= fator de transformação e crescimento beta

5.8 Padronização das reações

Para definir as condições ideais de ciclagem para cada fragmento de *primer* desenhado, foram realizadas reações de padronização a partir da amplificação de cada conjunto de *primer* por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. A importância desta padronização se faz no sentido de encontrar a melhor temperatura para a quebra da fita de DNA e, assim, proporcionar condições ideais e fundamentais para que a reação de PCR ocorra. Do contrário, a reação é inviável.

Nesse primeiro momento, foram realizadas diluições dos *primers*-padrão para a realização das reações protocoladas para PCR com uma amostra de DNA previamente selecionada do próprio laboratório IMT, oriunda de outro projeto de pesquisa e já previamente conhecida e quantificada.

A PCR foi feita utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA polimerase e o termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf).

As reações foram realizadas com volume final de 25 μ L, nas seguintes condições-padrão de concentração: Tampão de PCR 10X, com volume final de 2,5 μ L, $MgCl_2$, com concentração inicial de 50 mM e com volume de 1,25 μ L, 2,5 mM de dNTPs, com volume de 5 μ L, concentração de 10 mM de cada *primer* senso e antissenso, com volume de 1 μ L, 5 U/ML da enzima Platinum Taq DNA polimerase, com volume final de 0,25 μ L, H_2O q.s.p. 25 μ L, com volume de 9 μ L e 250 ng de DNA no total, com concentração inicial de 50 ng/ μ L e volume final de 5 μ L, sendo este

acrescido ao final do preparo. Este padrão foi ajustado, seguindo as devidas proporções, às quantidades de amostras a serem avaliadas, por cálculo em planilha do Microsoft Excel (versão 2011).

Os ciclos de variação de temperatura utilizados foram os seguintes: Um ciclo de 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, gradiente de temperatura de anelamento que variou de 45 °C a 63,3 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto. A seguir, a programação era manter as amostras na temperatura de 4 graus até a retirada do aparelho.

Para confirmar a amplificação dos fragmentos definidos pelos pares de *primers*, foram utilizados 5 µL do produto de PCR misturados a tampão de amostra (azul de bromofenol 6X) e corridos em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,7 µg/mL) em tampão TAE (1X). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal de eletroforese alimentada por fonte de eletroforese, nas seguintes condições: 100 V por 30 a 40 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos que, quando o gel foi exposto à luz ultravioleta, apresentaram bandas correspondentes a seus tamanhos (pares de bases) pela comparação a um padrão de peso molecular com 100 pares de bases.

Abaixo estão as imagens dos géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio, dos produtos de PCR de cada conjunto de *primers* na fase de padronização da reação, após reação de PCR (**Figuras 1, 2, 3 e 4**).

Figura 1- Imagem referente ao gel de agarose a 1,5%, corada com brometo de etídio - *Primer* COL1A1 e COL4A3 após amplificação por PCR, na fase de padronização das reações.

COL1A1= colágeno tipo 1 isoforma alfa 1. COL4A3 = colágeno tipo 4 isoforma alfa 3

A primeira coluna de bandas refere-se ao tamanho para 100 pares de bases, ou *ladder* referência de tamanho para as colunas subsequentes. Cada coluna a seguir representa um gradiente de temperatura, para o qual cada fragmento foi testado, para uma mesma amostra teste em comum de DNA. Assim, foi definida em que temperatura há melhor desempenho da banda que aparece na leitura, e sempre comparativamente com o controle na última coluna.

Após a reação de PCR para cada *primer*, a análise do gel de eletroforese, evidenciou os seguintes resultados descritos abaixo para cada *primer*.

Para o COL1A1 (290 pares de bases) e COL4A3 (283 pares de bases), observamos uma associação positiva para as temperaturas maiores, a partir de 61 graus.

De forma semelhante, para o terceiro conjunto de *primer* analisado, o TGF-B (277 pares de bases) também evidenciou associação positiva com as temperaturas mais altas, mas, para este conjunto, já a partir de temperaturas entre 53 e 55 graus.

Figura 2- Imagem referente ao gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio - *Primer* TGF - beta após amplificação por PCR na fase de padronização da reação.

TGF- β = fator de transformação de crescimento beta.

Não foi possível a leitura do *primer* TIMP2 (261 pares de bases), após a primeira reação de análise do gel. Foram visíveis apenas os controles de 100 pares de bases. Assim, repetimos a reação protocolada com diferentes amostras de DNA (também preparadas e cedidas pelo próprio laboratório IMT) para posterior avaliação e observamos a presença das bandas a partir de 62 graus de temperatura.

Figuras 3 e 4 – Imagens referentes aos géis de agarose a 1,5% - *Primer* TIMP2 após reação por PCR na fase de padronização das reações. Primeira imagem sem a formação das bandas. Segunda imagem releitura em gel após ajustes.

TIMP2= inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2

Os *primers* COL1A1, COL4A3, TGF-B e TIMP2 apresentaram as bandas equivalentes aos tamanhos, desenhados de forma adequada para as temperaturas mais elevadas, sendo o ponto comum as temperaturas de 62 graus para estes 4 conjuntos de *primers* avaliados.

Com esta padronização, conseguimos estabelecer as condições ideais para a utilização dos *primers* selecionados.

5.9 Reação de PCR convencional das amostras

Com os *primers* padronizados, foram realizadas as reações de PCR convencional, considerando a temperatura de 62 graus, seguida da leitura em gel de agarose com brometo de etídio a 1,5% de cada uma das 150 amostras e cada um dos conjuntos de *primers* padronizados.

A PCR foi feita utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA polimerase e o termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf), com o mesmo protocolo utilizado na fase de padronização da reação. Do total de amostras submetidas à reação de PCR convencional, muitas amostras não apresentaram amplificação na leitura do gel de agarose.

Do total de, aproximadamente, 600 reações de PCR realizadas nesse protocolo, que equivalem às 150 amostras, e os quatro conjuntos de *primers*, foram amplificadas com sucesso 84 amostras referentes aos *primers* Col4a3 e TGF-B e 36 amostras referentes ao COL 1A1 e COL4A3.

Desta forma, das 150 amostras, aquelas que não foram amplificadas tiveram a reação de PCR refeitas, com o protocolo da enzima HotStart Taq Master Mix, onde foi obtido um total de 62 amostras amplificadas para os 4 *primers* de interesse.

Neste protocolo, as reações foram realizadas com volume final de 25 µL, nas seguintes condições de concentração: Hotstart Taq Master Mix

com volume final 12,5 μL ; *Primer F* na concentração inicial 10 μM e volume final 1 μL , *Primer R* também na concentração inicial 10 μM e volume final 1 μL , Água 50 ng/ μL com volume final de 5,5 μL e 50ng/ μL de DNA com volume final 5 μL . Esse padrão foi ajustado, seguindo as devidas proporções, às quantidades de amostras a serem avaliadas, por cálculo em planilha do Microsoft Excel (versão 2011).

Para confirmar a amplificação dos fragmentos definidos por conjunto de *primers*, foi realizada a leitura em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,7 $\mu\text{g/mL}$) em tampão TAE (1X), de forma semelhante à etapa de padronização, utilizando-se 5 mL de produto de PCR e cubas para sistema horizontal de eletroforese, alimentada por fonte, nas condições 120 v por 20 a 30 minutos (**Figura 5**).

Figura 5 - Imagem referente ao gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio -*Primer* TIMP 2 após amplificação por PCR na fase de amplificação protocolo Hotstart Mix das amostras.

Timp2 = inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2

Foram consideradas amplificadas os produtos que, quando o gel foi exposto à luz ultravioleta, apresentaram bandas correspondentes a seus tamanhos (pares de bases) pela comparação a um padrão de peso molecular de 100 pares de bases.

Assim, com 62 amostras amplificadas para os quatro *primers* (COL1A1, COL4A3, TGF-B e TIMP2) prosseguimos as etapas seguintes.

5.10 Pool de amostras

Obtidos os produtos de PCR (Amplicons), foi realizada nova quantificação de cada amostra e seus respectivos quatro produtos de PCR, pelo equipamento Thermo Scientific Nanodrop 2000, o mesmo utilizado na quantificação após extração de DNA. Seguindo as recomendações do fabricante, foram utilizados 2 μ L de amostra.

Após esta etapa, um cálculo foi realizado para que todas as amostras ficassem equimolares, baseadas no produto de menor concentração, antes da elaboração do *pool* contendo os quatro produtos de PCR de cada amostra.

Após a realização deste *pool*, uma nova etapa de quantificação, realizada pelo método Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies), foi feita para a checagem das quantidades de DNA, antes de prosseguir para início das etapas de biblioteca.

5.11 Construção da biblioteca

O kit biblioteca utilizado foi o Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies - cat 4471269) referente à química de 400 pB, uma vez que os fragmentos da análise tinham os tamanhos de 290 pB, 283 pB, 277 pB e 261 pB.

Nesta etapa, as amostras são preparadas a 100 ng cada pool de amplicons, para um volume final de 79 μ L (conforme quantificação prévia), utilizando para as diluições Nuclease-Free Water, em tubos de 1,5 mL

Eppendorf Lo Bind e acrescidas de 20 μ L de End Repair Buffer e 1 μ L de End Repair Enzyme e incubadas a 20 minutos em temperatura ambiente.

Para a purificação, acrescidos mais 180 μ L de Ampure em mais 5 minutos de incubação à temperatura ambiente.

A seguir, após vórtex e spin das amostras, estas foram dispostas em rack magnética por 2-3 minutos ou até que se apresentassem límpidas. Sem que fossem removidas da rack, e sem o manuseio das beads, o sobrenadante foi desprezado e foram acrescidas de etanol 70% por 30 s, seguidos de rotação dupla do tubo na rack de 180 graus. Após clareamento da solução, o sobrenadante também foi desprezado. Esta etapa de lavagem foi repetida e, a seguir, as amostras foram novamente submetidas a vórtex e spin, retornando a rack magnética. Após a secagem das beads em temperatura ambiente por 3-5 minutos, foram removidas da rack e acrescidas de 25 μ L de Low TE, diretamente sobre as beads com pipetagem “up and down”, seguidos de vórtex e spin e retornando à rack. Após clareamento da solução, o sobrenadante com o DNA eluído é transferido para novos tubos Eppendorf Lo bind 1,5 ML para armazenamento em freezer -10 a -30 °C até conclusão de todas as amostras e início da próxima etapa de ligação a adaptadores.

5.12 Ligação aos adaptadores

Para que cada amostra seja identificada posteriormente na leitura do sequenciamento, foram acoplados os adaptadores ou barcodes, que são marcadores específicos, de acordo com a sequência estabelecida.

Em um tubo 0,2 mL simples, foi feito um MIX, semelhante ao da reação de PCR, com 25 μ L de DNA, 10 μ L de Ligase Buffer, 2 μ L de Adapter P1, 2 μ L de Ion Xpress Barcode (numerado conforme tabela prévia, sendo um número para cada amostra), 2 μ L de dNTP Mix, 49 μ L de Nuclease-Free Water, 2 μ L de DNA Ligase, 8 μ L de Nick Repair Polymerase, totalizando 100 μ L do Mix. As amostras foram submetidas ao termociclador, seguindo o programa de 15 minutos a 25°, 5 minutos a 72° até por 1 hora a 4°.

A seguir, as amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL Eppendorf Lobind para nova etapa de purificação, desta vez, com 100 μ L de Ampure em rack magnética e com etanol 70% em duas lavagens (exatamente igual como protocolado para a primeira etapa da biblioteca), seguindo-se armazenamento do DNA eluído em 20 μ L de Low TE em freezer a -30°.

5.13 PCR real time (qPCR) e quantificação das amostras

Para a realização do qPCR r, foi utilizado o kit Ion Library Quantitation Kit (Life Technologies cat 4468802). Cada uma das 62 amostras foi diluída em três concentrações diferentes para avaliar em qual delas haveria melhor desempenho. Foram realizadas quatro placas de PCR real time, com 96

poços cada uma, e a quase totalidade das amostras ficou com a curva ideal com a concentração 1:200, algumas poucas na concentração 1:2000 e nenhuma na concentração 1:20. A curva de controle para a comparação foi feita a partir de amostras de *E. Coli*, conforme instruções do kit.

Um master mix com 10 μ L de Ion Library qPCR Mix, 1 μ L de Ion Library TaqMan Quantitation Assay e Nuclease Free Water 15 mL foi preparado. Para cada reação, foram acrescentados 15 μ L do Mix em cada poço da placa e adicionados 5 μ L de amostra além de 5 μ L de controles para a curva-padrão. As placas foram seladas e centrifugadas. O equipamento Real Time foi programado conforme as seguintes especificações: Fase de incubação 50° 2 minutos, fase de ativação da polimerase a 95° 20 seg, a seguir 40 ciclos a 95° 1 seg e 60° 20 seg; Incubação a 95° 20 seg e 40 ciclos 95° 3 seg e 60° 30 seg. Após 4 horas, os resultados já estavam disponíveis para análise.

Depois dessa análise e seguindo as devidas quantificações, foi realizado um novo cálculo para equimolaridade de todas as amostras e formação de novo pool, em tubo único, para a etapa seguinte.

Seguindo protocolo de controle de qualidade, a análise desse primeiro pool de amostras evidenciou policlonalidade em grande escala.

Assim, foi realizada nova etapa de purificação de todas as amostras, com 100 μ L de AMPure e etanol 70%, de forma semelhante à já descrita para a primeira fase de construção da biblioteca e ligação dos adaptadores,

seguindo-se nova quantificação pelo método Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies).

5.14 PCR de emulsão (Etapa One Touch)

Novo pool de amostras foi realizado, após a diluição com Nuclease-Free Water para equimolaridade de cada uma.

Em seguida, todas as amostras a 100 pM formaram o pool equimolar com o mesmo volume. Em 6,5 μ L do pool de biblioteca com adaptadores, foram acrescentados 18,5 μ L de Nuclease-Free Water e em seguida 25 μ L deste pool foi utilizado para preparar a solução do template com o Ion PGM Hi-Q Template Kit (Life Technologies- cat A27739). À solução do pool foi acrescentado o Ion PGM Hi-Q Reagent MIX e os demais reagentes, conforme descrito em protocolo. Ao preparo é também acrescentado Ion One Touch Reaction Oil para seguir à etapa de corrida no equipamento Ion One Touch 2 Instrument.

5.15 Sequenciamento PGM no Ion Torrent

A última etapa do processo de sequenciamento utilizou o Ion PGM Hi-Q Sequencing Kit (Life Technologies - cat A25592) que diz respeito à colocação do pool de amostras em chip de 316 e acoplamento ao equipamento Ion Torrent (Sequenciamento de última geração). Após um período de, aproximadamente, 6 horas, as sequências para leituras ficaram disponíveis para análise (**Figura 6**).

Figura 6 - Imagem referente à corrida de sequenciamento no equipamento Ion Torrent

O sequenciamento realizado no Ion Torrent com chip 316 gerou 183 Mpb, evidenciou 25% de carregamento no chip e uma cobertura para 867.812 reads, 19% de policlonalidade, 1% de dímero de adaptadores e 11% de amostras de baixa qualidade e totalizou 66% dos reads para leitura. O DNA das amostras foi 99% alinhado com o genoma humano.

Para encontrar as coordenadas dos amplicons, foi utilizado o program MACS2 e para fazer a chamada dos SNPs foi usado o Torrent Suit Variant (TSVC) versão 5.0.4. A matrix com todas as variantes foi montada por meio

do programa Ion Reporter e determinou: o cromossomo relacionado, o gene, a identificação do SNP, a referência de aminoácido, a referência para alteração e a possibilidade de outro alelo referência, o índice de qualidade e a posição.

Dos quatro SNPs alvos da análise, obteve-se ainda leitura de mais nove regiões vizinhas a estes, nos cromossomos 2 e 17, evidenciando alguns SNPs ainda não descritos em regiões intrônicas e exônicas, de significado ainda indeterminado e outra no cromossomo 3, no gen descrito como KLF15, descrito apenas no GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) como deleção no cromossomo 3 humano.

Tabela 3 - SNPs lidos após o sequenciamento pelo Ion Torrent e suas respectivas características: cromossomo, gene associado, identificação, alelo selvagem, alelo mutante e posição no gene

Cromossomo	Gene	Identificação do SNP	Alelo Selvagem	Alelo Mutante	Posição no gene
2	COL4A3	indeterminado	C	A	228102550
2	COL4A3	rs148393022	C	T	228102680
2	COL4A3	indeterminado	A	AC	228102721
2	COL4A3	rs13424243	G	C	228102723
2	COL4A3	rs1882435	C	A	228102752
2	COL4A3	indeterminado	T	G	228102836
3	KLF15	rs199663581	A	AC,ACC	126065560
17	COL1A1	indeterminado	G	C,GAT	48269245
17	COL1A1	rs2857396	G	A	48269302
17	COL1A1	rs2586490	C	T	48269426
17	COL1A1	rs117746137	C	G	48269428
17	TIMP2	rs2277698	C	T	76867017
19	TGF-B	rs1800468	C	T	41860587

6 Resultados

6 RESULTADOS

Uma análise descritiva foi inicialmente realizada, sendo apresentadas as medidas-resumo como, mínimo, médio, mediana, máximo e desvio padrão para as variáveis quantitativas. Já para as variáveis qualitativas foram apresentadas as frequências absoluta e relativa.

Para avaliar se as proporções de dois ou mais grupos são iguais ou diferentes, bem como avaliar se há independência entre duas variáveis foi aplicado o teste de exato de Fisher. Além disso, para as variáveis quantitativas, a fim de comparar dois ou mais grupos independentes, aplicamos o teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, respectivamente, uma vez que a suposição de normalidade foi violada. Em todos os cenários foi adotado um nível de 5% de significância. As análises foram realizadas por meio do *software* SPSS versão 23.

Das 62 amostras sequenciadas, 57 amostras tiveram leituras satisfatórias, sendo 28 casos e 29 controles. Em cinco amostras, a quantidade de "*reads*" não foi insuficiente para a análise. Nas 57 amostras, ainda houve algumas leituras indeterminadas para alguns SNPs. Assim, os pontos indeterminados foram também excluídos da análise.

As características sociodemográficas das populações de casos e controles estão dispostas nos dados das Tabelas 4 e 5 a seguir, em relação à idade, número de abortos, abortos tardios, prematuros e distribuição por cor autodeclarada.

Tabela 4 - Análise descritiva das características da idade materna e antecedente obstétrico das pacientes dos grupos caso e controle. (HCFMUSP 2013 - 2016)

Variável	Grupo	N	Mínimo	Média	Mediana	Máximo	Desvio Padrão	valor p
IDADE	Caso	28	23	30,000	28,50	43	5,150	<0,0001
	Controle	31	27	41,645	41,00	70	10,416	
	Total	59	23	36,119	33,00	70	10,142	
ABORTOS	Caso	28	0	2,250	2,00	6	1,404	<0,0001
	Controle	31	0	0,129	0,00	1	0,341	
	Total	59	0	1,136	0,00	6	1,456	
ABORTOS TARDIOS	Caso	28	0	1,321	1,00	4	1,020	<0,0001
	Controle	31	0	0,000	0,00	0	0,000	
	Total	59	0	0,627	0,00	4	0,963	
PREMATUROS	Caso	28	0	0,460	0,00	2	0,637	<0,0001
	Controle	31	0	0,000	0,00	0	0,000	
	Total	59	0	0,220	0,00	2	0,494	

Nota: * Teste de Mann-Whitney

A distribuição por cor evidencia uma distribuição igual da cor branca nos dois grupos e um predomínio da cor não branca, tanto no grupo de casos, como também no grupo de controles, em conformidade com a miscigenação característica da população brasileira.

Tabela 5 - Análise descritiva da cor da pele das pacientes dos grupos caso e controle (HCFMUSP 2013 - 2016)

		GRUPO		Total	valor p
		Caso	Controle		
COR	B	Contagem	10	11	21
		% em GRUPO	35,7%	35,5%	35,6%
	N	Contagem	5	4	9
		% em GRUPO	17,9%	12,9%	15,3%
	P	Contagem	13	16	29
		% em GRUPO	46,4%	51,6%	49,2%
	Total		28	31	59
			100,0%	100,0%	100,0%
					0,938

Nota: B- cor autodeclarada branca; N- cor autodeclarada negra; P- cor autodeclarada parda; *Teste exato de Fisher

6.1 Comparação dos grupos Caso e Controle em relação aos SNPs

A análise da independência entre os grupos casos e controle e os SNPs estudados foi realizada pelo teste exato de Fisher, sendo descrita nos dados das Tabelas 6 a 9.

Para o SNP rs25866490, do gene COL1A1, a frequência de heterozigotos no grupo controle foi de 63% e no grupo casos foi de 25,9%. A frequência de homozigotos T/T no grupo casos (19 amostras) foi 70,4% e no grupo controle (9 amostras) foi 33,3%. O p valor para este achado foi 0,03.

Tabela 6 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP COL1A1 (HCFMUSP 2013 - 2016)

			GRUPO		Total	valor p
			Caso	Controle		
COL1A1	Normal	Contagem	1	1	2	0,03
		% em GRUPO	3,7%	3,7%	3,7%	
	Heterozigoto	Contagem	7	17	24	
		% em GRUPO	25,9%	63,0%	44,4%	
	Homozigoto	Contagem	19	9	28	
		% em GRUPO	70,4%	33,3%	51,9%	
	Total	Contagem	27	27	54	
		% em GRUPO	100,0%	100,0%	100,0%	

Nota: *Teste exato de Fisher

Para o SNP rs18822435 do gene COL4A3, a forma heterozigota no grupo controle representou 53,6% e no grupo casos, 25%. A forma homozigota A/A foi maior no grupo casos (4 amostras), totalizando 16,7%, em comparação com o grupo controle (1 amostra), cuja frequência foi 3,6%. Estas diferenças não se mostraram, entretanto, estatisticamente significativas.

Tabela 7 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP COL4A3 (HCFMUSP 2013 - 2016)

			GRUPO		Total	valor p
			Caso	Controle		
COL4A3	Normal	Contagem	14	12	26	0,067
		% em GRUPO	58,3%	42,9%	50,0%	
	Heterozigoto	Contagem	6	15	21	
		% em GRUPO	25,0%	53,6%	40,4%	
	Homozigoto	Contagem	4	1	5	
		% em GRUPO	16,7%	3,6%	9,6%	
	Total	Contagem	24	28	52	
		% em GRUPO	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher

Para o SNP rs2277698 do gene TIMP2, as formas heterozigotas representaram 16% dos casos e 22,6% dos controles. A frequência de homozigotos T/T foi mais numerosa no grupo casos (2 amostras) representando 8% do total, do que no grupo controles, onde esse quantitativo foi 0. No entanto, o resultado estatisticamente significativo não foi obtido.

Tabela 8 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP TIMP2 (HCFMUSP 2013 - 2016)

		GRUPO		Total	valor p
		Caso	Controle		
TIMP2	Normal	Contagem	19	20	39
		% em GRUPO	76,0%	71,4%	73,6%
	Heterozigoto	Contagem	4	8	12
		% em GRUPO	16,0%	28,6%	22,6%
	Homozigoto	Contagem	2	0	2
		% em GRUPO	8,0%	0,0%	3,8%
	Total	Contagem	25	28	53
		% em GRUPO	100,0%	100,0%	100,0%

*Teste exato de Fisher

Para o SNP rs18004668 do gene TGFB, a frequência da forma selvagem foi de 89,3% no grupo casos (25 amostras) e 93,15 (27 amostras) no grupo controle. Os heterozigotos totalizaram 10,7% dos casos (3 amostras) e 6,9% dos controles (2 amostras). Nenhuma amostra homozigota foi identificada.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre normal e heterozigoto, comparando os grupos caso e controle.

Tabela 9 - Teste de independência entre os grupos caso e controle para o SNP TGF-B (HCFMUSP 2013 - 2016)

			GRUPO		Total	valor p
			Caso	Controle		
TGF-B	Normal	Contagem	25	27	52	0,67
		% em GRUPO	89,3%	93,1%	91,2%	
	Heterozigoto	Contagem	3	2	5	
		% em GRUPO	10,7%	6,9%	8,8%	
	Total	Contagem	28	29	57	
		% em GRUPO	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher

6.2 Comparação do antecedente obstétrico das gestantes do grupo caso e os SNPs

A relação entre os SNPs encontrados e o grupo casos, quanto ao número de abortos, abortos tardios e prematuros, foi avaliada pelo teste exato de Fisher.

O SNP rs18822435 do gene do COL4A3 apresentou uma frequência de 85% das formas heterozigotas e 71% da forma selvagem associadas ao histórico de 0-2 episódios de abortamento, em geral, e 75% das formas homozigotas associadas ao histórico de >2 episódios de abortamento. O p valor para esse achado foi de 0,020, demonstrando haver associação entre os grupos estudados, conforme os dados da Tabela 10.

Tabela 10 - Comparação e teste de independência entre o SNP COL4A3 e o antecedente obstétrico de abortamento nas pacientes do grupo caso (HCFMUSP 2013 - 2016)

		COL4A3			Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto		
ABORTOS	0-2	Contagem	10 _a	5 _a	1 _a	16
		% em COL4A3	71,4%	83,3%	25,0%	66,7%
	>2	Contagem	4 _a	1 _a	3 _a	8
		% em COL4A3	28,6%	16,7%	75,0%	33,3%
	Total	Contagem	14	6	4	24
		% em COL4A3	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Nota: *Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de COL4A3 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Para o antecedente obstétrico de abortamento tardio, os dados da Tabela 11 mostram associação entre o número de abortamentos tardios e o SNP COL4A3, além de diferença entre as proporções de homozigoto e heterozigoto entre os grupos de número de abortamentos tardios. Observa-se uma maior frequência de homozigotos entre as mulheres com mais de um episódio de abortamento tardio e de heterozigotos no grupo de mulheres com um ou nenhum abortamento tardio.

Tabela 11 - Teste de independência entre o SNP COL4A3 e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)

		COL4A3			Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto		
ABORTO TARDIO	0-1	Contagem	7 _{a,b}	6 _b	14	0,001
		% em COL4A3	50,0%	100,0%	25,0%	
	>1	Contagem	7 _{a,b}	0 _b	3 _a	
		% em COL4A3	50,0%	0,0%	75,0%	
Total		Contagem	14	6	4	24
		% em COL4A3	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de COL4A3 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

O histórico de prematuridade não apresentou associação em relação ao SNP COL4A3, conforme os dados da Tabela 12.

Tabela 12 - Teste de independência entre o SNP COL4A3 e o antecedente obstétrico de parto prematuro (HCFMUSP 2013 - 2016)

		COL4A3			Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto		
PREMATUROS	0-1	Contagem	13 _a	6 _a	3 _a	22
		% em COL4A3	92,9%	100,0%	75,0%	91,7%
	>1	Contagem	1 _a	0 _a	1 _a	2
		% em COL4A3	7,1%	0,0%	25,0%	8,3%
	Total	Contagem	14	6	4	24
		% em COL4A3	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de COL4A3 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Para o SNP rs25866490 do COL1A1, a frequência de abortos totais evidenciou 85,7% dos heterozigotos e 57,9% dos homozigotos associados para o episódio de 0-2 e 14,3% de heterozigoto e 42,1% de homozigoto associado a >2 episódios. De forma semelhante para os abortos tardios, 71,4% dos heterozigotos para 0-2 e 52,6% dos homozigotos e 28,6% dos heterozigotos e 47,4% dos homozigotos para >2 episódios. Não houve associação entre o número de abortamentos e o SNP COL1A1, conforme os dados da Tabela 13.

Tabela 13 - Teste de independência entre o SNP COL1A1 e o antecedente obstétrico de abortamento (HCFMUSP 2013 - 2016)

		COL1A1				Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto			
ABORTOS	0-2	Contagem	1 _a	6 _a	11 _a	18	0,060
		% em COL1A1	100,0%	85,7%	57,9%	66,7%	
	>2	Contagem	0 _a	1 _a	8 _a	9	
		% em COL1A1	0,0%	14,3%	42,1%	33,3%	
Total		Contagem	1	7	19	27	
		% em COL1A1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher cada letra do subscrito indica um subconjunto de COL1A1 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Os dados da Tabela 14 mostram que não houve associação entre o número de abortamentos tardios no antecedente obstétrico e o SNP COL1A1 assim como na distribuição dos alelos.

Tabela 14 - Teste de independência entre o SNP COL1A1 e o antecedente obstétrico de aborto tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)

		COL1A1				Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto			
ABORTO TARDIO	0-1	Contagem	1 _a	5 _a	10 _a	16	0,096
		% em COL1A1	100,0%	71,4%	52,6%	59,3%	
	>1	Contagem	0 _a	2 _a	9 _a	11	
		% em COL1A1	0,0%	28,6%	47,4%	40,7%	
Total		Contagem	1	7	19	27	
		% em COL1A1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de COL1A1 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Para o antecedente obstétrico de prematuridade não houve associação estatisticamente significativa para esse achado.

Tabela 15 - Teste de independência entre o SNP COL1A1 e o antecedente obstétrico de prematuridade (HCFMUSP 2013 - 2016)

		COL1A1			Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto		
PREMATUROS	0-1	Contagem	1 _a	7 _a	17 _a	25
		% em COL1A1	100,0%	100,0%	89,5%	92,6%
	>1	Contagem	0 _a	0 _a	2 _a	2
		% em COL1A1	0,0%	0,0%	10,5%	7,4%
	Total	Contagem	1	7	19	27
		% em COL1A1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de COL1A1 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Para SNPs rs 2277698 do gen TIMP2, houve associação com o antecedente de abortamentos, e não houve associação estatisticamente significativa com o histórico de abortos tardios e prematuridade, conforme os dados das Tabelas 16 a 18.

Tabela 16 - Teste de independência entre o SNP TIMP2 e o antecedente obstétrico de abortamento (HCFMUSP 2013 - 2016)

		TIMP2			Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto		
ABORTO	0-2	Contagem	14 _a	3 _a	0 _a	17
		% em TIMP2	73,7%	75,0%	0,0%	68,0%
	>2	Contagem	5 _a	1 _a	2 _a	8
		% em TIMP2	26,3%	25,0%	100,0%	32,0%
	Total	Contagem	19	4	2	25
		% em TIMP2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de TIMP2 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Tabela 17 - Teste de independência entre o SNP TIMP2 e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)

		TIMP2				valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto	Total	
ABORTO TARDIO	0-1	Contagem	12 _a	3 _a	0 _a	15
		% em TIMP2	63,2%	75,0%	0,0%	60,0%
	>1	Contagem	7 _a	1 _a	2 _a	10
		% em TIMP2	36,8%	25,0%	100,0%	40,0%
Total		Contagem	19	4	2	25
		% em TIMP2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de TIMP2 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Tabela 18 - Teste de independência entre o TIMP2 e o antecedente obstétrico de prematuridade (HCFMUSP 2013 - 2016)

		TIMP2			Total	valor p
		Normal	Heterozigoto	Homozigoto		
PREMATUROS	0-1	Contagem	18	3	2	23
		% em TIMP2	94,7%	75,0%	100,0%	92,0%
	>1	Contagem	1	1	0	2
		% em TIMP2	5,3%	25,0%	0,0%	8,0%
Total	Contagem	19	4	2	25	0,462
	% em TIMP2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher; cada letra do subscrito indica um subconjunto de TIMP2 categorias cujas proporções da coluna não diferem significativamente umas das outras no nível de 0,05, ou seja, letras iguais indicam que não há diferença entre as colunas.

Para o rs18004668 do gene TGFB, os heterozigotos associaram-se a 66,7% com o antecedente de 0-2 episódios de abortamento e em 33,3% ao histórico de >2 episódios. Para o histórico de aborto tardio, essa relação foi inversa. Para o histórico de prematuridade, a totalidade dos casos associou-se a 0-1 episódio e nenhum a >1 episódio. Não houve casos de homozigotos, nem associação estatisticamente significativa com esses achados e o histórico de abortos totais, abortos tardios e prematuridade conforme os dados das Tabelas 19 a 21.

Tabela 19 - Teste de independência entre o SNP TGF-B e o antecedente obstétrico de abortamento (HCFMUSP 2013 - 2016)

			TGF-B		Total	valor p
			Normal	Heterozigoto		
ABORTO	0-2	Contagem	16	2	18	0,999
		% em TGF-B	64,0%	66,7%	64,3%	
	>2	Contagem	9	1	10	
		% em TGF-B	36,0%	33,3%	35,7%	
Total	Contagem		25	3	28	
	% em TGF-B		100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher;

Tabela 20 - Teste de independência entre o SNP TGF-B e o antecedente obstétrico de abortamento tardio (HCFMUSP 2013 - 2016)

			TGF-B		Total	valor p
			Normal	Heterozigoto		
ABORTO TARDIO	0-1	Contagem	16	1	17	0,244
		% em TGF-B	64,0%	33,3%	60,7%	
	>1	Contagem	9	2	11	
		% em TGF-B	36,0%	66,7%	39,3%	
Total		Contagem	25	3	28	
		% em TGF-B	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher

Tabela 21 - Teste de independência entre o SNP TGF-B e o antecedente obstétrico de parto prematuro (HCFMUSP 2013 - 2016)

			TGF-B		Total	valor p
			Normal	Heterozigoto		
PREMATUROS	0-1	Contagem	23	3	26	0,999
		% em TGF-B	92,0%	100,0%	92,9%	
	>1	Contagem	2	0	2	
		% em TGF-B	8,0%	0,0%	7,1%	
Total		Contagem	25	3	28	
		% em TGF-B	100,0%	100,0%	100,0%	

*Teste exato de Fisher

Em anexo, estão apresentados os novos SNPs que foram identificados pelo sequenciamento de nova geração no grupo caso e suas respectivas frequências, conforme os dados da Tabela 23 (**Anexo B**).

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

O diagnóstico de incompetência cervical é feito de forma eminentemente clínica, e a história clássica necessariamente inclui a recorrência de um episódio de perda gestacional ou nascimento em prematuridade extrema, o que é muito desagradável e triste às mulheres acometidas. O diagnóstico da insuficiência cervical é notoriamente difícil de ser feito e é pautado em fatos retrospectivos ⁽⁹⁾. Assim, há necessidade da vivência desse episódio e, muitas vezes, a recorrência, para que se firme o diagnóstico e proponha-se a cerclagem apenas em uma futura gestação.

Diante desses critérios clínicos da perda gestacional e, muitas vezes, pela compreensível dificuldade em obter precisão nos dados do momento da perda, é razoável pensar em outros critérios ou marcadores que possam auxiliar no diagnóstico e, desta forma, excluir a necessidade de uma vivência negativa na história obstétrica de mulheres acometidas pela incompetência cervical, além de proporcionar mais adequada assistência e melhores resultados com o planejamento terapêutico da cerclagem.

A prevenção da prematuridade passa pela identificação de mulheres com maior risco nessa ocorrência. Entretanto, a prematuridade espontânea é descrita em até 70% dos casos sem causa aparente e não há outros marcadores genéticos ainda descritos para esse rastreamento. De forma

semelhante, quanto à incompetência cervical, em seu primeiro episódio, não há propedêutica descrita para evitar o desfecho da perda gestacional.

Alguns genes candidatos e seus SNPs já foram relatados em estudos com relação à prematuridade e incompetência cervical, mas ainda não há proposta para desenvolvimento de exame específico ou de genética personalizada, já que muitos SNPs variam de acordo com o tipo de população estudada e o processo como um todo é descrito, como heterogêneo e multifatorial.

Este estudo poderia ser realizado pela metodologia de *"real time PCR"*, como inicialmente proposta no projeto à FAPESP. No entanto, no andamento, surgiu a possibilidade de migrar para a técnica de sequenciamento de última geração. Na escolha por essa metodologia, vislumbramos a possibilidade de, além de estudar os SNPs escolhidos, descobrir novos SNPs. Isso foi observado em SNPs localizados nos cromossomos 2, 17 e 3, referentes aos genes COL4A3, COL1A1, e ao KLF15, sendo alguns inéditos, ainda sem identificação, e sem informação disponível na literatura e nos bancos de genética. Tais achados estão, de acordo com as vantagens desta metodologia, possibilitando não só a leitura das áreas de interesse, mas também das áreas vizinhas que, por vezes, se correlacionam funcionalmente. A possibilidade é real de uma estreita ligação desses achados aos SNPs alvo da pesquisa. É provável que estejam envolvidos nas mesmas funções e que esses novos SNPs também tenham relação com a prematuridade e a incompetência cervical, devendo ser alvos de investigações futuras.

A frequência dos SNPs alvos do estudo, descritos em nossa população e relatados na presente dissertação é inédita e nem todas as descrições foram de encontro com as descrições prévias já relatadas em outras populações ^(27, 33).

De acordo com os resultados obtidos, houve ocorrência de SNPs para diferentes genes, na forma heterozigota, tanto no grupo de casos como no grupo de controles, evidenciando que apenas a presença do SNP não foi suficiente para caracterização dos grupos de casos e controles, nem para a estratificação de risco para aborto, aborto tardio ou prematuridade.

No presente estudo, encontramos evidência de associação entre o SNP COL1A1 e a incompetência cervical. Por outro lado, a caracterização do SNP como homozigoto relacionou positivamente as formas homozigotas do COL1A1 ao grupo de casos, com nível de significância estatística. Esse achado também foi observado por Warren et al. em 2009, em estudo realizado com pacientes com incompetência cervical ⁽²⁷⁾.

Os SNPs avaliados nos genes candidatos COL4A3 e TIMP2 em sua forma homozigota apresentaram-se em números totais mais relacionados aos casos do que aos controles. A ocorrência de achados não significativos estatisticamente pode ser justificada pelo tamanho da amostra analisada ou pela discrepância em função do número de casos omissos na leitura.

Os achados em relação ao TGF-B evidenciaram uma maior frequência das formas selvagens, tanto no grupo casos como no grupo controles em desencontro com os relatos descritos na literatura e podem ser

justificados pelas diferenças populacionais e a frequência diferente dos SNPs na população estudada ^(14, 49). Tais achados podem identificar na incompetência cervical na população alvo do estudo uma maior relação com as alterações estruturais do colo uterino, provavelmente, provocadas pelas anormalidades do colágeno do que para as decorrentes da produção de TGF- β , que se relacionam mais ao processo inflamatório com a produção de interleucinas.

O estabelecimento das formas homozigotas T/T do SNP COL1A1 na população de pacientes com antecedente de incompetência caracterizou no presente estudo um marcador genético de interesse para o desenvolvimento de teste propedêutico, que auxilie no diagnóstico de incompetência cervical.

Não foi possível o estabelecimento de relação dos SNPs com a idade gestacional do parto, pois todas as pacientes incluídas no estudo realizaram a cerclagem programada na última gestação em função do histórico de incompetência, impossibilitando a avaliação desta variável no presente estudo. No entanto, com um número maior de casos onde seja possível obter-se uma quantidade de nascidos prematuros mesmo quando realizada a cerclagem, poderá ser estudada a relação entre os SNPs e o desfecho da gestação no futuro ⁽⁵⁰⁾.

Dessa forma, a associação foi feita em função do histórico das perdas gestacionais, com número de abortos, número de abortos tardios e prematuros, no grupo de pacientes com incompetência cervical.

Para o COL4A3, observamos uma associação positiva com o histórico de abortos totais e abortos tardios, provavelmente, relacionado às formas homozigotas. O TIMP 2 também se associou com o antecedente de abortamento tardio. Para os demais SNPs, mesmo aos achados que não foram estatisticamente significativos, observamos, nitidamente em relação ao histórico, maior número de casos homozigotos grupos com maior número de episódios.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

1. Houve associação entre o SNP rs25866490 do gene COL1A1 e o antecedente de incompetência cervical;
2. Houve maior número de casos homozigotos do SNP rs25866490 do gene COL1A1 no grupo com antecedente de incompetência cervical do que no grupo de gestações a termo;
3. Os SNPs rs18822435 do gene COL4A3 e rs 2277698 do gene TIMP2 associaram-se aos antecedentes obstétricos de abortamento e abortamento tardio no grupo com antecedente de incompetência cervical e houve maior incidência de homozigotos do SNPs rs18822435 do gene COL4A3 no grupo com antecedente de um ou mais abortamentos tardios; e
4. As formas homozigotas do SNP rs18822435 do gene COL4A3 e rs 2277698 do gene TIMP2 podem estar associadas à incompetência cervical, mas, para estes SNPs há necessidade de um maior número de casos para conclusão.

ANEXO A - Tabela 22 - Concentração de DNA e relação 260/280 obtidas por medida espectrofotométrica pelo Thermo Nanodrop 2000, das amostras de sangue total das pacientes com incompetência cervical e grupo controle

AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230	AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230
B10	504,6	1,87	2,16	A1	905,7	1,85	2,21
B12	1273,6	1,87	2,22	B1	1095,7	1,87	2,31
B16	673,6	1,83	2,09	C1	500	1,88	2,19
B18	510,7	1,86	2,12	D1	371,4	1,86	2,16
B20	597,8	1,84	2,08	A2	1090,5	1,88	2,24
B25	509,1	1,86	2,17	B2	2211,9	1,88	2,25
B26	423,9	1,87	2,15	C2	1791,8	1,91	2,31
B27	995,3	1,88	2,27	D2	450,7	1,87	2,26
B28	1220,6	1,88	2,25	A3	1053,4	1,87	2,24
B29	1007,4	1,86	2,25	B3	1195,7	1,86	2,22
B30	1082,9	1,87	2,25	C3	831,1	1,85	1,97
B31	860,5	1,87	2,25	D3	399	1,87	2,13
C10	1600,6	1,87	2,21	A4	1051,5	1,88	2,22
C12	1987,8	1,89	2,25	B4	1190,8	1,88	2,18
C16	1454,8	1,88	2,31	C4	1606	1,9	2,32
C18	1447,4	1,88	2,27	D4	1003,3	1,88	2,31
C20	1468,8	1,88	2,27	A5	1120,3	1,86	2,25
C25	1594,9	1,88	2,28	B5	1532,4	1,87	2,61
C26	1261,8	1,88	2,29	C5	2680	1,9	2,27
C27	1561,3	1,89	2,27	D5	474,7	1,88	2,17
C28	1554,3	1,89	2,28	A6	1115,5	1,86	1,94
C29	1353,8	1,89	2,27	B6	500,2	1,86	1,91
C30	1329,1	1,88	2,28	C6	1614,3	1,88	2,28
C31	1432,2	1,89	2,29	D6	444,4	1,88	2,2
B45	867,8	1,81	2,09	A7	1049,4	1,89	2,22
D12	717,7	1,85	1,92	B7	508,2	1,85	1,77
D16	780,4	1,85	2,19	C7	1632,6	1,9	2,27
D18	477,8	1,88	2,11	D7	508,7	1,87	2,02
D20	828,5	1,83	2,15	A8	1064,2	1,88	2,23
D25	358,4	1,88	2,12	B8	508,5	1,87	2,26
D26	1447,1	1,9	2,29	C8	1488,8	1,91	2,31
D27	1426,2	1,9	2,31	D8	1135	1,91	2,33
D28	1012,5	1,89	2,33	A9	539,8	1,88	2,17
D29	1169,3	1,88	2,3	B9	500,9	1,86	2,18
D30	1258	1,91	2,34	C9	550,9	1,85	1,57
D31	1063,6	1,9	2,33	D9	442,6	1,89	2,19
B32	1381,8	1,87	2,27	A45	566,3	1,87	1,97

continua

Tabela 22 - Concentração de DNA e relação 260/280 obtidas por medida espectrofotométrica pelo Thermo Nanodrop 2000, das amostras de sangue total das pacientes com incompetência cervical e grupo controle (continuação)

AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230	AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230
B33	629,5	1,86	2,19	B45	482,4	1,86	1,99
B34	546,7	1,86	2,1	C45	1459,2	1,92	2,31
B35	1320,7	1,88	2,28	D10	671,9	1,84	1,85
B36	1192,2	1,88	2,26	A46	589,6	1,86	1,98
B37	400,1	1,87	2,17	B46	1212,5	1,89	2,18
B38	481,8	1,87	2,1	C46	1556,7	1,9	2,22
B39	609	1,85	2,02	D46	1160,2	1,9	2,22
B40	1202,3	1,87	2,28	A47	629,7	1,87	2,14
B41	1217,2	1,87	2,23	B47	1188,3	1,89	2,33
B42	572,6	1,85	2,13	C47	1233,8	1,91	2,29
B43	1328	1,87	2,23	D47	1013,8	1,91	2,31
C32	1927	1,89	2,28	A53	1514,6	1,89	2,17
C33	1599,7	1,69	2,27	B53	1073,9	1,89	2,28
C34	1512,2	1,89	2,24	C53	972,4	1,91	2,32
C35	1173,3	1,88	2,3	D53	420,7	1,87	2,11
C36	1709,6	1,89	2,28	A57	1444,3	1,88	2,23
C37	1438	1,89	2,27	B57	1029,2	1,82	2,18
C38	1486,4	1,89	2,26	C57	964,6	1,9	2,3
C39	1487,4	1,89	2,26	D57	570	1,87	2,18
C40	1621	1,88	2,29	A60	1525,2	1,9	2,25
C41	1567,1	1,89	2,28	B60	1420,5	1,83	2,13
C42	1324,3	1,89	2,3	C60	843,4	1,89	2,31
C43	1578,2	1,89	2,26	D60	486,1	1,88	2,08
B23	1097,7	1,88	2,32	A61	510	1,88	2,04
D33	1154,2	1,89	2,32	B61	662,5	1,83	1,89
D34	501,3	1,87	2,08	C61	877,7	1,9	2,25
D35	1101,4	1,89	2,33	D61	503,2	1,83	1,37
D36	1180	1,89	2,28	A63	392,6	1,89	2,18
D37	1089,4	1,9	2,29	B63	633,7	1,83	1,66
D38	932,2	1,92	2,3	C63	801,4	1,85	2,11
D39	1211,9	1,89	2,32	D63	506,9	1,88	2,11
D40	1068,3	1,88	2,28	A65	399,3	1,88	1,69
D41	977,7	1,88	2,27	B65	779,8	1,8	1,9
D42	926,1	1,9	2,3	C65	965,4	1,89	2,1
D43	941,5	1,9	2,34	D65	596,6	1,86	2,07

continua

Tabela 22 - Concentração de DNA e relação 260/280 obtidas por medida espectrofotométrica pelo Thermo Nanodrop 2000, das amostras de sangue total das pacientes com incompetência cervical e grupo controle (continuação)

AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230	AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230
B44	1058,9	1,89	2,24	A14	1086,6	1,88	2,22
B48	725	1,82	2,03	B14	502,7	1,86	2,1
B49	1037,2	1,88	2,24	C14	1527,3	1,91	2,33
B50	655,2	1,84	2,09	D14	945,7	1,89	2,34
B51	1121,3	1,8	2,09	A17	1166	1,9	2,19
B52	990,9	1,8	2,2	B17	1336	1,91	2,25
B54	1131,8	1,81	2,18	C17	1506,6	1,91	2,29
B55	1069,2	1,8	2,17	D17	912,4	1,91	2,32
B56	1142,4	1,81	2,21	A19	1057	1,89	2,23
B58	1193,8	1,81	2,18	B19	1161,5	1,91	2,26
B59	808,1	1,76	2,06	C19	1341,4	1,91	2,29
B62	687,2	1,83	1,97	D19	1021,1	1,91	2,35
C44	1708,1	1,9	2,3	A21	1052,6	1,9	2,24
C48	1550,2	1,9	2,29	B21	1092,5	1,9	2,31
C49	1459	1,89	2,26	C21	1510,5	1,91	2,33
C50	1389,5	1,9	2,3	D21	1030,4	1,92	2,36
C51	522,2	1,88	2,05	A22	1043,2	1,84	1,9
C52	1105,5	1,9	2,24	B22	485,1	1,85	2,02
C54	1175	1,89	2,25	C22	1677,5	1,91	2,3
C55	1021,2	1,9	2,24	D22	969,5	1,9	2,35
C56	962,3	1,9	2,27	A23	1019,3	1,9	2,25
C58	1063,2	1,9	2,29	B23	1196,3	1,89	2,21
C59	911,3	1,89	2,24	C23	1493,9	1,91	2,33
C62	1036,6	1,89	2,29	D23	1125	1,91	2,36
B64	1030,6	1,29	2,29	A24	998,9	1,89	2,25
B66	696,2	1,83	2,03	B24	1148,8	1,89	2,37
B67	697,6	1,84	2,02	C24	1397,6	1,9	2,3
B68	680,5	1,83	2,08	D24	1057	1,9	2,34
B75	929,5	1,82	1,47	A13	1016,8	1,88	2,25
B76	1235,9	1,81	2,16	B13	489,6	1,86	2,15
B78	1029,9	1,8	2,14	C13	518,8	1,89	1,99
B83	1169	1,81	2,16	D13	390,9	1,87	2,04
B84	1125,9	1,81	2,19	A11	1094,3	1,89	2,26
B85	1138,5	1,82	2,17	B11	511,9	1,85	1,86
B86	1158,2	1,81	2,18	C11	1591,8	1,9	2,32
B87	1035,8	1,82	2,14	D11	340,4	1,88	2,11

continua

Tabela 22 - Concentração de DNA e relação 260/280 obtidas por medida espectrofotométrica pelo Thermo Nanodrop 2000, das amostras de sangue total das pacientes com incompetência cervical e grupo controle (conclusão)

AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230	AMOSTRA	ng/uL	260/280	260/230
C64	1137,1	1,9	2,28	A73	1215,8	1,83	1,79
C66	920,3	1,89	2,19	B73	899,5	1,91	2,31
C67	1019,7	1,88	2,16	C73	932,1	1,89	2,3
C68	1011,3	1,89	2,25	D73	827,4	1,89	2,22
C75	1134,2	1,88	2,24				
C76	885	1,88	2,24				
C78	1141,8	1,89	2,24				
C83	1084,3	1,89	2,23				
C84	999,3	1,89	2,25				
C85	1131,3	1,89	2,3				
C86	1168,8	1,89	2,2				
C87	1033,6	1,91	2,29				
D64	611	1,86	2,06				
D66	668,6	1,85	2				
D67	1387,7	1,88	2,13				
D68	1348,3	1,88	2,22				
D75	1390,6	1,88	2,26				
D76	1404,5	1,8	2,19				
D78	1370,9	1,87	2,18				
D83	1379,7	1,86	2,14				
D84	1515,5	1,88	2,2				
D85	1411,6	1,88	2,22				
D86	1212,9	1,88	2,17				
D87	1308,3	1,88	2,24				
B90	1309,1	1,83	2,17				
C90	1225,1	1,85	2,22				
C91	1257,3	1,88	2,11				
D90	1350,7	1,87	2,24				
D91	1344,4	1,88	2,23				
R60	1136,3	1,87	2,2				
R53	1137,8	1,86	2,13				
R57	1140,6	1,87	2,21				

ANEXO B - Tabela 23 - Taxa Frequência dos novos SNPs descritos no grupo de casos. SNPnovo1-COL4A3; SNPnovo2-COL4A3; SNPnovo3-COL4A3; SNPnovo4-COL1A1

SNPNOVO1	Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem cumulativa
0	24	85,7	96,0	96,0
1	1	3,6	4,0	100,0
Total	25	89,2	100	
Omisso	3	10,7		
Total	28	100,0		

SNPNOVO2	Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem cumulativa
0	10	35,7	40,0	40,0
1	9	32,1	36,0	76,0
2	5	17,9	20,0	96,0
3	1	3,6	4,0	100,0
Total	25	89,3	100,0	
Omisso	3	10,7		
Total	28	100,0		

SNPNOVO3	Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem cumulativa
0	8	28,6	33,3	33,3
1	16	57,1	66,7	100,0
Total	24	85,7	100,0	
Omisso	4	14,3		
Total	28	100,0		

SNPNOVO4	Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem cumulativa
1	3	10,7	11,1	11,1
2	24	85,7	88,9	100,0
Total	27	96,4	100,0	
Omisso	1	3,6		
Total	28	100,0		

10 Referências

10 REFERÊNCIAS

1. Harrison MS, Goldenberg RL. Global burden of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2016;21(2):74-9.
2. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014;345(6198):760-5.
3. Bittar RE, Zugaib M. [Risk predictors for preterm birth]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(4):203-9.
4. Pennell CE, Jacobsson B, Williams SM, Buus RM, Muglia LJ, Dolan SM, et al. Genetic epidemiologic studies of preterm birth: guidelines for research. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;196(2):107-18.
5. Simmons LE, Rubens CE, Darmstadt GL, Gravett MG. Preventing preterm birth and neonatal mortality: exploring the epidemiology, causes, and interventions. *Semin Perinatol.* 2010;34(6):408-15.
6. Norman JE. Preterm labour. Cervical function and prematurity. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21(5):791-806.
7. Iams JD, Cebrik D, Lynch C, Behrendt N, Das A. The rate of cervical change and the phenotype of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205(2):130.e1.
8. Ouzounian JG, Korst LM, Lee RH. Cervical length and delivery outcomes in patients with prophylactic cervical cerclage. *Am J Perinatol.* 2011;28(4):273-6.

9. Myking S, Myhre R, Gjessing HK, Morken NH, Sengpiel V, Williams SM, et al. Candidate gene analysis of spontaneous preterm delivery: new insights from re-analysis of a case-control study using case-parent triads and control-mother dyads. *BMC Med Genet*. 2011;12:174.
10. Moutquin JM. Classification and heterogeneity of preterm birth. *BJOG*. 2003;110 Suppl 20:30-3.
11. Bittar RE, Zugaib M. [Management of preterm labor]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(8):415-22.
12. Lotgering FK. Clinical aspects of cervical insufficiency. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2007;7 Suppl 1:S17.
13. Simcox R, Shennan A. Cervical cerclage: a review. *Int J Surg*. 2007;5(3):205-9.
14. Gynecologists ACoOa. ACOG Practice Bulletin No.142: Cerclage for the management of cervical insufficiency. *Obstet Gynecol*. 2014;123:372-9.
15. Simcox R, Shennan A. Cervical cerclage in the prevention of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007;21(5):831-42.
16. Brown R, Gagnon R, Delisle MF, Bujold E, Basso M, Bos H, et al. Cervical insufficiency and cervical cerclage. *J Obstet Gynaecol Can*. 2013;35(12):1115-27.
17. Tsai YL, Lin YH, Chong KM, Huang LW, Hwang JL, Seow KM. Effectiveness of double cervical cerclage in women with at least one previous pregnancy loss in the second trimester: a randomized controlled trial. *J Obstet Gynaecol Res*. 2009;35(4):666-71.

18. Berghella V, Roman A, Daskalakis C, Ness A, Baxter JK. Gestational age at cervical length measurement and incidence of preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2007;110(2 Pt 1):311-7.
19. Dolan SM. Genetic and environmental contributions to racial disparities in preterm birth. *Mt Sinai J Med.* 2010;77(2):160-5.
20. Menon R, Pearce B, Velez DR, Merialdi M, Williams SM, Fortunato SJ, et al. Racial disparity in pathophysiologic pathways of preterm birth based on genetic variants. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:62..
21. Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *BJOG.* 2005;112 Suppl 1:28-31.
22. Owen J, Mancuso M. Cervical cerclage for the prevention of preterm birth. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2012;39(1):25-33.
23. Poggi C, Giusti B, Gozzini E, Sereni A, Romagnuolo I, Kura A, et al. Genetic Contributions to the development of complications in preterm newborns. *PLoS One.* 2015;10(7):e0131741.
24. Speer EM, Gentile DA, Zeevi A, Pillage G, Huo D, Skoner DP. Role of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in spontaneous preterm delivery. *Hum Immunol.* 2006;67(11):915-23.
25. Macdonald R, Smith P, Vyas S. Cervical incompetence: the use of transvaginal sonography to provide an objective diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001;18(3):211-6.
26. Goffinet F. Primary predictors of preterm labour. *BJOG.* 2005;112 Suppl 1:38-47.

27. Warren JE, Silver RM. Genetics of the cervix in relation to preterm birth. *Semin Perinatol.* 2009;33(5):308-11.
28. Warren JE, Silver RM, Dalton J, Nelson LT, Branch DW, Porter TF. Collagen 1Alpha1 and transforming growth factor-beta polymorphisms in women with cervical insufficiency. *Obstet Gynecol.* 2007;110(3):619-24.
29. Hao K, Wang X, Niu T, Xu X, Li A, Chang W, et al. A candidate gene association study on preterm delivery: application of high-throughput genotyping technology and advanced statistical methods. *Hum Mol Genet.* 2004;13(7):683-91.
30. Vogel I, Goepfert AR, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Curry AH, et al. Early second-trimester inflammatory markers and short cervical length and the risk of recurrent preterm birth. *J Reprod Immunol.* 2007;75(2):133-40.
31. Secher NJ, McCormack CD, Weber T, Hein M, Helmig RB. Cervical occlusion in women with cervical insufficiency: protocol for a randomised, controlled trial with cerclage, with and without cervical occlusion. *BJOG.* 2007;114(5):649, e1-6.
32. Romero R, Espinoza J, Erez O, Hassan S. The role of cervical cerclage in obstetric practice: can the patient who could benefit from this procedure be identified? *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(1):1-9.
33. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(5):431 e1-34.
34. Anum EA, Springel EH, Shriver MD, Strauss JF. Genetic contributions to disparities in preterm birth. *Pediatr Res.* 2009;65(1):1-9.

35. Holst D, Garnier Y. Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;141:3-9.
36. Engel SA, Erichsen HC, Savitz DA, Thorp J, Chanock SJ, Olshan AF. Risk of spontaneous preterm birth is associated with common proinflammatory cytokine polymorphisms. *Epidemiology.* 2005;16:469-77.
37. Menon R, Fortunato SJ, Edwards DRV, Williams SM. Association of genetic variants, ethnicity and preterm birth with amniotic fluid cytokine concentrations. *Ann Hum Genet.* 2010;74(2):165-83.
38. Gonzalez JM, Romero R, Girardi G. Comparison of the mechanisms responsible for cervical remodeling in preterm and term labor. *J Reprod Immunol.* 2013;97(1):112-9.
39. de Carvalho MH, Bittar RE, Brizot MeL, Bicudo C, Zugaib M. Prediction of preterm delivery in the second trimester. *Obstet Gynecol.* 2005;105(3):532-6.
40. Bittar RE, da Fonseca EB, de Carvalho MH, Martinelli S, Zugaib M. Predicting preterm delivery in asymptomatic patients with prior preterm delivery by measurement of cervical length and phosphorylated insulin-like growth factor-binding protein-1. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29(5):562-7.
41. Abbott D, To M, Shennan A. Cervical cerclage: a review of current evidence. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2012;52(3):220-3.
42. Suhag A, Berghella V. Cervical cerclage. *Clin Obstet Gynecol.* 2014;57(3):557-67.

43. Velez DR, Fortunato SJ, Thorsen P, Lombardi SJ, Williams SM, Menon R. Preterm birth in Caucasians is associated with coagulation and inflammation pathway gene variants. *PLoS One*. 2008;3(9):e3283.
44. Velez DR, Menon R, Thorsen P, Jiang L, Simhan H, Morgan N, et al. Ethnic differences in interleukin 6 (IL-6) and IL6 receptor genes in spontaneous preterm birth and effects on amniotic fluid protein levels. *Ann Hum Genet*. 2007;71(Pt 5):586-600.
45. Parry S, Gomez L, Sammel MD, Appleby DH, Baldwin DA, Jeffcoat MK, et al. Hap-tag SNPs in genes that regulate the inflammatory response and bacterial vaginosis: evidence of gene-environment interactions associated with spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(6):10.
46. Menon R, Velez D, Morgan N, Lombardi S, Fortunato S, Williams S, et al. Genetic regulation of amniotic fluid TNF-alpha and soluble TNF receptor concentrations affected by race and preterm birth. *Hum Genet*. 2008;124(3):243-53.
47. Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Goncalves-Primo A, Daher S. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol*. 2009;80(1 2):115-21.
48. Velez DR, Fortunato SJ, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet*. 2008;17(11):1619-30.
49. Hao K, Xu X, Laird N, Wang XB, Xu XP. Power estimation of multiple SNP association test of case-control study and application. *Genet Epidemiol*. 2004;26(1):22-30.

50. Song JE, Lee KY, Kim MY, Jun HA. Cervical funneling after cerclage in cervical incompetence as a predictor of pregnancy outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(2):147-50.

Apêndice 1 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido -casos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº: APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº: APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : Associação entre fatores genéticos e risco aumentado para prematuridade em pacientes com antecedente de incompetência cervical

PESQUISADOR : Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado da Disciplina de Obstetrícia FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 80872

PESQUISADORES COLABORADORES: Ana Paula Vieira Dias Alves e Renata Moscolini Romão

UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Obstétrica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo investigar a presença de fatores genéticos , que chamamos de polimorfismos de nucleotídeo único , que podem estar relacionados com o risco do bebê nascer prematuro, ou seja, antes da hora. Estes fatores são pequenas alterações no seu código genético que chamamos de SNPS e podem ser identificados a partir de uma amostra de seu sangue. Mulheres que tem incompetência cervical e que foram submetidas a circlagem do colo do útero, tem maior chance do bebe nascer antes da hora. Com este estudo tentaremos identificar alterações genéticas para que possamos ajudar outras pacientes com a mesma doença a evitar perdas gestacionais e nascimento de crianças prematuras.
2. Estes fatores genéticos são pequenas alterações no DNA (seu código genético) chamadas SNPS que estão localizados em genes específicos (que são chamados de COL 1 A1 , COL 4 A 3 , TNF – B e IL6-R) e podem ser identificados a partir de uma amostra de sangue. O grupo de pacientes com histórico de incompetência cervical e que foram submetidas a circlagem do colo do útero, tem uma grande incidência de prematuridade. A partir deste estudo poderemos identificar o perfil genético destas pacientes e programar ações diagnósticas e terapêuticas no sentido de evitar perdas gestacionais e nascimento de crianças prematuras para outras pacientes que possuem a mesma patologia e ainda não possuem este diagnóstico clínico.
3. Para este estudo, estamos convidando pacientes com história de incompetência cervical ou que realizaram circlagem uterina (grupo de casos).
4. Em sua participação , você doará cerca de 5 ml de sangue por punção periférica em veia do antebraço. O seu sangue será analisado no Laboratório de Virologia do instituto de Medicina Tropical da USP (IMT USP) através de exames de biologia molecular.
5. Faz parte desta pesquisa uma entrevista detalhada sobre o histórico obstétrico que deve ter duração de aproximadamente 15 minutos e será realizada por pesquisadores envolvidos no projeto.
6. Os desconfortos e riscos incluem uma coleta de sangue com agulha da veia do braço. A coleta de sangue pode causar um pouco de desconforto na punção e às vezes pode causar dor, hematoma e inchaço temporário.
7. Ao participar desta pesquisa, você não terá nenhum benefício direto. No entanto, esperamos que este estudo traga informações importantes para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pré-natal para gestantes com antecedente clínico de perdas gestacionais para uma melhor programação de seguimento e se necessário programação de cirurgia precoce, evitando-se assim novas perdas gestacionais e o nascimento de crianças prematuras.
8. Como procedimentos alternativos, você pode optar em não participar da pesquisa, e faremos todos os exames que são necessários para o acompanhamento do seu caso.
9. A qualquer momento você tem acesso garantido aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas com o **Dr Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**, que pode ser encontrado na Clínica Obstétrica, 10º andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas, na Av Enéas de

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Carvalho Aguiar N 255, Telefone 2661 6380 ou com as pesquisadoras Ana Paula Vieira Dias Alves (tel:968423189) Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

10. Você pode retirar este consentimento e desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.
11. Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, seu nome e das demais pacientes não será divulgado em nenhuma publicação, e os dados serão utilizados exclusivamente para os fins científicos desta pesquisa.
12. Você poderá se manter atualizada sobre os resultados parciais desta pesquisa, podendo questionar a qualquer momento sobre as informações obtidas ou dos resultados que sejam do conhecimento do pesquisador.
13. Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há compensação financeira.
14. Garantimos que os dados e o material coletado serão utilizados somente com o objetivo de esclarecer as causas relacionadas à prematuridade. Entendo que estas causas podem estar relacionadas a hábitos de vida, história clínica, aos fatores ambientais, e também às alterações genéticas. Também entendi que as informações assim como o sangue poderá ser usado no futuro para esclarecimento das causas da prematuridade.
15. Em relação ao uso das informações e material coletado para pesquisas futuras fui questionado se gostaria de ser consultado para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas e minha resposta foi:

() SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

() NÃO. Eu dispensei a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

16. Fui também informada que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Associação entre fatores genéticos e risco aumentado para prematuridade em pacientes com antecedente de incompetência cervical”**. Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____
para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Apêndice 2 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido -controles

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA : **Associação entre fatores genéticos e risco aumentado para prematuridade em pacientes com antecedente de incompetência cervical**
- PESQUISADOR : Mário Henrique Burlacchini de Carvalho
CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado da disciplina de Obstetrícia FMUSP
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 80872
PESQUISADORES COLABORADORES: Ana Paula Vieira Dias Alves e Renata Moscolini Romão
UNIDADE DO HCFMUSP: Divisão de Clínica Obstétrica
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1. Estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo investigar a presença de fatores genéticos , que chamamos de polimorfismos de nucleotídeo único , que podem estar associados com o risco do bebê nascer prematuro, ou seja, antes da hora. Essa pesquisa será feita através da análise de uma amostra de sangue. Para isso, precisamos incluir também amostras de sangue de pacientes como você, que não possuem o histórico de prematuridade, para que o estudo possa ser comparativo.
2. Estes fatores genéticos são pequenas alterações no DNA (seu código genético) chamadas SNPS que estão localizados em genes específicos (que são chamados de COL 1 A1 , COL 4 A 3 , TNF – B e IL6-R) e podem ser identificados a partir de uma amostra de sangue. O grupo de pacientes com histórico de incompetência cervical e que foram submetidas a circlagem do colo do útero, tem uma grande incidência de prematuridade. A partir deste estudo poderemos identificar o perfil genético destas pacientes e programar ações diagnósticas e terapêuticas no sentido de evitar perdas gestacionais e nascimento de crianças prematuras para outras pacientes que possuem a mesma patologia e ainda não possuem este diagnóstico clínico.
3. Para este estudo, estamos convidando pacientes com história de incompetência cervical ou que realizaram circlagem uterina (grupo de casos) e também pacientes que tiveram pelo menos dois partos normais a termo para que a análise possa ser comparativa (grupo controle). Você está incluída no grupo controle, grupo de pacientes que não possui histórico de prematuridade.
4. Em sua participação , você doará cerca de 5 ml de sangue por punção periférica em veia do antebraço. O seu sangue será analisado no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT USP) através de exames de biologia molecular.
5. Faz parte desta pesquisa uma entrevista detalhada sobre o histórico obstétrico que deve ter duração de aproximadamente 15 minutos e será realizada por pesquisadores envolvidos no projeto.
6. Os desconfortos e riscos incluem os de uma coleta de sangue com agulha da veia do braço. A coleta de sangue pode causar um pouco de desconforto na punção e às vezes pode causar hematoma e inchaço temporário.
7. Ao participar desta pesquisa, você não terá nenhum benefício direto. Entretanto , esperamos que este estudo traga informações importantes para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pré-natal para gestantes com antecedente clínico de perdas gestacionais para uma melhor programação de seguimento e se necessário programação de cirurgia precoce, evitando-se assim novas perdas gestacionais e o nascimento de crianças prematuras.
8. Como procedimentos alternativos, você pode optar em não participar da pesquisa, e faremos todos os exames que são necessários para o acompanhamento do seu caso.
9. A qualquer momento você tem acesso garantido aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas com o Dr Mário Henrique Burlacchini de Carvalho, que pode ser encontrado na Clínica Obstétrica, 10º andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas, na Av Enéas de Carvalho Aguiar N 255, Telefone 26616380 ou com as pesquisadoras Ana Paula Vieira Dias Alves (tel:968423189) e Renata Moscolini Romão (tel: 980236926). Se você tiver alguma consideração ou dúvida

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

10. Você pode retirar este consentimento e desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição.
11. Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, seu nome e das demais pacientes não será divulgado em nenhuma publicação, e os dados serão utilizados exclusivamente para os fins científicos desta pesquisa.
12. Você poderá se manter atualizada sobre os resultados parciais desta pesquisa, podendo questionar a qualquer momento sobre as informações obtidas ou dos resultados que sejam do conhecimento do pesquisador.
13. Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há compensação financeira.
14. Garantimos que os dados e o material coletado serão utilizados somente com o objetivo de esclarecer as causas relacionadas à prematuridade. Entendo que estas causas podem estar relacionadas a hábitos de vida, história clínica, aos fatores ambientais, e também às alterações genéticas. Também entendi que as informações assim como o sangue poderá ser usado no futuro para esclarecimento das causas da prematuridade.
15. Em relação ao uso das informações e material coletado para pesquisas futuras fui questionado se gostaria de ser consultado para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas e minha resposta foi:

() **SIM.** Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

() **NÃO.** Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

16. Fui também informada que o tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "**Associação entre fatores genéticos e risco aumentado para prematuridade em pacientes com antecedente de incompetência cervical**". Eu discuti com o os pesquisadores sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____
para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

APÊNDICE 3 - Aprovação CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES GENÉTICOS E RISCO AUMENTADO DE PREMATURIDADE EM PACIENTES COM ANTECEDENTE DE INCOMPETÊNCIA CERVICAL

Pesquisador Responsável: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho **Versão:** 2

Pesquisador Executante: Ana Paula Vieira Dias Alves **CAAE:** 01186912.9.1001.0068

Co-autores: Renata Moscolini Romão, José Eduardo Levi, Marcelo Zugaib

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 8452

Número do Parecer: 202.060

Data da Relatoria: 20/02/2013

Apresentação do Projeto: Trata-se de pesquisa que pretende investigar a associação entre polimorfismos genéticos com o risco aumentado de prematuridade em mulheres com antecedente de incompetência cervical que foram submetidas a circlagem do colo uterino. A proposta é realizar estudo do tipo caso-controle, prospectivo, com mulheres que apresentam diagnóstico prévio de incompetência cervical e que foram submetidas a circlagem do colo uterino na sua última gestação, comparando com grupo controle. Foi estimado um N mínimo de 150 pacientes para resultados estatisticamente significativos, relacionando pelo menos um SNP para cada gene relacionado à prematuridade.

Os autores informam que um total de 300 pacientes não gestantes ou gestantes, serão avaliadas, sendo cerca de 150 casos e 150 controles, recrutadas para o estudo por meio de uma pré-seleção do banco de dados das pacientes em seguimento no Hospital das Clínicas da FMUSP do ambulatório de abortamento habitual. Os critérios de inclusão são bem definidos, inclusive, consta no projeto maior que os casos serão mulheres que foram submetidas a circlagem em gestação anterior ou atual. De cada sujeito será coletada amostra de 5 mL de sangue periférico para extração do DNA e investigação dos polimorfismos genéticos. Os autores informam que será criado um Banco de DNA com as amostras coletadas na pesquisa, e estas ficarão armazenadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP. Asseguram que todos os indivíduos terão acesso a seus dados genéticos, assim como terão direito de retirá-los do Banco de DNA a qualquer momento, e que os dados genéticos armazenados só poderão ser utilizados novamente com autorização prévia da Comissão de Ética, e que os sujeitos da pesquisa serão consultados sobre nova autorização para o uso de seu material em futuros projetos.

Objetivo da Pesquisa: Geral

Associar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados nos genes do COL1A1, COL 4A4, TGFb, TIMP2, IL-6-R ao risco aumentado de prematuridade no grupo de pacientes com antecedente de incompetência cervical que foram submetidas a circlagem do colo uterino.

Específicos

1. Comparar a frequência dos SNPs dos genes do COL 1 A1, COL 4 A4, TNF-b, TIMP2 e IL-6R nas pacientes com antecedente de incompetência cervical com pacientes com antecedente de gestação a termo.
2. Identificar a taxa de prematuridade relacionadas aos diversos SNPs dos genes do COL1A1, COL4A4, TGF-B, TIMP2 e IL-6R nas pacientes com antecedente de incompetência cervical e no grupo com antecedente de gestação de termo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos da pesquisa referem-se aos inconvenientes da coleta da amostra de sangue periférico, e da manutenção de material genético armazenado em bancos de DNA.

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Os benefícios incluem a possibilidade de detecção de características genéticas que favoreçam a ocorrência de parto prematuro e a possibilidade de aconselhamento da família.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Trata-se de pesquisa em tema relevante, pois a prematuridade é causa de morbimortalidade perinatal.

As inconsistências identificadas nos diversos documentos apresentados na Plataforma Brasil foram corrigidas e explicadas pelos pesquisadores, especificamente:

1. O tamanho da amostra será de 300 casos;
2. O projeto será prospectivo;
3. O TCLE do grupo controle foi elaborado, atende à resolução 196 e foi explanado como serão resultados;
4. A pesquisadora Renata Romão está incluída no projeto;
5. Foi elaborado o TCLEs que atendem à resolução 196, contemplando o armazenamento de amostras em biorepositório, bem como foi apresentado o seu regulamento;
6. Será oferecido aconselhamento às participantes, bem como o resultado de suas análises;
7. Não haverá dissociação irreversível dos dados;
8. O projeto será realizado apenas neste centro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os TCLEs apresentados estão adequados e atendem à resolução 196.

Recomendações: Pela aprovação do projeto

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovado

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 22 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar

CEP 05403-010 - São Paulo - SP.tnb

55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br