UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Associação entre os polimorfismos nos genes da Transcobalamina II (TCN2 c.776C>G e TC2 c. 67A>G) e da Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR c.677C>T) e o risco de ter abortos espontâneos recorrentes

Robson José Lázaro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2013

ROBSON JOSÉ LÁZARO

Associação entre os polimorfismos nos genes da Transcobalamina II (*TCN2* c.776C>G e *TC2* c. 67A>G) e da Metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR* c.677C>T) e o risco de ter abortos espontâneos recorrentes

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

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

L431a Lázaro, Robson José
Associação entre os polimorfismos nos genes da transcobalamina II (*TCN2 c.776C>G* e *TC2 c.67A>G*) e da metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR c.677C>T*) e o risco de ter abortos espontâneos recorrentes / Robson José Lázaro. -- São Paulo, 2013.
90p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Hematologia 2. Obstetricia 3. Biologia molecular 4. Bioquímica clínica : Medicina I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.15 CDD

Robson José Lázaro

Associação entre os polimorfismos nos genes da Transcobalamina II (*TCN2* c.776C>G e *TC2* c. 67A>G) e da Metilenotetraidrofolato redutase (*MTHFR* c.677C>T) e o risco de ter abortos espontâneos recorrentes.

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, _____ de 2013.

DEDICATÓRIA

Às mulheres acometidas de abortos recorrentes,
razão pela qual este estudo foi realizado.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome da sua diretora, Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo em nome de sua chefe, Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em nome de sua coordenadora Profa. Dra. Irene da Silva Soares.

À Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pela oportunidade e aprendizagem.

À equipe do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em nome Dr. Antonio Gomes de Amorim Filho e Dr. Mario Henrique Burlachini de Carvalho e, pelo auxílio e colaboração no recrutamento das mulheres do grupo de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão dos recursos financeiros para a execução deste projeto de pesquisa.

Aos professores Dr. Paulo Silveira, Dr. Rodolfo Delfini Cançado, Dra. Rosario Dominguez Crespo Hirata pelas correções e sugestões na minha banca de qualificação.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Centro de Hematologia de São Paulo, pelo apoio e colaboração.

À Dra. Nydia Strachman Bacal pela ajuda e incentivo.

Aos meus colegas de trabalho de Centro de Hematologia de São Paulo, pela ajuda, apoio e colaboração.

À todos do Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos meus amigos Kelma e Juliano pela ajuda e comprometimento.

À minha esposa Sheila Cristina que está ao meu lado, ajudando, orientando, apoiando e dando força para que eu siga em frente.

À minha mãe, irmãos e filhos pelo apoio, carinho e incentivo.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein

RESUMO

LÁZARO, R.J. **Associação entre os polimorfismos nos genes da Transcobalamina II (TCN2 c.776C>G e TC2 c. 67A>G) e da Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR c.677C>T) e o risco de ter abortos espontâneos recorrentes.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O aborto espontâneo recorrente (AER) é definido pela ocorrência de três ou mais abortos espontâneos consecutivos com idade gestacional de até 20 semanas. O AER é um evento multifatorial, tem um índice de elucidação da causa na ordem de 50% e, mesmo com os avanços da medicina diagnóstica ainda assim 40% dos casos permanecem com sua causa desconhecida. O crescimento fetal é totalmente dependente do aporte de nutrientes oriundos da mãe, dentre esses nutrientes a cobalamina e o ácido fólico desempenham um papel fundamental para a viabilidade fetal. O objetivo geral deste estudo foi investigar se existe associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da cobalamina (*MTHFR* c.677C>T, *TCN2* c. 776C>G e *TCN2* c. 67A>G), e o aborto espontâneo recorrente. Os objetivos específicos deste estudo foram: 1 determinar se os polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T, *TCN2* c. 776C>G e *TCN2* c. 67A>G estão associados ao aborto primário e secundário. 2 - Avaliar se os genótipos dos polimorfismos estudados estão relacionados com as concentrações séricas de cobalamina, folato e homocisteína total em mulheres com aborto espontâneo recorrente. Foram incluídas 256 mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes, provenientes do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e 264 mulheres saudáveis, sem história de aborto espontâneo e que tenham tido pelo menos duas gestações normais (grupo controle), pareadas segundo as idades. Foram colhidas amostras de sangue para a realização das dosagens bioquímicas, hormonais e das vitaminas e também para a realização das genotipagens dos polimorfismos por meio de PCR-RPFL (*MTHFR* c.677C>T, *TCN* c.776C>G e c. 67A>G). As dosagens bioquímicas e hormonais apresentaram resultados dentro dos limites de variação do normal. Quanto as concentrações de folato e cobalamina, houve diferença estatística significativa entre os grupos $p<0,05$. As frequências dos genótipos e alelos para os polimorfismos estudados comparadas entre os grupos abortos primário, aborto secundário e grupo controle não apresentaram diferença estatística significativa. Optamos a seguir por dividir o grupo de estudo entre abortos primários, onde não existe história de feto viável, e secundário neste caso onde há história de feto viável. Desta forma foram refeitas as análises estatísticas entre os grupos e encontramos diferença estatisticamente significativa $p<0,05$ quando confrontamos os genótipos do polimorfismo *TCN* c.776C>G entre o grupo primário e o grupo controle. Em conclusão, quando comparamos as frequência dos genótipos e alelos em conjunto não apresentaram associação com o AER. Quando comparado separadamente o grupo de aborto primário e grupo controle houve diferença estatística significativa associando o polimorfismo *TCN2* c.776C>G ao AER primário.

Palavras- chaves: aborto espontâneo recorrente, cobalamina, ácido fólico, transcobalamina, homocisteína.

ABSTRACT

LAZARO, RJ. **Association between polymorphisms in the transcobalamin II (TCN2 c.776C> G and c TC2. 67A> G) and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR c.677C> T) and the risk of having recurrent miscarriages.** Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

The recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined by the occurrence of three or more consecutive miscarriages with gestational age up to 20 weeks. The AER is a multifactorial event, has an index of elucidating the cause of around 50% and, even with advances in diagnostic medicine still remain 40% of cases with a known cause. Fetal growth is totally dependent on the supply of nutrients from the mother. Among these nutrients cobalamin and folic acid play a key role in fetal viability. The aim of this study was to investigate whether there is an association between polymorphisms in genes related to metabolism of cobalamin (MTHFR c.677C> T, c TCN2. 776c> G and c TCN2. 67A> G), and recurrent miscarriage. The specific objectives of this study were: 1 - determine whether MTHFR c. 677C> T, TCN2 c. 776c> G and c TCN2. 67A> G are associated with abortion primary and secondary. 2 - Assess whether the genotypes studied polymorphisms are associated with serum concentrations of cobalamin, folate and total homocysteine in women with recurrent spontaneous abortion. We included 256 women with a history of recurrent miscarriages, from the Clinic of Gynecology, Obstetrics, Hospital das Clinicas, Faculty of Medicine, USP and 264 healthy women with no history of miscarriage and have had at least two normal pregnancies (group control), matched according to age. Blood samples were collected to perform the biochemical, hormonal and vitamins and also to perform the genotyping of polymorphisms by PCR-RPFL (MTHFR c.677C> T, TCN c.776C> G and c. 67A> G). The biochemical and hormonal results presented within the limits of normal variation. As the concentrations of folate and cobalamin, statistically significant difference between groups $p < 0.05$. The frequencies of genotypes and alleles for the polymorphisms studied compared between groups abortions primary, secondary and abortion control group showed no statistically significant difference. We chose then to divide the study group between primary abortions where there is a history of viable fetus, and secondary in this case where there is a history of viable fetus. Thus were repeated statistical analyzes between groups and found statistically significant difference $p < 0.05$ when confronted TCN genotypes of polymorphism c.776C> G between the primary group and the control group. In conclusion, when comparing the frequency of genotypes and alleles together presented no association with AER. When compared separately the group of abortion primary and control group was statistically significant associated polymorphism TCN2 c.776C> G the primary AER.

Keywords: recurrent miscarriage, cobalamin, folate, transcobalamin, homocysteine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Química da Cobalamina	22
Figura 2	Absorção da cobalamina	24
Figura 3	Vias metabólicas da homocisteína e do ácido metilmalônico	26
Figura 4	Estrutura química do Ácido Fólico	28
Figura 5	Função da MTHFR	29
Figura 6	Eletroforese, em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição <i>Hinf</i> I para o polimorfismo <i>MTHFR</i> c. 677C>T após coloração com brometo de etídeo	40
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR digeridos pela enzima de restrição <i>Mva</i> I do polimorfismo <i>TCN2</i> c.776C>G (P259R), utilizando <i>GelRed</i> como corante fluorescente de ácidos nucleicos	41
Figura 8	Eletroforese em gel de agarose a 2%, dos produtos de PCR digeridos pela enzima de restrição <i>Rsa</i> I. do polimorfismo <i>TCN2</i> c. 67A>G (I23V) utilizando <i>GelRed</i> como corante fluorescente de ácidos nucleicos	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Frequências dos genótipos e alelos para o polimorfismo <i>MTHFR</i> c. 677C>T no grupo de gestantes e de acordo com grupos étnico	32
Tabela 2:	Distribuição dos genótipos da <i>TCN2</i> c. 776C>G segundo área geográfica e etnia	33
Tabela 3:	Características dos polimorfismos estudados	34
Tabela 4:	Características das mulheres dos grupos estudados	45
Tabela 5:	História reprodutiva das mulheres com AER	46
Tabela 6:	Dados bioquímicos, hormonais das mulheres com abortos primários, secundários e grupo controle	47
Tabela 7:	Frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C>T, <i>TCN2</i> c.776C>G e <i>TCN2</i> c.67A>G dos grupos aborto primário, secundário e controle	48
Tabela 8:	Concentrações de folato sérico e homocisteína total das mulheres com aborto primário, secundário e grupo controle segundo o genótipo para o polimorfismo <i>MTHFR</i> c.677C>T	49
Tabela 9:	Concentrações cobalamina e homocisteína total das mulheres com aborto primário, secundário e grupo controle segundo o genótipo para os polimorfismos <i>TCN2</i> c. 776C>G e c. 67A>G	50
Tabela 10:	Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>TCN2</i> c. 67A>G e c. 776C>G e <i>MTHFR</i> c. 677C>T entre mulheres com aborto primário e grupo controle	51
Tabela 11:	Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>TCN2</i> c. 67A>G e c. 776C>G e <i>MTHFR</i> c. 677C>T entre mulheres com aborto secundário e grupo controle	52
Tabela 12:	Frequências dos haplótipos para os polimorfismos <i>TCN2</i> c. 67A>G e c. 776C>T no gene <i>TCN2</i> em mulheres do grupo controle e do grupo com AER	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5,10-metenilTHF	5,10-meteniltetraidrofolato
5,10-metilenoTHF	5,10-metilenotetraidrofolato
5-metilTHF	5-metiltetraidrofolato
AA	Aminoacido
AdoCbl	Adenosilcobalamina
AER	Aborto espontâneo recorrente
AF	Ácido fólico
AG	Ácido graxo
ALT	Aspartato alanintransferase
ANOVA	Análise de variância
Apo-TC	Apotranscobalamina
AST	Aspartato aminotransferase
Cbl	Cobalamina
CEP	Comitê de Ética em pesquisa
CIST	Cistationina
CNCbl	Cianocobalamina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
dATP	deoxiadenisinatrifosfato
dCTP	deoxicitosinatrifosfato

DFTN	Defeitos de fechamento do tubo neural
dGTP	deoxiguanosinatrifosfato
DHF	Diidrofolato
D-MM-CoA	D-metilmalonil coenzima A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FI	Fator intrínseco
g	grama
HC	Haptocorrinas
HCl	Ácido clorídrico
Hcy	Homocisteína
Holo-TC	Holotranscobalamina
L	litro
L-MM-Coa	L-metilmalonil coenzima A
MeCbl	Metilcobalamina
MET	Metionina
mg	miligrama
mL	mililitro

MMA	Ácido Metil Malônico
MS	Metionina sintetase
MSR	Metionina sintase redutase
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
mA	miliampères
nm	nanometro
nmol	nanomol
OHcbl	Hidroxicobalamina
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
pmol	picomol
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> – restrição enzimática
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
Suc-CoA	Succinil coenzima A
T3	Triiodotironina

T4	Tiroxina
TBE	Tris-ácido-bórico-EDTA
TC	Transcobalamina
TCII	Transcobalamina II
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetraidrofolato
TSH	Hormônio estimulante da tireoide
U	unidades
V	Volts
μL	microlitro
μmol	micromol
α-CBT	α-cetobutirato

SUMÁRIO

1.	Introdução	20
1.1	Cobalamina	22
1.2	Metabolismo da Cobalamina	23
1.3	Ácido Fólico	27
1.4	Metabolismo do Ácido Fólico	29
1.5	Homocisteína	30
1.6	Associação entre polimorfismos nos genes MTHFR e TCN2 e abortos espontâneos recorrentes	31
2	Objetivos	35
2.1	Objetivo geral	35
2.2	Objetivos específicos	35
3	Material e método	36
3.1	Casuística	36
3.2	Critérios de inclusão e exclusão	36
3.3	Aspectos éticos	37
3.4	Amostras biológicas	37
3.5	Metodologia Laboratorial	38
3.5.1	Extração e avaliação do DNA genômico	38
3.5.2	Estudos Genéticos	39
3.5.2.1	Análise do polimorfismo <i>MTHFR</i> c.677C>T no gene MTHFR	39
3.5.2.2	Análise do polimorfismo <i>TCN2</i> c.776C>G no gene TCN2	41
3.5.2.3	Análise do polimorfismo <i>TCN2</i> c. 67A>G no gene TCN2	41
3.6	Análise Estatística	42
4.	Resultados	44

4.1	Características gerais das mulheres dos grupos estudados	44
4.2	Análises bioquímicas, dosagens de hormônios tireoideanos e vitaminas	46
4.3	Distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos	47
4.4	Influência do polimorfismo <i>MTHFR</i> c. 677C>T sobre as dosagens de folato e homocisteína total	48
4.5	Influência dos polimorfismos <i>TCN2</i> c. 776C>G e c. 67A>G sobre as dosagens de cobalamina e homocisteína Total	49
4.6	Distribuição dos genótipos e alelos para os polimorfismos c. 67A>G e c. 776C>G e <i>MTHFR</i> c. 677C>T entre abortos primário e grupo controle	51
4.7	Distribuição de genótipos e alelos para os polimorfismos <i>TCN2</i> c. 67A>G e c. 776C>G e <i>MTHFR</i> c. 677C>T entre mulheres com abortos secundário e grupo controle	52
4.8	Análise de haplótipos para os polimorfismos <i>TCN2</i> c. 67A>G e c. 776C>G no gene <i>TCN2</i>	53
5.	Discussão	55
6.	Conclusão	59
	Referências	60
	Anexos	69

1. INTRODUÇÃO

Aborto espontâneo é um evento comum que ocorre entre 10 a 15% das gestações clinicamente reconhecidas e afetam cerca de 2% das mulheres em idade fértil (Pena, 2003; Caetano, Couto *et al.*, 2006). O termo aborto espontâneo é utilizado para caracterizar o fim da gravidez antes da vigésima semana ou a expulsão do feto com menos de 0,5 kg (Christiansen, 2006; Zugaib, 2008).

O aborto espontâneo recorrente (AER) é caracterizado pela ocorrência de três ou mais abortos sucessivos espontâneos até a 20ª semana de gravidez (Jauniaux, Farquharson *et al.*, 2006; Saravelos e Li, 2012). A etiologia do aborto espontâneo foi relacionada a vários fatores, tais como: ambientais (fumo e uso de bebidas alcoólicas); anatômicos do útero; genéticos; imunológicos (presença de anticorpos autoimunes, anticorpos antifosfolípidos); alterações endócrinas; alterações cromossômicas; alterações relacionadas à hemostasia; e alterações no metabolismo do folato, cobalamina e homocisteína (Zetterberg, Coppola *et al.*, 2002; Jaslow, Carney *et al.*, 2010). A idade materna e o número de abortos prévios também são considerados fatores de risco (Christiansen, 2006). Estima-se que a ocorrência de AER está entre 2 a 4% em casais na idade reprodutiva (Jaslow, Carney *et al.*, 2010) e a possibilidade de que um novo aborto ocorra, aumenta de forma gradativa à medida que a mulher tem gestações subsequentes. Em mulheres com antecedentes de dois abortos sucessivos, a probabilidade de um terceiro varia de 17 a 35% e, em mulheres com história de três abortos, a probabilidade de um quarto evento varia entre 25 e 46% (Ren e Wang, 2006).

Estima-se que em 50% ou mais dos AER, não seja possível identificar as causas específicas por meio de histeroscopia e testes de detecção de anticorpos antifosfolípidos, sendo assim classificados como perdas fetais recorrentes inexplicadas (Ren e Wang, 2006; Saravelos e Li, 2012). Embora atualmente vários fatores estejam relacionados a etiologia dos AER e existam inúmeros exames disponíveis para a sua avaliação, ainda assim em aproximadamente 40% dos casos não é possível definir o que causou esses abortos, sendo que os mesmo são classificados como AER idiopáticos (Dzik, Pereira *et al.*, 2010).

Dentre os fatores genéticos relacionados com os abortos espontâneos e sua recorrência, as anomalias cromossômicas numéricas (trissomias, monossomias,

triploides), translocações e mosaicismos são responsáveis por 50 a 60% destes eventos no primeiro trimestre de gestação. Entre essas anomalias as numéricas são as mais frequentes: 50 a 60% de trissomias, 20 a 25% de poliploidias e 15 % de monossomias cromossômicas do cromossomo X. A ocorrência de um aborto espontâneo devido à trissomia no cariótipo fetal aumenta a chance de nova trissomia na próxima gestação em 80%, enquanto que um cariótipo normal no primeiro aborto reduz a chance de cromossomopatia em 50% na gravidez posterior. (Caetano, Couto *et al.*, 2006).

Fatores ambientais como a baixa concentração sérica de folato e cobalamina causados por deficiência de ingestão, bem como, fatores genéticos causados por mutações em genes de transportadores destas vitaminas, ou de enzimas importantes no metabolismo da homocisteína que por consequência acarretam aumento nas concentrações de homocisteína total (tHcy) e ácido metilmalônico (MMA) também tem sido associado ao aumento no risco de defeito no fechamento do tubo neural (Stanisławska-Sachadyn, Woodside *et al.*, 2010; Pepper e Black, 2011) e diminuição da viabilidade fetal (Zetterberg, 2004b).

Alguns nutrientes como a cobalamina (Cbl) e o ácido fólico (AF) são essenciais para o desenvolvimento fetal, pois estão envolvidos no metabolismo de aminoácidos, síntese de purinas e pirimidinas e também em um grande número de reações de metilação de ácidos nucleicos. (Forges, Monnier-Barbarino *et al.*, 2007; Pepper e Black, 2011).

As baixas concentrações séricas de Cbl e ácido fólico levam ao aumento das concentrações séricas de homocisteína total (tHcy). Esta elevação tem sido associada com doenças relacionadas ao envelhecimento, tais como distúrbios arterioscleróticos, tromboembolísticos, degenerativos e também com os primeiros eventos patológicos da vida (anormalidades do crescimento, defeitos do tubo neural), complicações na gravidez como pré-eclâmpsia, retardo no crescimento intrauterino, parto prematuro e óbito intra-útero (Forges, Monnier-Barbarino *et al.*, 2007), aborto espontâneo e descolamento placentário (Micle, Muresan *et al.*, 2012).

1.1 Cobalamina

A Cbl, um membro da família corrina, é um tetrapirrol planar com um átomo central de cobalto e um nucleotídeo, 5,6 dimetilbenzoimidazol. O núcleo corrina está ligado ao ribonucleotídeo por uma ligação éster-fosfato e por um ajuste perfeito a um dos nitrogênios do anel imidazólico com o cobalto (**Figura 1**).

A Cbl é sintetizada somente por microrganismos e obtida pelos seres humanos através da ingestão de alimentos e ou suplementos vitamínicos (Stanisławska-Sachadyn, Woodside *et al.*, 2010), as fontes de Cbl são os alimentos de origem animal (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013), como carne, fígado e vísceras (Cunningham, 2001.; Herrmann, Schorr *et al.*, 2003). Quatro cobalaminas são importantes no metabolismo da célula animal: cianocobalamina (CNCbl), hidroxicobalamina (OHCbl), adenosilcobalamina (AdoCbl) e metilcobalamina (MeCbl) (Donnelly, 2003). Devido sua natureza altamente polar a Cbl necessita de ligantes para seu transporte e disponibilização intracelular chamadas de transcobalaminas (Seetharam, 1999).

Figura 1 - Estrutura Química da Cobalamina. Fonte: adaptado de (Chanarin, 1979)

A cobalamina participa de duas vias metabólicas muito importantes no organismo humano: sendo a primeira via responsável pela remetilação da homocisteína à metionina mediada pela MeCbl, pela presença da enzima metionina sintase, tendo o 5-metiltetraidrofolato como doador do grupamento metil (Nielsen, Rasmussen *et al.*, 2012); e a segunda via responsável pela conversão de metilmalonil-CoA à succinil CoA mediada pela AdoCbl, pela ação da enzima L-metilmalonil-CoA mutase (Savage, Lindenbaum *et al.*, 1994; Von Castel-Dunwoody, Kauwell *et al.*, 2005; Nielsen, Rasmussen *et al.*, 2012).

O déficit de cobalamina está frequentemente associado a desordens neurológicas como, por exemplo, alterações motoras e desorientação que podem preceder a anemia megaloblástica (Adams, Khoury *et al.*, 1995; Bowen, Wong *et al.*, 2004). A deficiência de cbl durante a gestação pode acarretar graves problemas para o desenvolvimento fetal, uma vez que a cbl é um nutriente essencial na dieta da gestante, pois está intimamente relacionada com a divisão celular (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013), sendo que o déficit deste nutriente pode levar a um grave retardo na mielinização do sistema nervoso do feto (Löfblad, Ramelli *et al.*, 1997).

O requisito diário de cbl, denominado como ingestão diária recomendada é de 2,4 µg/dia (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013).

1.2 Metabolismo da cobalamina

Várias proteínas são essenciais na absorção e transporte da Cbl, tais como, a proteína R, o fator intrínseco (FI) e as transcobalaminas (TCI, TCII e TCIII). Após a ingestão de alimentos contendo Cbl, esta se liga à proteína R, que é sintetizada nas glândulas salivares, chega ao estômago em forma de complexo Cbl-proteína-R, o qual é resistente ao pH ácido estomacal. Somente quando esse complexo chega ao duodeno, o mesmo é clivado por meio da ação de enzimas pancreáticas, e assim resultando na liberação da Cbl. O FI, produzido pelas células parietais do estômago, liga-se à Cbl apenas no intestino, pois a proteína R tem maior afinidade pela Cbl do que o FI. A Cbl-FI é absorvida pelas células da mucosa do íleo via receptor para este complexo e, sequencialmente, liga-se às transcobalaminas e alcança a circulação sanguínea (**Figura 2**) (Seetharam, 1999).

Figura 2. Absorção da cobalamina. Fonte: Adaptado, com permissão, de (Andrès, Loukili et al., 2004 - Anexo 1).

No plasma, a cobalamina é transportada por duas proteínas: a transcobalamina II (TC II) e haptocorrinas (HC, TCI e TCIII). A TCII é uma proteína de 43 KDa que transfere a cobalamina do intestino para a corrente sanguínea e, em seguida, para todas as células do corpo. O gene que codifica a TC (TCN2) está localizado no braço longo do cromossomo 22 (q11-13.1), se estende por uma região de 18kb e tem 9 exons (Quadros, 2010). Ele é um gene polimórfico, sendo que já foram descritos mais de 10 polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism* – SNP). Um desses SNPs é o *TCN2* c.776C>G (rs1801198)

substituição que origina a mutação P259R e pode interferir na disponibilidade intracelular de cobalamina (Castro, Barroso *et al.*, 2010).

A transcobalamina saturada (TCII-Cbl), também chamada holotranscobalamina (Holo-TC), constitui entre 6% e 20% da cobalamina. A TC insaturada é chamada de apotranscobalamina (apoTC) sendo esta denominação utilizada para TCII na forma de proteína livre. A transcobalamina é sintetizada pelos enterócitos, no entanto, diversos outros órgãos podem sintetizar essa proteína. Já as haptocorrinas (HCs), TCI e TCIII, são sintetizadas em muitas células do corpo, inclusive leucócitos, e ligam-se a 80 – 94% da cobalamina presente no plasma. Ao contrário da TC, as HCs são glicoproteínas e são largamente saturadas com cobalamina. Entretanto, nenhuma de suas funções é conhecida (Okuda, 1999), além da sua capacidade de vincular metabolicamente formas inertes da cobalamina. A deficiência congênita de HC não está associada a sintomas aparentes ou distúrbios metabólicos. Ao contrário da deficiência congênita de TC, na qual os pacientes acometidos geralmente sofrem com manifestação neurológica grave, além do aumento significativo das concentrações de tHcy e ácido metilmalônico no soro e urina (Obeid, Morkbak *et al.*, 2006).

Após a absorção da Cbl pelas células, via receptor específico para o complexo TCII-Cbl, a vitamina é convertida nas formas co-enzimáticas (MeCbl e AdoCbl), conforme **Figura 3**.

Figura 3. Vias metabólicas da homocisteína e do ácido metilmalônico

Nota: SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; MET: metionina; HCY: homocisteína; MS: enzima metionina sintase; MSR: enzima metionina sintase redutase; MeCbl: metilcobalamina; THF: tetraidrofolato; 5-MeTHF: 5-metiltetraidrofolato; 5,10MTHF: 5-10 metilenotetraidrofolato; DHF: diidrofolato; CIST: cistationina; AA: aminoácido; AG: ácido graxo; α -CBT: α -cetobutirato; D-MM-CoA: D-metilmalonil coenzima A; L-MM-CoA: L-metilmalonil coenzima A; Suc-CoA: succinil coenzima A; dATP: deoxiadenosinatrifosfato; dGTP: deoxiguanosinatrifosfato; dCTP: deoxicitosinatrifosfato.

As deficiências na absorção de Cbl podem estar relacionadas com dieta inadequada (pobreza extrema e em indivíduos vegetarianos), deficiência de FI (congenita ou adquirida), presença de pancreatite crônica e alterações gastrointestinais. As alterações no transporte da Cbl podem estar associadas a polimorfismos no gene da TCII (Lievers, Afman *et al.*, 2002).

Na gestação também pode ocorrer deficiência de cobalamina, uma vez que durante esse período há o aumento da exigência de metionina para o crescimento fetal, hemodiluição devido à expansão do volume do plasma, alterações das funções endócrinas, o aumento da *clearance* renal de homocisteína e diminuição da albumina plasmática, a qual está vinculada a homocisteína. Dos mecanismos citados acima, as alterações endócrinas provavelmente são as principais razões para o declínio de Cbl observado na gravidez (Tamura e Picciano, 2006).

Na gestação a deficiência materna de Cbl pode acarretar em problemas de desenvolvimento fetal, sendo os defeitos de fechamento de tubo neural mais

frequente em mulheres que apresentaram deficiência de Cbl e /ou folato durante o período gestacional, mais especificamente nas primeiras semanas de gestação (Afman, Lievers *et al.*, 2002; Zetterberg, Coppola *et al.*, 2002).

A concentração sérica de Cbl não constitui um bom marcador para caracterizar a deficiência tecidual dessa vitamina, uma vez que os valores séricos podem estar normais, no entanto, pode haver deficiência tecidual de Cbl. Valores teciduais reduzidos de Cbl podem ser decorrentes de distúrbios na absorção, transporte e entrada dessa vitamina nas células (Afman, Van Der Put *et al.*, 2001). Essa situação pode ocorrer no início da deficiência dessa vitamina, podendo ser causada pela presença de mutações na proteína TCII, resultando em alterações na ligação com a mesma à Cbl; ou o impedimento do reconhecimento do receptor específico para Holo-TC (Lievers, Afman *et al.*, 2002).

Ao contrário da determinação plasmática de Cbl, a determinação da concentração plasmática de ácido metilmalônico (MMA) é considerado um bom marcador da deficiência tecidual de Cbl, uma vez que quando esse metabolito encontra-se elevado no plasma há deficiência de cobalamina nos tecidos (Moelby, Rasmussen *et al.*, 1990). Do mesmo modo, os valores elevados de tHcy estão associados à deficiência tecidual dessa vitamina, pois tais níveis antecedem o decréscimo dos valores de Cbl sérica, o que justifica o fato de os pacientes apresentarem alterações neurológicas antes do surgimento de anemia (Refsum, Yajnik *et al.*, 2001; Lindenbaum, Healton *et al.*, 1995).

Valores inferiores de holo-TC têm sido encontrados em indivíduos que possuem o alelo 776G em homozigose quando comparados com indivíduos que apresentam o alelo 776C em homozigose (Castro, Barroso *et al.*, 2010).

1.3 Ácido fólico

O ácido fólico é composto por um anel de pteridina, ácido p-aminobenzoico e ácido glutâmico (**Figura 4**). O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel que está presente naturalmente em alimentos como vegetais de folhas verdes: aspargos, brócolis, couve de Bruxelas, frutas cítricas, legumes, cereais secos, grãos inteiros, fermento, feijão, fígado e outras vísceras (Kim, 2007).

Os folatos naturais são geralmente reduzidos para tetraidrofolato com hidrogênio nas posições 5, 6, 7 e 8 ou diidrofolato com o hidrogênio nas posições 7 e 8, e eles têm uma única unidade de carbono (metil, metileno, formil, ou formino) com o N-5 ou n-10 posições, ou ambos (Tamura e Picciano, 2006).

Figura 4 - Estrutura Química do Ácido Fólico.

Fonte: <http://engenharianuclear.blogspot.com;2010/11/acido-folico-essencial-na-gravidez.html>

Folato é o termo que representa todas as estruturas de ácido fólico (Donnelly, 2003). O déficit desta vitamina na gestação foi relacionado à pré-eclâmpsia, descolamento prematuro da placenta e o aborto espontâneo (Alperin, Haggard *et al.*, 1969). Uma diminuição no status do folato está associado ao aumento das concentrações plasmáticas de homocisteína, sendo este aumento fator de risco para doenças cardiovasculares, além do fato de ter sido associado à demência e doença de Alzheimer (Wright, Dainty *et al.*, 2007). Na gestação o folato tem papel fundamental devido ao fato de ser, essencial para a duplicação e diferenciação celular, prevenção de defeitos do tubo neural, angiogênese, vasculogênese e metilação da homocisteína (Williams, Bulmer *et al.*, 2011). Estudos indicam que elevados níveis de homocisteína e baixas concentrações de folato são fatores de risco para AER (Nelen, Blom *et al.*, 2000).

1.4 Metabolismo do ácido fólico

O ácido fólico e a metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) estão envolvidos em vias bioquímicas complexas: metabolismo de aminoácidos, síntese de purina e pirimidina, proteínas e lipídios (Altmäe, Stavreus-Evers *et al.*, 2010), síntese de nucleotídeos, síntese de S-adenosil-metionina, remetilação da homocisteína em metionina, metilação do DNA, neurotransmissores e fosfolipídios. A remetilação da homocisteína a metionina é dependente da doação do grupo metil (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013), transferido pela metionina sintase (MTR), pela 5 metiltetraidrofolato, a metionina resultante será incorporada em vários peptídeos ou transformada por intermédio da metionina adenosiltransferase em S adenosilmetionina (SAM). O SAM é o doador universal de metila em um grande número de reações de metilação e, assim, desempenha um papel fundamental na função celular. Durante essas reações, as quais são catalisadas por metiltransferases específicas, o SAM tem um grupo metil removido para formar S-adenosylhomocysteine (SAH). Finalmente, SAH é hidrolisado em uma reação reversível em homocisteína. . A MTHFR tem papel fundamental nestas reações, pois ela realiza a redução do 5,10 metiletetraidrofolato a 5 metiltetraidrofolato (Forges, Monnier-Barbarino *et al.*, 2007). **Figura 5.**

Figura 5 – Função da MTHFR. **Fonte:** adaptada de: Brouns, 2008.

Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) catalisa a conversão de 5,10 metilenotetraidrofolato em 5 metiltetraidrofolato. DHF=diidrofolato; THF=tetraidrofolato; MTHFR=5,10-metilenotetraidrofolato redutase; MTRR=metionina sintase redutase; MTR=metionina sintase; TCN2=transcobalamina II.

A atividade normal da MTHFR pode ajudar a manter o pool de circulação de folato e metionina e, eventualmente, impedir o acúmulo de homocisteína (Botto e Yang, 2000), que é um conhecido fator de risco para trombose venosa e arterial (Nadir, Hoffman *et al.*, 2007). Baixas concentrações de folato no plasma foram associadas com o aumento do risco de abortos espontâneos precoces (George, Mills *et al.*, 2002).

A deficiência de folato e a diminuição na atividade da MTHFR podem provocar uma incorporação massiva de uracil no DNA humano, com o subsequente mecanismo de reparação, pode haver o risco de quebra cromossômica, tais quebras podem levar ao aumento do risco de câncer e deficiência cognitiva (Blount, Mack *et al.*, 1997; Fenech, 2001).

1.5 Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido relativamente simples contendo enxofre, homólogo da cisteína, a partir da qual difere apenas pela presença de um grupo metileno adjuvante (Lippi e Plebani, 2012). A homocisteína não pode ser considerada um nutriente tradicional uma vez que necessita ser sintetizado endogenamente a partir do precursor da metionina através de várias etapas, processo que compreende, principalmente, a remoção do grupo metil C terminal. O composto pode em seguida ser reconvertido em metionina ou convertido em cisteína por meio de processos catalisados pela metionina sintase ou homocisteína metiltransferase betaína em primeiro caso, ou em último caso pela cistationina β -sintase. O ácido fólico, piridoxina e cobalamina são essenciais para o ciclo metabólico da Hcy, desta forma a deficiência de uma dessas vitaminas está associada a vários graus de hiperhomocisteinemia (Lippi e Plebani, 2012). Polimorfismos genéticos envolvendo as enzimas metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR), metionina sintase (MS), metionina sintase redutase (MSR) e cistationina β -sintase (Cis β S), estão envolvidos com o aumento de concentrações séricas de Hcy. A hiperhomocisteinemia tem sido apontada como a causa de várias patologias, doenças cardiovasculares, coagulopatias, doenças neurodegenerativas, doença de Alzheimer, deficiência cognitiva e também complicações na gravidez (Lippi e Plebani, 2012). Também esta associada a defeitos do tubo neural, várias condições

caracterizadas por vasculopatia placentária, tais como pré-eclâmpsia e descolamento e também abortos recorrentes (Hague, 2003).

1.6 Associação entre polimorfismos nos genes MTHFR e TCN2 e abortos espontâneos recorrentes

O polimorfismo *MTHFR* c.677C>T (rs1801133) no gene MTHFR que ocorre no éxon 4, resulta em uma substituição de uma alanina por valina na posição 222 da proteína (A222V) e o resultado é numa variante termolábil (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013), que tem sua atividade reduzida de 35 a 70%, dependendo do genótipo, CT ou TT respectivamente, quando a ingestão de ácido fólico é limitada (Rodríguez-Guillén, Torres-Sánchez *et al.*, 2009). O genótipo TT para esse polimorfismo é encontrado em 10 a 20% da população europeia e está relacionado ao aumento do risco de defeitos de fechamento no tubo neural (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013). Além de estar associado com o aumento das concentrações de homocisteína (Engbersen, Franken *et al.*, 1995; Frosst, Blom *et al.*, 1995; Guerra-Shinohara, Morita *et al.*, 2007), sendo esse aumento mais predominante em indivíduos que tem baixa concentração de folato plasmático (Friso, Choi *et al.*, 2002; Russo, Friso *et al.*, 2003). Cerca de metade da população em geral leva pelo menos um alelo mutado e a frequência do genótipo homozigoto mutante varia de 1 a 20% dependendo da população (Zetterberg, 2004a). Entre os mexicanos a prevalência do genótipo 677TT esta entre 36 a 48% (Rodríguez-Guillén, Torres-Sánchez *et al.*, 2009).

Na população brasileira a frequência do alelo mutado (T) é de: 10% em caucasianos, 1,45% em afrodescendentes e 1,2% em indígenas (Arruda, Siqueira *et al.*, 1998). Foi descrito que mulheres portadoras de genótipos CT e CC para o polimorfismo *MTFHR* c.677C>T apresentaram menor risco de abortamento quando comparadas àquelas com genótipo TT (Mtiraoui, Zammiti *et al.*, 2006).

Em estudo brasileiro conduzido em gestantes, as frequências dos alelos e genótipos para o polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T pode ser observada na **tabela 1**(Barbosa, Stabler *et al.*, 2008).

Tabela 1. Frequências dos genótipos e alelos para o polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T no grupo de gestantes e de acordo com grupos étnicos.

Genótipos	Grupo total N (%)	Descendentes brancos	Afro descendentes	Descendentes asiáticos
CC	132 (48,0)	79 (49,7)	52 (46,9)	
CT	115 (41,8)	66 (41,5)	46 (41,4)	2 (100)
TT	28 (10,2)	14 (8,8)	13 (11,7)	
Alelo 677C	69,0	70,4	67,6	
Alelo 677T	31,0	29,6	32,4	

Fonte: Barbosa *et al* 2008.

O polimorfismo *TCN2* c.776C>G (rs 1801198) envolvendo o transportador Transcobalamina II, é resultado da mudança de um único nucleotídeo no exon 6, o que resulta na substituição de uma prolina no códon 259 por uma arginina C776G (Bowen, Wong *et al.*, 2004). Alguns estudos sugerem que este polimorfismo pode afetar a afinidade de ligação entre a TCII e a cobalamina e consequentemente a capacidade de transporte de cobalamina para os tecidos. A presença do alelo C desse polimorfismo também foi associada como sendo fator protetor no desenvolvimento do embrião devido à maior disponibilidade de cobalamina (Zetterberg, Coppola *et al.*, 2002).

Estima-se que 20% da população tenha o alelo variante G (Von Castel-Dunwoody, Kauwell *et al.*, 2005). Esse polimorfismo foi relacionado ao aumento do risco de mulheres apresentarem aborto espontâneo. (Zetterberg, Coppola *et al.*, 2002). A frequência desse polimorfismo é bastante variável dependendo de alguns fatores como: etnia, localização geográfica da população estudada entre outros. A **Tabela 2** apresenta a distribuição dos genótipos desse polimorfismo em algumas populações estudadas (Bowen, Wong *et al.*, 2004).

Tabela 2. Distribuição dos genótipos da *TCN2* c. 776C>G segundo área geográfica e etnia.

Área geográfica	Etnia	N	776CC n (%)	776CG n (%)	776GG n (%)
Togo	Afro-africanos	195	134 (68,7)	52 (26,7)	9 (4,6)
Bénin	Afro-africanos	214	142 (66,3)	68 (31,8)	4 (1,9)
Nova Iorque	Afro-Americanos	42	21(50,0)	14 (33,3)	7 (16,7)
Nordeste EUA	Afro-Americanos	51	19(37,3)	27 (52,9)	5 (9,8)
Marrocos	Árabes-Caucasianos	81	35(43,2)	32 (39,5)	14 (17,3)
França	Caucasianos	353	109(30,9)	174 (49,3)	70 (19,8)
Itália (Sicília)	Caucasianos	142	58 (40,8)	68 (47,9)	16 (11,3)
México	Hispanicos	239	102 (42,7)	95 (39,7)	42 (17,6)
China Central	Hans	167	34 (20,4)	63 (37,7)	70 (41,9)

Fonte: Bowen *et al* 2004.

Outro polimorfismo localizado no gene da transcobalamina II é o *TCN2* c.67A>G (rs9606756), este polimorfismo é resultado da troca, no exon 2, de uma valina por uma isoleucina na posição 23 da proteína (I23V). A frequência deste polimorfismo encontrada em holandeses saudáveis é de 13% (Afman, Lievers *et al.*, 2002). Em indivíduos cardiopatas ou com alterações vasculares, a presença do alelo A, foi associado com maiores valores de homocisteína total do que indivíduos com o alelo G (Lievers, Afman *et al.*, 2002).

A interação entre os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T e *TCN2* c.776C>G em fetos oriundos de abortos ocorridos entre 6^a e 20^a semanas de gestação, foi investigada em 2003, embriões com as combinações 677TT e 776GG ou 776CG tiveram maior risco de abortos espontâneos quando comparados a embriões que tinham apenas um desses genótipos (Zetterberg, Zafiropoulos *et al.*, 2003).

Devido a estes achados, faz-se necessária a realização de outros estudos que relacionem a interação entre polimorfismos *TCN2* c. 776C>G e 67A>G e *MTHFR* c. 677C>T em mulheres com história de abortos recorrentes.

A **tabela 3** mostra as características dos polimorfismos estudados.

Tabela 3. Características dos polimorfismos estudados.

Polimorfismo	Cromossomo	Posição do cromossomo	Nome do gene	Rs	Troca
<i>MTHFR 677C>T</i>	1	222	MTHFR	1801133	Citosina/Timina
<i>TCN2 776C>G</i>	22	776	TCN2	1801198	Valina /Isoleucina
TCN2 67A>G	22	23	TCN2	9606756	Prolina/Arginina

Fonte: Lievers, 2002

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar se existe associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo da cobalamina (*MTHFR* c.677C>T, *TCN2* c. 776C>G e *TCN2* c. 67A>G), e o aborto espontâneo recorrente.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar se os polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T, *TCN2* c. 776C>G e *TCN2* c. 67A>G estão associados ao aborto primário e secundário;
- Avaliar se os genótipos dos polimorfismos estudados estão relacionados com as concentrações séricas de cobalamina, folato e homocisteína total em mulheres com aborto espontâneo recorrente.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Casuística

Foram incluídas 257 mulheres não grávidas com história de AER, provenientes do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (grupo estudo). Essas mulheres foram classificadas em dois grupos: aborto primário e aborto secundário. Foram incluídas no grupo de aborto primário aquelas mulheres que tiveram 3 ou mais AER e nenhum feto viável; e no grupo de aborto secundário, as mulheres com 3 ou mais AER e pelo menos um feto viável. Também foram incluídas 264 mulheres não grávidas, que tiveram no mínimo duas gestações de termo e que não tinham história de aborto (grupo controle). Estas mulheres foram provenientes do Centro de Saúde Escola Butantã, Centro de Saúde do Rio Pequeno, funcionárias da Universidade de São Paulo e da comunidade (amigas de mulheres com história de AER).

Todas as mulheres foram informadas sobre os objetivos do estudo e consultadas sobre a vontade de participar. Sendo favoráveis, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 2: grupo de estudo e, Anexo 3: grupo controle). Em seguida, foi aplicado um questionário (Anexo 4) para cada mulher contendo as seguintes informações: idade, antecedentes obstétricos, cor da pele autodeclarada, uso de vitaminas (no momento da coleta ou no período gestacional), consumo de bebidas alcoólicas e fumo, e presença de algumas patologias (hipertensão arterial, hiper ou hipotireoidismo e diabetes *mellitus*). Neste estudo, não foi realizada avaliação do consumo alimentar.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no grupo de estudo, mulheres com três ou mais abortos espontâneos consecutivos e com idades até 45 anos. No grupo controle foram incluídas mulheres com idades pareadas com as mulheres do grupo estudo, com história de duas ou mais gestações normais cujos nascimentos dos bebês foram de termo (parto que ocorre no período de 37 a 42 semanas) e que não tenham tido

abortos, natimortos, episódios tromboembólicos e problemas obstétricos na gravidez.

Foram excluídas do presente estudo, em ambos os grupos, as mulheres grávidas; aquelas que estavam fazendo uso de medicamentos que possam interferir no ciclo folato como metotrexate, fenitoína, carbamazepina, trimetropina, pirimetamina, colestiramina, barbitúricos, difenilidantoína e sulfonamida durante o período da coleta; e as portadoras de neoplasias. Exclusivamente no grupo controle foram excluídas mulheres com hipertensão arterial, diabetes e problemas de tireóide. As mulheres que apresentavam uma dessas patologias listadas foram excluídas com o intuito de se obter um grupo controle aparentemente saudável.

3.3 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa – CEP (Anexo 5) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e da Secretaria de Saúde do Município de São Paulo, além da Comissão de Ética para Análise de Projetos do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo = CAPpesq (Anexo 6).

3.4 Amostras biológicas

Foram coletados 30 mL de sangue de cada mulher, por punção venosa, em jejum de no mínimo oito horas. O sangue coletado em tubos Vacutainer® com anticoagulante K₃EDTA (0,15 mg/mL, Becton Dickinson, USA) foi utilizado para análise genética e dosagem plasmática de tHcy. O sangue coletado em tubo Vacutainer® sem anticoagulante foi utilizado para dosagem de ácido fólico, cobalamina, aspartato aminotransferase (AST), aspartato alanintransferase (ALT), creatinina, glicose, hormônio estimulante da tireóide (TSH), triiodotironina (T3), tiroxina (T4).

Alíquotas de soro e plasma foram separadas até uma hora após a coleta e armazenadas em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados, os quais foram mantidos a -80°C até a realização das dosagens. As alíquotas para dosagem de folato e tHcy foram armazenadas ao abrigo da luz.

3.5 Metodologia Laboratorial

O folato sérico foi determinado pelo método microbiológico que utiliza cepas de *Lactobacillus casei* (O'broin e Kelleher, 1992).

As concentrações de Cbl sérica foram determinadas pelo método microbiológico que utiliza cepas de *Lactobacillus leishmannii* (Kelleher, Walshe *et al.*, 1987; Kelleher e Broin, 1991).

A dosagem plasmática da tHcy foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento Shimadzu (Nishinokyo-Kuwabara-cho, Kyoto, Japan) com detector de fluorescência de digitalização (385 nm de excitação, 515 nm de emissão) (Pfeiffer, Huff *et al.*, 1999).

As determinações séricas de glicose, ureia, creatinina, AST e ALT foram realizadas em sistema automatizado, utilizando *kits* de metodologia de química seca (Equipamento Vitros 250 J&J, Products Vitros Chemistry; Ortho-clinical Diagnostics High Wycombe UK, Johnson & Johnson Company). Para controle de qualidade interno, foram utilizados Verifier I e II; para controle externo, foram empregados reagentes da marca Controllab (provedor de ensaio de proficiência para a América Latina).

Os marcadores tireoidianos, T3, T4 e TSH foram dosados utilizando-se *kits* de quimioluminescência, de acordo com o manual do fabricante (*Johnson & Johnson; Products Vitros Immunodiagnostic; Ortoclinical Diagnostics High Wycombe UK*), em equipamento *Vitros EciQ J&J*. Para controle de qualidade interno, foram utilizados reagentes do próprio fabricante; os controles externos da *Controllab* (provedor de ensaio de proficiência para a América Latina).

3.5.1 Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos totais de sangue periférico, utilizando *QIAAMP DNA BLOOD MINI kit*, de acordo com o protocolo do fabricante (*PreAnalytix/Qiagen, Germany*).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada através de separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido

bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0) em cuba de eletroforese submersa (*Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA*). Foram aplicados 4 µL de DNA e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) e *GelRed* (*Biotium Inc, Hayward, CA, USA*) usado como corante fluorescente de ácidos nucleicos (Sambrook e Russel, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V e 60 mA, por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (*Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia*).

As bandas foram visualizadas sob luz UV, utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100 pb (Sambrook e Russel, 2001). A foto documentação do gel foi realizada pelo sistema de imagem MiniBis *Pro Bio-Imaging Systems* (Jerusalém, Israel). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro *Nanodrop ND-100* (*Nanodrop Technologies, Inc – USA*) a 260 nm, enquanto a pureza das amostras do DNA foi determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (Sambrook e Russel, 2001).

3.5.2 Estudos Genéticos

A região polimórfica de cada gene foi amplificada pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para amplificar o fragmento de interesse.

3.5.2.1 Análise do polimorfismo *MTHFR* c.677C>T no gene *MTHFR*

Para a detecção dos genótipos para o polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T foi utilizado iniciadores de reação propostos por Frosst *et al.*, 1995 (Frosst, Blom *et al.*, 1995). Foi utilizada a técnica da PCR-RFLP (Reação em Cadeia Polimerase-Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição). A amplificação da região de interesse foi feita em termociclador (*Eppendorf MastercyclerGradient*, Hamburgo, Alemanha). As condições para a PCR foram: 35 ciclos de desnaturação inicial à 96° C por 3 minutos, desnaturação a 95° C por um minuto, hibridização à 65° C durante um minuto e extensão a 72° C por um minuto e extensão final a 72° C por 7 minutos. O tamanho do fragmento gerado foi de 198 pb, sendo identificado por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE de 0,5 X (Tris-HCl a 45mM, H₂BO₃ 45 mM,

EDTA a 1 mM pH 8,0) por 30 minutos, a 100V, 60mA. Após a confirmação da amplificação o produto da PCR foi incubado a 37°C por 3 horas com a enzima de restrição *HinfI*. Após a restrição enzimática os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba de eletroforese submersa em TBE 0,5x (Tris-HCL a 45mM, ácido bórico a 45mM e EDTA a 1mM), aplicando o produto de restrição enzimática juntamente com o tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 0,30%) e *GelRed* (*Biotium Inc, Hayward, CA, USA*) utilizado como corante fluorescente de ácidos nucleicos, por 60 minutos, a 100V, 60mA. O genótipo ancestral (CC) apresenta um único fragmento de 198pb; o heterozigoto (CT) apresenta fragmentos com 198pb, 176pb e 22pb e o genótipo homozigoto mutado (TT) apresenta os fragmentos com 176pb e 22pb.

Como controle de qualidade para estas análises, foram feitas repetições de cerca de 10% das amostras, e também utilizamos amostras previamente genotipadas (Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010), estas amostras foram inseridas em cada uma das corridas eletroforéticas.

Figura 6. Eletroforese, em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição *HinfI* para o polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T após coloração com brometo de etídeo.

Genótipos: 1= CT; 2= TT; 3= CC; 4= CT; 5= CC; 6= CC; 7=CC; 8= marcador de tamanho de DNA de 50 pares de base.

3.5.2.2 Análise do polimorfismo *TCN2* c.776C>G no gene *TCN2*

A genotipagem deste polimorfismo foi realizada através da PCR-RFLP, otimizando a técnica descrita por Miller *et al.* 2002. Deste modo, modificamos o protocolo descrito com o objetivo de desenvolver uma estratégia para detecção deste polimorfismo, que utilize um sítio constitutivo como controle da restrição enzimática, a fim de evitar erros na determinação do genótipo. Para isso, foi proposto um novo conjunto de iniciadores, com o intuito de amplificar um segmento adjacente ao sítio polimórfico *TCN2* c. 776C>G e ao sítio constitutivo para a enzima de restrição *MvaI* (Barbosa, Stabler *et al.*, 2008).

Como controle de qualidade para estas análises, foram feitas repetições de cerca de 10% das amostras, e também utilizamos amostras previamente genotipadas (Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010), estas amostras foram inseridas em cada uma das corridas eletroforéticas.

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR digeridos pela enzima de restrição *MvaI* do polimorfismo *TCN2* c.776C>G (P259R), utilizando *GelRed* como corante fluorescente de ácidos nucleicos.

3.5.2.3 Análise do polimorfismo *TCN2* c. 67A>G no gene *TCN2*

A genotipagem deste polimorfismo foi realizada por PCR-RFLP através da otimização da técnica descrita por Lievers *et al.*, 2002 e Afman *et al.*, 2002 (Lievers, Afman *et al.*, 2002) (Afman, Lievers *et al.*, 2002), utilizando a enzima *RsaI* para restrição enzimática.

Como controle de qualidade para estas análises, foram feitas repetições de cerca de 10% das amostras, e também utilizamos como controle em cada corrida eletroforéticas, amostras com o genótipo conhecido, sendo essas mesmas oriundas de estudos prévios realizados pelo nosso grupo.

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose a 2%, dos produtos de PCR digeridos pela enzima de restrição *RsaI*. do polimorfismo *TCN2 c. 67A>G* (123V) utilizando GelRed como corante fluorescente de ácidos nucleicos

3.6 Análise Estatística

O banco de dados e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa computacional *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (número de abortos, etc...) e estatísticas descritivas (com medidas de posição e dispersão) das variáveis contínuas (idade, etc.).

A avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) nos grupos estudados foi realizada utilizando o Programa MS-DOS QBasic V.1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil).

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

Foram utilizadas variáveis contínuas expressas em média ($\pm$ desvio padrão). As frequências foram apresentadas em frequência absoluta e a relativa entre parênteses.

4. RESULTADOS

4.1 Características gerais das mulheres dos grupos estudados

Incluimos neste estudo um total de 520 mulheres sendo deste total 256 com AER (grupo estudo) e 264 saudáveis (grupo controle). As descrições das características dos grupos estudados estão apresentadas na **Tabela 4**. As mulheres do grupo estudo foram classificadas em dois grupos conforme a sua história reprodutiva, sendo 117 mulheres com aborto primário e 139 mulheres com aborto secundário.

Com relação à cor de pele autodeclarada pelas mulheres houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,022$). No grupo controle houve maior frequência de mulheres autodeclaradas brancas, enquanto que nas mulheres com história de AER houve um predomínio de mulheres negras e pardas (**Tabela 4**).

Os grupos de mulheres com aborto primário e aborto secundário foram diferentes entre si, com relação a idade ($p < 0,05$). Entretanto, a mediana das idades das mulheres do grupo controle foi semelhante à mediana das idades das mulheres com AER primário e secundário ($p > 0,05$).

A **Tabela 5** apresenta a história reprodutiva das mulheres do grupo com AER primário e secundário. A maioria das mulheres de ambos os grupos apresentavam 3 abortos (54,7% primário e 52,5% secundário), sendo que a maioria dos abortos tinha ocorrido no primeiro trimestre da gestação, ou seja, até 12^a semana, (66,9% primário e 57,6% secundário). Entretanto, não houve diferença com relação ao número de perdas e ao período em que essas perdas ocorreram entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 4. Características das mulheres dos grupos estudados. São Paulo, 2008-2011.

	GRUPOS			P valor
	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Controle n= 264	
Idade ^a	32,3 (31,1 – 33,4)	34,2 (33,2 – 35,2)	33,4 (32,7 – 34,1)	0,028
Cor da pele ^b				
Branca	52 (44,4)	56 (40,3)	144 (54,5)	0,022*
Negra	25 (21,4)	25 (18,0)	35 (13,3)	
Parda	39 (33,3)	57 (41,0)	80 (30,3)	
Amarela	1 (0,9)	0 (0,0)	5 (1,9)	
Índia	0 (0,0)	1 (0,7)	0 (0)	
Tabagista				
Sim	18 (15,4)	31 (22,3)	40 (15,2)	0.183
Uso de bebida alcoólica				
Sim	55 (47,0)	57 (41,0)	95 (36,0)	0, 121

^aAs variáveis contínuas foram expressas em média (IC 95%), ANOVA.

^bOs dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). Teste Qui-quadrado *

Tabela 5. História reprodutiva das mulheres com AER, São Paulo, 2008 – 2011.

Número consecutivos de perdas	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 117	P valor
3	64 (54,7)	73 (52,5)	0,429*
4	22 (18,8)	38 (27,3)	
5	19 (16,2)	18 (12,9)	
6	5 (4,2)	3 (2,2)	
7	3 (2,6)	3 (2,2)	
8	2 (1,7)	1 (0,7)	
9	1 (0,9)	1 (0,7)	
10	0	2 (1,4)	
13	1 (0,9)	0	
Período das perdas			
Até 12ª semana	79 (66,9)	80 (57,6)	0,122
Entre 13ª e 20ª semanas	39 (33,1)	59 (42,4)	
Total	118 (100)	139 (100)	

Frequências absolutas e relativas entre parêntese. Teste Qui-quadrado, * Teste *LikelihoodRatio*.

4.2 Análises bioquímicas, dosagens dos hormônios tireoideanos e vitaminas

Na **tabela 6** estão apresentadas as dosagens bioquímicas realizadas nas mulheres incluídas no estudo. Quando comparados os três grupos (aborto primário, secundário e grupo controle), foi observada diferença com relação as dosagens de folato, cobalamina, creatinina, ureia, T3, T4 e glicose sérica entre os três grupos ($p < 0,05$)

Tabela 6. Dados bioquímicos, hormonais das mulheres com abortos primários, secundários e grupo controle. São Paulo, 2008-2011.

Parâmetro analisado	Aborto primário	Aborto secundário	Grupo controle	P valor
Folato sérico (nmol/L)	52,0 (40,6 – 63,3)	38,1 (35,0 – 41,2)	31,8 (30,3 – 33,4)	< 0,001*
Cobalamina sérica (pmol/L)	456 (424 – 488)	441 (406– 475)	394 (372 – 415)	0,003*
Homocisteína total (µmol/L)	9,2 (8,9 – 9,6)	10,3 (9,1 – 11,6)	9,8 (9,3 – 10,3)	0,240*
AST (U/L)	25,9 (24,8 – 27,0)	25,9 (24,8 – 27,0)	25,0 (24,3 – 25,8)	0,077*
ALT (U/L)	25,4 (23,8 – 27,0)	27,8 (25,6 – 30,0)	28,2 (26,8 – 30,0)	0,307*
Creatinina (mg/dL)	0,7 (0,7 – 0,8)	0,7 (0,7 – 0,8)	0,7 (0,7 – 0,7)	0,044*
Glicemia em jejum (mg/dL)	89 (84 – 94)	84 (82 – 87)	85 (84 – 86) ^a	0,049*
TSH (mU/L)	2,7 (1,6 – 3,7)	1,9 (1,7 – 2,1)	2,3 (2,1 – 2,5)	0,201*
T3 (ng/mL)	1,4 (1,3 – 1,4)	1,2 (1,2 – 1,3)	1,3 (1,3 – 1,3)	0,001*
T4 (nmol/L)	102,9 (98,1–107,7)	96,1 (91,8 – 100,4)	95,6 (93,1 – 98,0)	0,015*
Ureia (mg/dL)	25,6 (24,4 – 26,8)	26,4 (25,3 – 27,5)	27,5 (26,7 – 28,3)	0,030*

Os valores correspondem às médias (IC 95%). ANOVA. AST: Aspartato amino transferase; ALT: Alanina amino transferase; TSH: hormônio estimulante da tireóide; T3: tiiodotironina; T4: tiroxina.

4.3 Distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos

Quando comparados os três grupos (aborto primário, secundário e controle) com relação à frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *TCN2* c.776C>G e *TCN2* c.67A>G, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). **Tabela 7.**

Tabela 7. Frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *TCN2* c.776C>G e *TCN2* c.67A>G dos grupos aborto primário, secundário e controle. São Paulo, 2008-2011.

Genótipos dos polimorfismos	Aborto Primário N = 117	Aborto Secundário N = 139	Controle N = 264	P valor
<i>MTHFR</i> c. 677C>T				
CC	60 (51,3)	70 (50.4)	127 (48,1)	0,454*
CT	45 (38,5)	62 (44.6)	111 (42,0)	
TT	12 (10,2)	7 (5.0)	26 (9,9)	
Frequência alélica				
Alelo C	70,5%	72.7%	69,1%	0,501
Alelo T	29,5%	27.3%	30,9%	
<i>TCN2</i> c.776C>G				
CC	43 (36,8)	56 (40,3)	102 (38,6)	0,166 *
CG	49 (41,9)	62 (44,6)	131 (49,6)	
GG	25 (21,4)	21 (15,1)	31 (11,7)	
Frequência alélica				
Alelo C	57,7%	62,6%	63,4%	0,309
Alelo G	42,3%	37,4%	36,6%	
<i>TCN2</i> c.67A>G				
AA	90 (76,9%)	104 (74,8%)	182 (69,9%)	0,517*
AG	25 (21,4%)	33(23,7%)	77 (29,2%)	
GG	02 (1,7%)	2 (1,4%)	05 (1,9%)	
Frequência alélica				
Alelo A	87,6%	86,7%	83,5%	0,253
Alelo G	12,4%	13,3%	16,5%	

Os dados apresentados correspondem ao número absoluto de mulheres e entre os parênteses a porcentagem relativa.*Qui-Quadrado.

4.4 Influência do polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T sobre as dosagens de folato e homocisteína total

As análises das concentrações séricas de folato e homocisteína total relacionadas ao polimorfismo *MTHFR* c.677C>T não mostrou diferença estatística significativa entre os três grupos (aborto primário, secundário e controle) ($p < 0,05$), porém houve diferença significativa intra grupos nas concentrações de tHcy e no grupo controle houve diferença também na concentração de folato apresentados na

Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações de folato sérico e homocisteína total das mulheres com aborto primário, secundário e grupo controle segundo o genótipo para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T. São Paulo, 2008-2011.

Polimorfismo	Aborto primário		Aborto secundário		Grupo controle	
	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μ mol/L)	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μ mol/L)	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μ mol/L)
<i>MTHFR</i> c.677C>T						
CC	61,9 (40,6 - 83,1) n= 60	8,9 (8,4 - 9,3) n= 60	40,4 (36,2 - 44,6) n= 70	9,1 (8,6 - 9,6) n=70	32,3 (30,1 - 34,5) n= 127	9,2 (8,8 - 9,6) n= 127
CT	43,0 (35,7 - 50,4) n= 45	9,3 (8,7 - 10,0) n= 45	37,1 (32,3 - 42,0) n= 62	10,4 (8,2 - 12,6) n= 60	32,9 (30,5 - 35,3) n= 111	9,8 (9,1 - 10,5) n= 111
TT	35,9 (20,6 - 51,2) n= 12	10,9 (9,4 - 12,4) n=12	23,2 (9,4 - 37,1) n= 7	22,1 (5,7 - 38,5) n= 7	24,8 (19,9 - 29,7) n= 26	12,9 (8,8 - 17,0) n= 26
ANOVA (p value)	0,196	0,005	0,055	<0,001	0,011	<0,001

Os dados são médias e desvio padrão (IC 95%). (teste ANOVA)

tHcy: homocisteína total

4.5 Influência dos polimorfismos *TCN2* c. 776C>G e c. 67A>G sobre as dosagens de cobalamina e homocisteína Total

As análises das concentrações séricas de cobalamina e homocisteína total, demonstraram que os genótipos dos polimorfismos *TCN2* c. 776C>G e c. 67A>G não estão associados à concentração dessas vitaminas no organismo dos três grupos (aborto primário, secundário e controle) $p>0,05$. **Tabela 9.**

Tabela 9. Concentrações cobalamina e homocisteína total das mulheres com aborto primário, secundário e grupo controle segundo o genótipo para os polimorfismos *TCN2 c. 776C>G* e *c. 67A>G*. São Paulo, 2008-2011.

Polimorfismo	Aborto primário		Aborto secundário		Grupo controle	
	Cobalamina (pg/mL)	tHcy (μ mol/L)	Cobalamina (pg/mL)	tHcy (μ mol/L)	Cobalamina (pg/mL)	tHcy (μ mol/L)
<i>TCN2 c.776C>G</i>						
CC	470 (392 - 549) n= 39	9,2 (8,5 - 9,8) n= 43	494 (426 - 563) n= 54	9,6 (8,6 – 10,7) n= 56	350 (308 - 393) n= 89	9,9 (8,7 – 11,0) n= 102
CG	495 (421 - 471) n=41	9,3 (8,7 – 9,8) n= 49	435 (387 - 483) n= 60	11,3 (8,7 – 14,0) n= 62	389 (345 - 434) n= 118	9,7 (9,1 - 10,3) n= 131
GG	517 (421 - 614) n= 23	9,3 (8,4 – 9,2) n= 25	425 (355 - 495) n= 18	9,2 (7,7 – 10,6) n= 21	356 (264 - 448) n= 25	10,0 (8,9- 11,2) n= 31
ANOVA (p valor)	0,705	0,955	0,376	0,441	0,662	0,974
<i>TCN2 c.67A>G</i>						
AA	500 (449 - 551) n= 79	9,2 (8,7 – 9,6) n= 90	445 (405 – 484) n= 98	10,0 (8,9 – 11,1) n= 104	370 (334 - 405) n= 155	9,7 (9,1 – 10,4) n= 182
AG	438 (333 - 542) n= 23	9,6 (8,7 - 10,5) n= 25	494 (404 - 585) n= 32	11,2 (7,2 – 15,4) n= 33	381 (328 - 435) n= 72	9,9 (8,9 – 11,0) n= 77
GG	(*) n=	8,9 (9,1 – 26,9) n=2	531 (167 - 1229) n= 2	8,8 (2,3 – 20,0) n= 2	259 (99 - 421) n= 5	10,6 (7,6- 13,6) n= 5
ANOVA (p value)	0,196	0,846	0,774	0,850	0,335	0,868

Os dados são médias e desvio padrão (IC 95%). (Teste ANOVA)

tHcy: homocisteína total

Foi excluído um caso do polimorfismo *TCN2 c.67A>G* genótipo GG para a concentração de cobalamina pelo motivo de falta de material para a repetição do ensaio

4.6 Distribuição dos genótipos e alelos para os polimorfismos c. 67A>G e c. 776C>G e *MTHFR* c. 677C>T entre abortos primário e grupo controle

Foram refeitas as análises estatísticas de distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos *TCN2* c. 67A>G e c. 776C>G e *MTHFR* c. 677C>T, entre mulheres com aborto primário e grupo controle, excluindo o grupo aborto secundário, e encontramos diferença estatística significativa $p < 0,005$, para o polimorfismo *TCN2* c.776C>G dados apresentados na **tabela 10**.

Tabela 10. Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos *TCN2* c. 67A>G e c. 776C>G e *MTHFR* c. 677C>T entre mulheres com aborto primário e grupo controle. São Paulo, 2008-2011.

Polimorfismos	Aborto primário	Grupo estudo	P valor *
<i>TCN2</i> c.67A>G	N = 117	N = 264	0,275
AA	90 (76,9)	182 (68,9)	
AG	25 (21,4)	77 (29,2)	
GG	2 (1,7)	5 (1,9)	
<u>Frequência alélica</u>			
Alelo A	87,6%	83,5%	0,157
Alelo G	12,4%	16,5%	
<i>TCN2</i> c.776C>G	N = 117	N = 264	0,045*
CC	43 (36,8)	102 (38,6)	
CG	49 (41,9)	131 (49,6)	
GG	25 (21,4)	31 (11,7)	
<u>Frequência alélica</u>			
Alelo P	57,7%	44,5%	0,146
Alelo R	42,3%	36,6%	
<i>MTHFR</i> c.677C>T	N = 117	N = 264	0,805
CC	60 (51,3)	127 (48,1)	
CT	45 (38,5)	111 (42,0)	
TT	12 (10,3)	26 (9,8)	
<u>Frequência alélica</u>			
Alelo C	70,5%	69,1%	0,733
Alelo T	29,5%	30,9%	

* Qui-quadrado

4.7 Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos *TCN2* c. 67A>G e c. 776C>G e *MTHFR* c. 677C>T entre mulheres com aborto secundário e grupo controle

Realizamos as análises estatísticas de distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos *TCN2* c. 67A>G e c. 776C>G e *MTHFR* c. 677C>T entre mulheres com aborto secundário e grupo controle excluindo o grupo aborto primário, apresentados na **tabela 11**, e não encontramos diferença estatística significativa entre os dois grupos (aborto secundário e grupo controle) $p>0,05$.

Tabela 11. Distribuição de genótipos e de alelos para os polimorfismos *TCN2* c. 67A>G e c. 776C>G e *MTHFR* c. 677C>T entre mulheres com aborto secundário e grupo controle. São Paulo, 2008 – 2011.

Polimorfismos	Aborto secundário	Grupo estudo	P valor *
<i>TCN2</i> c.67A>G	N = 139	N = 264	
AA	104 (74,8)	182 (68,9)	0,464
AG	33 (23,7)	77 (29,2)	
GG	2 (1,4)	5 (1,9)	
<u>Frequência alélica</u>			
Alelo A	86,7%	83,5%	0,259
Alelo G	13,3%	16,5%	
<i>TCN2</i> c.776C>G	N = 139	N = 264	
CC	56 (40,3)	102 (38,6)	0,511
CG	62 (44,6)	131 (49,6)	
GG	21 (15,1)	31 (11,7)	
<u>Frequência alélica</u>			
Alelo P	62,6%	44,5%	0,818
Alelo R	37,4%	36,6%	
<i>MTHFR</i> c.677C>T	N = 139	N = 264	
CC	70 (50,4)	127 (48,1)	0,245
CT	62 (44,6)	111 (42,0)	
TT	7 (5,0)	26 (9,8)	
<u>Frequência alélica</u>			
Alelo C	72,7%	69,1%	0,330
Alelo T	27,3%	30,9%	

*Qui-quadrado

4.8 Análise de haplótipos para os polimorfismos TCN2 c. 67A>G e c. 776C>G no gene TCN2

Como o Objetivo de avaliar o efeito da combinação dos alelos dos polimorfismos no gene TCN2, realizou-se a análise dos haplótipos através do programa computacional *Haploview* (Barrett, Fryet al., 2005; Barrett 2009). O estudo do desequilíbrio de ligação foi realizado por meio de cálculo do coeficiente D' de Lewontin (Lewontin, 1964). Este cálculo demonstrou que os polimorfismos TCN2 c.67A>G e c. 776C>G não encontravam-se em desequilíbrio de ligação (D'0,419) Tabela 12.

O haplótipo GC formado pelo alelo mutado do polimorfismo TCN2c. 67A>G e do alelo ancestral do polimorfismo TCN2 c. 776C>G, foi mais frequente nas mulheres do grupo controle (13,4%) do que nas mulheres com AER (9,4%) (p0,045). Desta forma sugerindo que possivelmente esse haplótipo exerça efeito protetor.

Tabela 12. Frequências dos haplótipos para os polimorfismos TCN2 c. 67A>G e c. 776C>T no gene TCN2 em mulheres do grupo controle e do grupo com AER. São Paulo, 2008 – 2011.

Haplótipos	TCN2 c.67A>G	TCN2 c.776C>G	AER	Controle	Total	P value
Haplótipo a (wildtype)	A	C	0,509	0,501	0,505	0,804
Haplótipo b	A	G	0,364	0,334	0,349	0,323
Haplótipo c	G	C	0,094	0,134	0,114	0,045
Haplótipo d	G	G	0,034	0,031	0,032	0,8136

5. DISCUSSÃO

O aborto espontâneo recorrente é um evento multifatorial que ocorre entre 0,4 a 3% em mulheres entre a faixa etária de 25 a 39 anos de idade, enquanto que na mesma faixa etária as perdas esporádicas ocorrem entre 12 a 25% respectivamente (Saravolos e Li, 2012). Com os avanços na área da medicina diagnóstica, é possível descobrir a causa dos AER em uma grande parcela das mulheres, porém mesmo com tais avanços, em cerca de 40% dos casos de AER não é possível chegar-se a uma conclusão diagnóstica (Dzik, Pereira *et al.*, 2010).

Na gestação, devido ao aumento na taxa de duplicação celular proveniente da formação da placenta, feto e aumento do volume sanguíneo, há um aumento nas exigências de nutrientes como a cobalamina e ácido fólico (Lee e Okam, 2011), uma vez que estes nutrientes estão intimamente envolvidos nos processos de síntese de DNA e divisão celular (Kirsch, Herrmann *et al.*, 2013). A baixa concentração sérica de cobalamina e ou folato tem sido associados à diminuição da viabilidade fetal, quer seja causada por, diminuição na ingestão, problemas na absorção e ou fatores genéticos que possam interferir na disponibilidade intracelular destas vitaminas e consequentemente causar um aumento nas concentrações séricas de tHcy (Zetterberg, 2004b). Polimorfismos nos genes da MTHFR e TCN2 têm sido associados ao aumento nas concentrações de tHcy e, portanto, na diminuição da viabilidade fetal e aos AER (Micle, Muresan *et al.*, 2012).

A combinação dos genótipos CT/CC e TT/CC para os polimorfismos *MTHFR* c. 677 C>T e c. 1298 A>C no gene *MTHFR*, encontradas em fetos oriundos de abortos espontâneos e não em neonatos, demonstraram que polimorfismos no gene *MTHFR* podem estar envolvidos com a diminuição da viabilidade fetal (Isotalo, Wells *et al.*, 2000). No estudo realizado em 2002 com fetos abortados, não foi observado a presença dessas combinações (Zetterberg, Coppola *et al.*, 2002). Uma justificativa, dada por Isotalo, para a divergência entre os dois estudos, foi de que os fetos abortados eram de idades gestacionais distintas, em seu estudo foram utilizados fetos abortados nas primeiras semanas e no estudo realizado por Zetterberg e colaboradores foram utilizados fetos abortados de até vinte semanas.

A interação entre os polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T e *TCN* c. 776C>G em produtos de abortos ocorridos entre a 6 e 20ª semanas de gestação, demonstrou que a ocorrência dos genótipos 677TT, 776 Gge 776CG aumenta o risco de aborto espontâneo quando comparadas aos fetos com apenas um desses genótipos (Zetterberg, Zafiropoulos *et al.*, 2003)..

Tendo em vista o trabalhos citados acima, o objetivo de nosso trabalho foi avaliar a associação entre os polimorfismos nos genes da metilenotetraidrofolato redutase MTFHR *MTHFR* c. 677C>T e Transcobalamina, *TCN2* c.776 C>G e c. 67A>G e os abortos espontâneos recorrentes.

Análise das dosagens bioquímicas, hormonais e vitaminas entre as mulheres do grupo controle e estudo

Com relação as dosagens bioquímicas, de os hormônios tireoideanos e vitaminas (cobalamina e folato) as análises estatísticas mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre as dosagens de glicose, ureia e creatinina $p<0,05$, entretanto vale a pena destacar que os valores médios encontrados estavam dentro dos limites de variação do normal (Association, 2011).

Dentre as dosagens dos hormônios tireoideanos, houve diferença estatisticamente significativa, com relação aos valores obtidos entre as mulheres dos grupos aborto primário, secundário e grupo controle. Entretanto os valores de referência para estes parâmetros laboratoriais também demonstraram que os resultados observados encontravam-se dentro dos limites de variação do normal (Baloch, Carayon *et al.*, 2003).

A realização das dosagens de hormônios tireoidianos em mulheres com AER é importante de ser realizada, haja vista que é sabido que patologias envolvendo a tireoide são fatores de risco para o AER (Christiansen, 2006).

Foi observado que as dosagens de, cobalamina e ácido fólico apresentaram diferença estatisticamente significante entre os grupos estudados. Mulheres do grupo controle apresentaram menores valores, quando comparadas aos outros dois grupos (abortos primários e secundários). No início do período gestacional existe um

aumento na demanda de nutrientes essenciais como a cobalamina e ácido fólico, pois há um aumento na taxa de duplicação celular para suprir a necessidade da formação da placenta e feto, desta forma existe recomendação de suplementação vitamínica em gestantes (Dunlap, Shelke *et al.*, 2011). A diferença nas concentrações de ácido fólico pode ter sua explicação diante do exposto, pois grande parte das mulheres do grupo de estudo fazia uso de ácido fólico, haja vista que estavam fazendo tratamento para viabilizar uma possível gestação.

Os achados laboratoriais referentes as concentrações de cobalamina encontrados em nosso estudo, onde mulheres do grupo controle apresentavam menores concentrações desta vitamina quando comparadas aos outros dois grupos, pode ser explicado devido ao fato de que existe um grande consumo desta vitamina durante a gestação para suprir as necessidades do desenvolvimento fetal, e como todas as mulheres, incluídas no grupo controle, tiveram no mínimo dois partos, supomos que esta seja uma explicação para este achado laboratorial.

Associação entre o polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T e o AER

O polimorfismo, *MTHFR* c. 677C>T no gene *MTHFR*, quando em homozigose TT pode interferir na atividade enzimática e ocasionar uma diminuição de até 70% em sua função, esta diminuição pode comprometer a conversão da homocisteína a metionina (Frosst, Blom *et al.*, 1995). A homocisteína em concentrações elevadas (hiperhomocisteinemia) é um fator de risco para várias patologias, cardiovasculares, coagulopatias, doenças neurodegenerativas, doença de Alzheimer, deficiência cognitiva e também complicações na gravidez (Lippi e Plebani, 2012). Em nosso estudo, a frequência do alelo 677T foi de 29,5% para o grupo aborto primário e 27,3% para o grupo aborto secundário, esta frequência é diferente da encontrada (Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009) 11,8% e semelhante às encontradas por (Barbosa, Stabler *et al.*, 2008) 31,0%, (Kim, Park *et al.*, 2011) 35,4% e (Huang, Tucker *et al.*, 2011) nos EUA, 34,8%. Não encontramos diferença estatística significativa ao compararmos o grupo de estudo com o grupo controle, sendo assim, neste estudo não encontramos associação entre o AER ao polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T semelhante aos trabalhos realizados por (Govindaiah, Naushad *et al.*,

2009) e (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008), porém divergente de (Rodríguez-Guillén, Torres-Sánchez *et al.*, 2009) que encontraram associação entre o genótipo 677TT e o AER.

Associação entre os polimorfismos *TCN c. 67A>G* e *c. 776C>G* e o AER

A frequência alelica relativa encontrada, nas mulheres com aborto primário e secundário, para o alelo 776G foi 42,3% e 37,4% respectivamente. Esse resultado é semelhante aos encontrados, em pacientes com infertilidade inexplicadas, 45,8%, (Altmäe, Stavreus-Evers *et al.*, 2010), 40,1%(Da Silva, Galbiatti *et al.*, 2012) e também ao encontrado por nosso grupo, 25,0%,(Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010) . A frequência relativa do alelo 67G no grupo de aborto primário e secundário foi 12,4 e 13,3 % respectivamente, resultado semelhante ao encontrado, 12,6%, (Lievers, Afman *et al.*, 2002) e em estudo no Brasil, 15,3% (Da Silva, Galbiatti *et al.*, 2012) e também por nosso grupo em 2010, 16,7%, (Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010).

Não encontramos diferença estatística significativa entre os grupos (aborto primário, secundário e grupo controle), para os polimorfismos *TCN c. 67A>G* e *c. 776C>G* no gene *TCN2* da transcobalamina, quando comparamos em conjuntos os três grupos $p>0,05$ assim como nosso grupo em 2010 (Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010)

Associação entre o polimorfismo *MTHFR c. 677C>T* e concentrações de Folato e Homocisteína Total

Em nosso estudo, não encontramos diferença estatística significativa entre as concentrações de Folato sérico e os genótipos CC, CT e TT nos grupos de abortos primário e secundário, contudo as mulheres com o genótipo TT, nos três grupos, apresentavam maiores valores na concentração de tHcy o que é condizente com a literatura(Laanpere, Altmäe *et al.*, 2011), pois como o polimorfismo resulta em uma variante termolabil que pode ter sua atividade comprometida em até 70% é esperado

que haja uma diminuição na conversão da homocisteína a metionina ocasionado um aumento nas concentrações da primeira (Frosst, Blom *et al.*, 1995)

No grupo controle, além da diferença nas concentrações de tHcy, também encontramos uma diminuição nas concentrações séricas de folato nas mulheres com genótipo TT, o que não foi observado nas mulheres dos grupos primário e secundário. A explicação para este achado pode estar no fato de que a maioria das mulheres dos grupos de aborto, seja ele primário ou secundário estavam seja suplementadas com ácido fólico. Nossos achados são semelhantes aos encontrados na literatura (Amouzou, Chabi *et al.*, 2004).

Associação entre os polimorfismos *TCN* c. 67A>G e c. 776C>G as concentrações de Cobalamina e Homocisteína Total

Não encontramos diferença estatística significativa entre as concentrações de Cobalamina e Homocisteína quando comparamos os diferentes genótipos (CC, CG e GG) $p>0,05$ para o polimorfismo c.776C>G, nossos resultados são diferentes do encontrados nos EUA (Adams, Khoury *et al.*, 1995), porém nossos achados são semelhantes quando comparados aos achados na Estônia (Laanpere, Altmäe *et al.*, 2011).

Associação entre os polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T, *TCN* c. 67A>G e c. 776C>G ao AER comparando abortos primários e grupo controle.

Quando comparamos os genótipos e alelos somente entre os grupos abortos primários e grupo controle, não encontramos diferença estatística significativa entre os dois grupos para os polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T e *TCN2* c. 67A>G, porém ao comparamos os grupos com relação ao polimorfismo *TCN2* c. 776C>C, encontramos diferença estatística significativa $p=0,045$.

6. CONCLUSÃO

Os polimorfismos *TCN2* *TCN* c. 67A>G e c. 776C>G , não foram relacionados com mudanças nas concentrações séricas com as concentrações séricas de cobalamina e homocisteína total.

O polimorfismo *MTHFR* c.677C>T , genótipo TT, esta associado à maiores concentrações de homocisteína total.

Os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T no gene *MTHFR* e o c.67A>G no gene *TCN2* não apresentaram associação com o risco de AER.

O polimorfismo *TCN2* c. 776C>G no gene *TCN2* pode contribuir como fator de risco para o AER.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. J. et al. Elevated midtrimester serum methylmalonic acid levels as a risk factor for neural tube defects. *Teratology*, v. 51, n. 5, p. 311-7, May 1995. ISSN 0040-3709. Disponível em: <

AFMAN, L. A. et al. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *Eur J Hum Genet*, v. 10, n. 7, p. 433-8, Jul 2002. ISSN 1018-4813.

AFMAN, L. A. et al. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *QJM*, v. 94, n. 3, p. 159-66, Mar 2001. ISSN 1460-2725.

ALPERIN, J. B.; HAGGARD, M. E.; MCGANITY, W. J. Folic acid, pregnancy, and abruptio placentae. *Am J Clin Nutr*, v. 22, n. 10, p. 1354-61, Oct 1969. ISSN 0002-9165.

ALTMÄE, S. et al. Variations in folate pathway genes are associated with unexplained female infertility. *Fertil Steril*, v. 94, n. 1, p. 130-7, Jun 2010. ISSN 1556-5653.

AMOUZOU, E. K. et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr*, v. 79, n. 4, p. 619-24, Apr 2004. ISSN 0002-9165.

ANDRÈS, E. et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ*, v. 171, n. 3, p. 251-9, Aug 2004. ISSN 0820-3946.

ARRUDA, V. R. et al. Prevalence of the mutation C677 --> T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet*, v. 78, n. 4, p. 332-5, Jul 1998. ISSN 0148-7299.

ASSOCIATION, A. D. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*, v. 34 Suppl 1, p. S11-61, Jan 2011. ISSN 1935-5548.

BALOGH, Z. et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid*, v. 13, n. 1, p. 3-126, Jan 2003. ISSN 1050-7256.

BARBOSA, P. R. et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr*, v. 62, n. 8, p. 1010-21, Aug 2008. ISSN 0954-3007.

BLOUNT, B. C. et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1997. ISSN 0027-8424.

BOTTO, L. D.; YANG, Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, v. 151, n. 9, p. 862-77, May 2000. ISSN 0002-9262.

BOWEN, R. A.; WONG, B. Y.; COLE, D. E. Population-based differences in frequency of the transcobalamin II Pro259Arg polymorphism. *Clin Biochem*, v. 37, n. 2, p. 128-33, Feb 2004. ISSN 0009-9120.

CAETANO, M. R. et al. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. *Sao Paulo Med J*, v. 124, n. 4, p. 181-5, Jul 2006. ISSN 1516-3180.

CARDONA, H. et al. [Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and homocysteine levels in women with recurrent pregnancy loss: a nutrigenetic perspective]. *Nutr Hosp*, v. 23, n. 3, p. 277-82, 2008 May-Jun 2008. ISSN 0212-1611.

CASTRO, R. et al. The TCN2 776CNG polymorphism correlates with vitamin B(12) cellular delivery in healthy adult populations. *Clin Biochem*, v. 43, n. 7-8, p. 645-9, May 2010. ISSN 1873-2933. CHANARIN, I. *The megaloblastic anaemias*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1979. ISBN 0632002466.

CHRISTIANSEN, O. B. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v. 18, n. 3, p. 304-12, Jun 2006. ISSN 1040-872X.

CUNNINGHAM, G., GANT, NF., LEVENO, KJ., GILSTRAP, LC., HAUTH, JC., WENSTROM, KD. *Willians Obstetrics*. 21. McGraw-Hill Medical Publishing Division., 2001.

DA SILVA, L. M. et al. MTHFD1 G1958A, BHMT G742A, TC2 C776G and TC2 A67G polymorphisms and head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep*, v. 39, n. 2, p. 887-93, Feb 2012. ISSN 1573-4978.

DONNELLY, J. D. Vitamins. In: KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J., *et al* (Ed.). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 4. St. Loius; London: Mosby, 2003. p.737-739.

DUNLAP, B. et al. Folic acid and human reproduction-ten important issues for clinicians. *J Exp Clin Assist Reprod*, v. 8, p. 2, 2011. ISSN 1743-1050.

DZIK, A. et al. *Tratado de Reprodução Assistida*. São Paulo - 1ª edição 2010.

ENGBERSEN, A. M. et al. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet*, v. 56, n. 1, p. 142-50, Jan 1995. ISSN 0002-9297..

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res*, v. 475, n. 1-2, p. 57-67, Apr 2001. ISSN 0027-5107.

FORGES, T. et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update*, v. 13, n. 3, p. 225-38, 2007 May-Jun 2007. ISSN 1355-4786.

FRISO, S. et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 8, p. 5606-11, Apr 2002. ISSN 0027-8424.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, v. 10, n. 1, p. 111-3, May 1995. ISSN 1061-4036.

GEORGE, L. et al. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. *JAMA*, v. 288, n. 15, p. 1867-73, Oct 2002. ISSN 0098-7484.

GOVINDAIAH, V. et al. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. Clin Biochem, v. 42, n. 4-5, p. 380-6, Mar 2009. ISSN 1873-2933.

GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. Metabolism, v. 56, n. 3, p. 339-47, Mar 2007. ISSN 0026-0495.

GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Increased MMA concentration and body mass index are associated with spontaneous abortion in Brazilian women: a pilot study. Clin Chim Acta, v. 411, n. 5-6, p. 423-7, Mar 2010. ISSN 1873-3492.

HAGUE, W. M. Homocysteine and pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, v. 17, n. 3, p. 459-69, Jun 2003. ISSN 1521-6934.

HERRMANN, W. et al. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. Am J Clin Nutr, v. 78, n. 1, p. 131-6, Jul 2003. ISSN 0002-9165.

HUANG, T. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase variants associated with hypertension and cardiovascular disease interact with dietary polyunsaturated fatty acids to modulate plasma homocysteine in puerto rican adults. J Nutr, v. 141, n. 4, p. 654-9, Apr 2011. ISSN 1541-6100.

ISOTALO, P. A.; WELLS, G. A.; DONNELLY, J. G. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet, v. 67, n. 4, p. 986-90, Oct 2000. ISSN 0002-9297.

JASLOW, C. R.; CARNEY, J. L.; KUTTEH, W. H. Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. Fertil Steril, v. 93, n. 4, p. 1234-43, Mar 2010. ISSN 1556-5653.

JAUNIAUX, E. et al. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. Hum Reprod, v. 21, n. 9, p. 2216-22, Sep 2006. ISSN 0268-1161.

KIM, S. Y. et al. Association between MTHFR 1298A>C polymorphism and spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy. Am J Reprod Immunol, v. 66, n. 4, p. 252-8, Oct 2011. ISSN 1600-0897.

critical review. Mol Nutr Food Res, v. 51, n. 3, p. 267-92, Mar 2007. ISSN 1613-4125.

KIRSCH, S. H.; HERRMANN, W.; OBEID, R. Genetic defects in folate and cobalamin pathways affecting the brain. Clin Chem Lab Med, v. 51, n. 1, p. 139-55, Jan 2013. ISSN 1434-6621.

LAANPERE, M. et al. Folate-metabolizing gene variants and pregnancy outcome of IVF. Reprod Biomed Online, v. 22, n. 6, p. 603-14, Jun 2011. ISSN 1472-6491.

LEE, A. I.; OKAM, M. M. Anemia in pregnancy. Hematol Oncol Clin North Am, v. 25, n. 2, p. 241-59, vii, Apr 2011. ISSN 1558-1977.

LIEVERS, K. J. et al. Polymorphisms in the transcobalamin gene: association with plasma homocysteine in healthy individuals and vascular disease patients. Clin Chem, v. 48, n. 9, p. 1383-9, Sep 2002. ISSN 0009-9147.

LINDENBAUM, J. et al. Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. 1988. Nutrition, v. 11, n. 2, p. 181; discussion 180, 182, 1995 Mar-Apr 1995. ISSN 0899-9007.

LIPPI, G.; PLEBANI, M. Hyperhomocysteinemia in health and disease: where we are now, and where do we go from here ? Clin Chem Lab Med, v. 50, n. 12, p. 2075-80, Dec 2012. ISSN 1434-6621.

LÖVBLAD, K. et al. Retardation of myelination due to dietary vitamin B12 deficiency: cranial MRI findings. Pediatr Radiol, v. 27, n. 2, p. 155-8, Feb 1997. ISSN 0301-0449.

MICLE, O. et al. The influence of homocysteine and oxidative stress on pregnancy outcome. J Med Life, v. 5, n. 1, p. 68-73, Feb 2012. ISSN 1844-3117.

MOELBY, L. et al. The relationship between clinically confirmed cobalamin deficiency and serum methylmalonic acid. J Intern Med, v. 228, n. 4, p. 373-8, Oct 1990. ISSN 0954-6820.

MTIRAUI, N. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction*, v. 131, n. 2, p. 395-401, Feb 2006. ISSN 1470-1626.

NADIR, Y.; HOFFMAN, R.; BRENNER, B. Association of homocysteine, vitamin B12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. *Ann Hematol*, v. 86, n. 1, p. 35-40, Jan 2007. ISSN 1432-0584.

NELEN, W. L. et al. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*, v. 74, n. 6, p. 1196-9, Dec 2000. ISSN 0015-0282.

NIELSEN, M. J. et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, v. 9, n. 6, p. 345-54, Jun 2012. ISSN 1759-5053.

OBEID, R. et al. The cobalamin-binding proteins transcobalamin and haptocorrin in maternal and cord blood sera at birth. *Clin Chem*, v. 52, n. 2, p. 263-9, Feb 2006. ISSN 0009-9147.

OKUDA, K. Discovery of vitamin B12 in the liver and its absorption factor in the stomach: a historical review. *J Gastroenterol Hepatol*, v. 14, n. 4, p. 301-8, Apr 1999. ISSN 0815-9319.

PENA, S. C., HBLM. CARVALHO, ERF. STURZENNEKER, R. Investigação Genética dos Abortamentos Espontâneos pelo DNA. Rev. Med, Minas Gerais, 2003. 13 (3): 164-73 p. 2003.

PEPPER, M. R.; BLACK, M. M. B12 in fetal development. *Semin Cell Dev Biol*, v. 22, n. 6, p. 619-23, Aug 2011. ISSN 1096-3634.

QUADROS, E. V. Advances in the understanding of cobalamin assimilation and metabolism. *Br J Haematol*, v. 148, n. 2, p. 195-204, Jan 2010. ISSN 1365-2141.

REFSUM, H. et al. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr*, v. 74, n. 2, p. 233-41, Aug 2001. ISSN 0002-9165

REN, A.; WANG, J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*, v. 86, n. 6, p. 1716-22, Dec 2006. ISSN 1556-5653.

RODRÍGUEZ-GUILLÉN, M. E. R. et al. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Publica Mex*, v. 51, n. 1, p. 19-25, 2009 Jan-Feb 2009. ISSN 1606-7916.

RUSO, G. T. et al. Age and gender affect the relation between methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype and fasting plasma homocysteine concentrations in the Framingham Offspring Study Cohort. *J Nutr*, v. 133, n. 11, p. 3416-21, Nov 2003. ISSN 0022-3166.

SARAVELOS, S. H.; LI, T. C. Unexplained recurrent miscarriage: how can we explain it? *Hum Reprod*, v. 27, n. 7, p. 1882-6, Jul 2012. ISSN 1460-2350.

SAVAGE, D. G. et al. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med*, v. 96, n. 3, p. 239-46, Mar 1994. ISSN 0002-9343.

SEETHARAM, B. Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B12). *Annu Rev Nutr*, v. 19, p. 173-95, 1999. ISSN 0199-9885.

STANISŁAWSKA-SACHADYN, A. et al. The transcobalamin (TCN2) 776C>G polymorphism affects homocysteine concentrations among subjects with low vitamin B(12) status. *Eur J Clin Nutr*, v. 64, n. 11, p. 1338-43, Nov 2010. ISSN 1476-5640.

TAMURA, T.; PICCIANO, M. F. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*, v. 83, n. 5, p. 993-1016, May 2006. ISSN 0002-9165.

VON CASTEL-DUNWOODY, K. M. et al. Transcobalamin 776C->G polymorphism negatively affects vitamin B-12 metabolism. *Am J Clin Nutr*, v. 81, n. 6, p. 1436-41, Jun 2005. ISSN 0002-9165.

WILLIAMS, P. J. et al. Possible roles for folic acid in the regulation of trophoblast invasion and placental development in normal early human pregnancy. *Biol Reprod*, v. 84, n. 6, p. 1148-53, Jun 2011. ISSN 1529-7268.

WILLIAMS, Z. Inducing tolerance to pregnancy. *N Engl J Med*, v. 367, n. 12, p. 1159-61, Sep 2012. ISSN 1533-4406.

WRIGHT, A. J.; DAINTY, J. R.; FINGLAS, P. M. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. *Br J Nutr*, v. 98, n. 4, p. 667-75, Oct 2007. ISSN 0007-1145.

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. Reprod Biol Endocrinol, v. 2, p. 7, Feb 2004a. ISSN 1477-7827.

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. Reprod Biol Endocrinol, v. 2, p. 7, Feb 2004b. ISSN 1477-7827.

ZETTERBERG, H. et al. No association between the MTHFR A1298C and transcobalamin C776G genetic polymorphisms and hyperhomocysteinemia in thrombotic disease. Thromb Res, v. 108, n. 2-3, p. 127-31, Nov 2002. ISSN 0049-3848.

ZETTERBERG, H. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. Hum Reprod, v. 18, n. 9, p. 1948-50, Sep 2003. ISSN 0268-1161.

ZUGAIB, M. Zugaib Obstetrícia. São Paulo: Manole, 2008. 267,535.

ANEXOS

Anexo 1 – Permissão do Autor para utilização da Figura 2

De: Access Copyright Permissions Group [mailto:LicensingAdmin@accesscopyright.ca]

Enviada em: terça-feira, 16 de abril de 2013 11:42

Para: 'Robson Jose'

Assunto: RE: Request permission to reuse

Robson Jose,

Students wishing to use CMA material in a thesis/dissertation can do so at no charge as long as your thesis does not become commercially available for purchase. If you are planning on having your thesis published please let me know and I can issue you the appropriate price quote.

The following adaptation statement must accompany any CMA material used in your thesis:

Permission for adaptation is granted by the copyright owner provided it is true to the original meaning of the material. No further permission on the adapted material is allowed without permission from the Canadian Medical Association or Access Copyright. The Canadian Medical Association and the authors of the original work are not responsible for the adaptation and do not necessarily endorse the accuracy or quality of the adaptation.

Kind regards and good-luck with your thesis,

Jessica

Jessica Luet, MLIS

Research Specialist

Access Copyright, The Canadian Copyright Licensing Agency

One Yonge Street, Suite 800

Toronto, ON M5E 1E5

T.(416) 868-1620 x224

TF: 1-800-893-5777

jluet@accesscopyright.ca

www.accesscopyright.ca

Follow Us on Twitter Today!

This message, including any attachments, may contain confidential and proprietary information. If you are not the intended recipient of this message, or have otherwise received this message in error, please notify us immediately by return e-mail and be advised that the use, disclosure or copying of any portion of this message is unauthorized and may be unlawful. Please permanently delete the original message, including any attachments, without making a copy.

Ce message et toutes les pièces jointes sont confidentiels et établis à l'intention exclusive de ses destinataires. Si ce message ne vous est pas destiné, ou si vous avez reçu ce message par erreur, veuillez le mentionner immédiatement à l'expéditeur et effacer ce courriel, ainsi que toutes les pièces jointes. Toute utilisation, diffusion ou reproduction non autorisée est interdite.

From: Robson Jose [<mailto:rjlazaro@chsp.org.br>]

Sent: Monday, April 15, 2013 3:50 PM

To: Access Copyright Permissions Group

Subject: RES: Request permission to reuse

Excuse me,

As I said before, I am a graduate student, University of São Paulo. I need the figures to fit them to my thesis.

Title "Association between polymorphisms in the transcobalamin II (TCN2 c.776C> G and c TC2. 67A> G) and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR c.677C> T) and the risk of having recurrent miscarriages.

The article, which I refer is the following:

Vitamin B12 (cobalamin) in elderly patients

the figures are on pages 252 and 254

Figure 1 and figures A and B respectively

Kind regards,

Centro de Hematologia de São Paulo
Robson Lázaro - hematologia
Fone: 11 - 3372-6600 begin_of_the_skype_highlighting 11 - 3372-6600
end_of_the_skype_highlighting
Fax.: 11 - 3284-2575
www.chsp.org.br

Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo de estudo

Projeto de Pesquisa: Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente - Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6; hemostasia e processo inflamatório.

GRUPO DE ESTUDO

Dados de identificação do sujeito da pesquisa

Nome da mulher: _____

Documento de identidade Nº: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Nº. _____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ **Telefone:** _____

Duração da pesquisa: dois anos

Prezada Senhora,

Meu nome é Elvira M. Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), e estou convidando-a a participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de médicos do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica que estão fazendo seu atendimento no Hospital das Clínicas da USP (HC/USP). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Nesta pesquisa serão incluídas mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos consecutivos e que tenham até 45 anos (este grupo será chamado de grupo estudo) e serão estudadas também, mulheres que não tem história de abortos (chamado de grupo controle). Para avaliar as possíveis causas de abortos serão realizados testes genéticos (DNA) e testes de laboratório para verificar a presença de alterações no DNA (material genético) e no seu sangue e suas associações com os abortos recorrentes.

Se você aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Ambulatório de Obstetrícia, 5º andar (Bloco 3) do prédio dos Ambulatórios do HC. Será feita uma única coleta de 30 mL de sangue, por profissional experiente e utilizando material estéril e descartável,

para a realização de exames que poderão, possivelmente, esclarecer as causas de abortos recorrentes. Com esses exames serão avaliadas: a função dos rins, do fígado, a quantidade de algumas vitaminas (ácido fólico, cobalamina, vitamina B6) e outras substâncias que são encontradas no sangue (homocisteína, TNF alfa, IFN gama, IL1, IL2, IL4, IL6, IL10 e proteína C-reativa) que estão relacionadas à inflamação no teu organismo, que também é um fator que pode complicar a gestação. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Para estudar seu DNA, serão realizados alguns testes que avaliarão alteração (metilação do DNA) e as diferenças nas sequências do DNA (polimorfismo) de cada indivíduo em diversos genes (MTHFR, MTR, MTRR, TC2, RFC1, GCP2, MTHFD1, CBS, THBM, TFPI, SERPINC1, PROC, TAFI, PAI1, FV, FII e FI), cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados com o aumento das quantidades de homocisteína no sangue e maior chance de formar coágulos (trombose). A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação. A amostra poderá ser utilizada para pesquisa futura sobre a causa de abortos recorrentes, se isso ocorrer, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, você será consultada a respeito.

Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos seus exames serão enviados para sua residência ou outro endereço de seu interesse.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem nenhum prejuízo ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Hospital das Clínicas da USP não será afetado. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de dados do Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento das causas de abortos espontâneos recorrentes, podendo auxiliar na mudança de conduta durante o pré-natal.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Prof.^a Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785) ou com os pesquisadores, Kelma Cordeiro da Silva, Juliano Félix Bertinato e Robson José Lázaro (tel: 3091-3785) ou com o Dr. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho da Divisão de Obstetrícia do HC/USP (tel.: 3069-6380 ou 3069-6209).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras?_ SIM _ NÃO
Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ____ SIM ____ NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 200____.

_____
Assinatura do sujeito da pesquisa

_____
Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

_____
Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br ou o **Comitê de Ética em**

Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde, Rua General Jardim, 36 2º andar, fone 3218-4043, e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo pesquisador.

Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – grupo de controle

Projeto de Pesquisa: Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente - Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6; hemostasia e processo inflamatório.

GRUPO CONTROLE

Dados de identificação do sujeito da pesquisa

Nome do paciente: _____

Documento de identidade Nº: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ Nº. ____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Prezada Senhora,

Meu nome é Elvira M Guerra Shinohara, sou professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), e estou convidando-a a participar do projeto de pesquisa no qual estou avaliando os efeitos de alterações no DNA (material genético) e no sangue de mulheres que tiveram três ou mais abortos consecutivos (chamadas de grupo estudo). Também será estudado nesse projeto, um grupo de mulheres que não tiveram história de abortos, que tenham tido pelo menos duas gestações normais e que tenham até 45 anos (chamado de grupo controle). Para avaliar as possíveis causas de abortos, serão realizados testes genéticos (DNA) e testes de laboratório para verificar a presença de alterações no DNA e no seu sangue.

Se você aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Ambulatório de Obstetrícia, 5º andar (Bloco 3) do prédio dos Ambulatórios do HC ou em nosso laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Cidade Universitária). Será feita uma única coleta de 30 mL de sangue, por profissional experiente e utilizando material estéril e descartável, para a realização de exames que poderão, possivelmente, esclarecer as causas de

abortos recorrentes. Com esses exames serão avaliadas: a função dos rins, do fígado, a quantidade de algumas vitaminas (ácido fólico, cobalamina e vitamina B6) e outras substâncias que são encontradas no sangue (homocisteína, TNF alfa, IFN gama, IL1, IL2, IL4, IL6, IL10 e proteína C-reativa), que estão relacionadas à inflamação no seu organismo, podendo ser consideradas fatores que podem complicar a gestação. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

Para estudar seu DNA, serão realizados alguns testes que avaliarão a alteração (metilação do DNA) e as diferenças nas sequências do DNA (polimorfismo) de cada indivíduo em diversos genes (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TC2*, *RFC1*, *GCP2*, *MTHFD1*, *CBS*, *THBM*, *TFPI*, *SERPINC1*, *PROC*, *TAFI*, *PAI1*, *FV*, *FII* e *FI*), cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados com o aumento das quantidades de homocisteína no sangue e maior chance de formar coágulos (trombose). A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação. A amostra poderá ser utilizada para pesquisas futuras sobre a causa de abortos recorrentes, se isso ocorrer, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, você será consultada a respeito. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos seus exames serão enviados para sua residência ou outro endereço de seu interesse.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem nenhum prejuízo ou perda dos benefícios a que você tem direito. Caso você desista de participar da pesquisa, poderá solicitar a retirada de seus dados genéticos do banco de materiais biológicos do Laboratório de Hematologia da FCF/USP, onde serão guardados.

Os dados e os resultados obtidos durante a pesquisa serão confidenciais e somente serão revelados a terceiros se você autorizar previamente. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados deste estudo forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates.

Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão colaborar no entendimento das causas de abortos espontâneos recorrentes, podendo auxiliar na mudança de conduta durante o pré-natal.

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, você poderá entrar em contato com a Prof.^a. Elvira M Guerra Shinohara (tel: 3091-3785) ou com os pesquisadores Kelma Cordeiro da Silva, Juliano Felix Bertinato e Robson José Lázaro (tel: 3091-3785).

Eu, _____ declaro que, após bem esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, participar desta Pesquisa.

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras?

(☐)SIM (☐) NÃO

Você quer receber os resultados dos testes genéticos? (☐)SIM (☐) NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 200____.

_____
Assinatura do sujeito da pesquisa

_____
Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

_____
Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br ou o **Comitê de Ética em**

Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde, Rua General Jardim, 36 2º andar,
fone 3218-4043, e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo pesquisador.

Anexo 4 - QUESTIONÁRIO

Data entrevista: __/__/

Nº. Registro no HC-USP: _____

Nome: _____	
Endereço: _____	Bairro: _____
Ponto de referência: _____	de _____
Cidade: _____	Casa própria? _____
e-mail: _____	Telefone (s): _____
Telefone(s) recado: _____	

1. Data de nascimento: ____/____/____
2. Idade (anos): _____
3. Raça declarada pela mulher: (0) branca (1) negra(2) parda(3) amarela/oriental(4) índia
4. Estado civil: (0) solteira (1) casada (2) viúva (3) união estável (4) separada
5. Ocupação: (0) dona-de-casa (1) desempregada (2) outra _____
6. Escolaridade (anos estudados) : _____

Dados sócio-econômicos da família:

7. Renda familiar mensal (reais): _____
8. Número de pessoas que contribuem: _____
9. Número de pessoas da casa (adultos): _____
10. Número de pessoas da casa (crianças): _____
11. Número de cômodos da casa: _____

Dados obstétricos

12. História reprodutiva (coloque a sequência):

Primeiro evento (1) aborto (0) parto

13. Número de gestações: _____
14. Número de partos anteriores: _____
15. Idade gestacional dos partos em semanas
1º _____; 2º _____; 3º _____ 4º _____; 5º _____; 6º _____
16. Número de abortos: _____
17. Idade gestacional dos abortos:
1º _____; 2º _____; 3º _____; 4º _____; 5º _____; 6º _____
18. Natimortos: (0) não (1) sim
19. Gestação de gêmeos: (0) não (1) sim
20. Número de filhos nascidos-vivos: _____

21. Peso estimado de nascimento dos filhos anteriores

1º Filho _____

2º Filho _____

3º Filho _____

4º Filho _____

22. Data do último parto ou aborto (meses): _____

23. peso atual (Kg): _____

24. altura: _____

25. Você teve hemorragia? (0) não (1) sim.

26. Época: (1) menstruação (2) aborto (3) aborto e menstruação (4) no parto (5) antes de engravidar

História de anemia

27. Apresentou anemia anteriormente:

(0) não (1) sim, durante outras gestações (2) sim, sem estar gestante

(3) não sabe (4) decorrente ao aborto

28. Você fuma? (0) não (1) sim

Nº de cigarros por dia _____

29. Consome bebidas alcoólicas: (0) não (1) sim

Tipo: (1) cerveja, copos por dia: _____ vezes por semana _____

(2) vinho, copos por dia: _____ vezes por semana _____

(3) cachaça, copos por dia: _____ vezes por semana _____

(4) batida, copos por dia: _____ vezes por semana _____

(5) champagne, copos por dia: _____ vezes por semana _____

(6) outras copos por dia, _____ vezes por semana _____

30. Você faz uso de anticoncepcional atualmente? (0) não (1) sim

31. Quando você tomou anticoncepcional a última vez? Data _____

32. Você está tomando ácido fólico atualmente? (0) não (1) sim. Qual a dose? _____

33. Quando você tomou ácido fólico a última vez? Data _____ dose _____

34. Uso de ferro (sulfato ferroso) e/ou outras vitaminas? (Marca, quantidade(dose) e tempo de uso, desde quando).

---

35. Uso de medicamentos (Nome, dose e tempo de uso)

---

36. Você tem pressão alta? (0) não (1) sim

37. Você tem diabetes? (0) não (1) sim Desde quando? _____ Qual tipo?

38. Você tem problemas na tireóide? (0) não (1) sim ( ) hipertireoidismo ( ) hipotireoidismo

Anexo 5 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**Ofício CEP nº 08/2008

São Paulo, 12 de fevereiro de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).**Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara**
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 11 de fevereiro de 2008, **APROVOU** as alterações do projeto "Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente - Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6" apresentado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Secretaria Municipal da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/SMS

1

São Paulo, 21 de maio de 2008.
PARECER Nº 0120/08 – CEP/SMS
CAAE: 0127.0.162.018-07

Para
Elvira Maria Guerra Shinohara
Sr(a) Pesquisador(a)

I - IDENTIFICAÇÃO

- ❖ **Projeto de Pesquisa:** "FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE – METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA, FOLATO, COBALAMINA E VITAMINA B6"
- ❖ **Pesquisador Responsável:** Elvira Maria Guerra Shinohara
- ❖ **Instituição:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
- ❖ **Área Temática Especial:** Genética Humana
- ❖ **Patrocinadores:** FAPESP e CNPq

II - Sumário Geral do Protocolo

Estima-se que cerca de 1 a 2% das mulheres apresenta abortos recorrentes durante a idade reprodutiva e que em cerca de 50% ou mais dos casos não tem sido possível identificar as causas específicas. Concentrações elevadas de homocisteína total (tHcy) foram associadas ao maior risco e mutações em genes de enzimas chave do metabolismo da homocisteína, bem como em genes de proteínas relacionadas ao metabolismo da cobalamina (transcobalamina II) e do folato (transportador de folato reduzido e enzima carboxi glutamato peptidase II) podem ser a causa da elevação das concentrações de tHcy.

➤ Os objetivos do presente estudo são:

- Determinar o risco de ter abortos espontâneos recorrentes segundo os genótipos para os polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *TC2* C776G e A76G, *RFC1* A80G e *GCP2* (C1561T) e também nas combinações de genótipos para os polimorfismos estudados;
- Avaliar se existe diferença entre as médias das concentrações de tHcy, ácido metilmalônico, cobalamina e folato em mulheres com história de abortos recorrentes e no grupo controle;
- Avaliar se existe a associação entre polimorfismos *MTHFR* (C677T e A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *TC2* (C776G e A76G), *RFC1* (A80G) e *GCP2* (C1561T) com alterações nas concentrações das vitaminas (B6, cobalamina (B12) e folato e dos metabólitos tHcy e MMA;
- avaliar quais são os fatores genéticos e bioquímicos para o aborto recorrente na população estudada;
- determinar a taxa de metilação do DNA nas amostras de dois grupos de mulheres.

O estudo será do tipo caso-controle. Serão estudadas **371 mulheres**, não grávidas, com história de três ou mais abortos espontâneos consecutivos **com menos de 20 semanas**, provenientes do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. **Serão também estudadas 371 mulheres saudáveis pareadas** segundo idade e grupo étnico, que não tenham tido história de abortos espontâneos e tenham tido pelo menos duas gestações normais (de termo), provenientes do Centro de Saúde Escola Butantã e Centro de Saúde do Rio Pequeno. Serão avaliados o hemograma, **índice da massa corpórea**, as concentrações séricas de cobalamina, folato (sérico e eritrocitário), vitamina B6, homocisteína total (tHcy), ácido metilmalônico (MMA). Também será determinado o fator anti-núcleo (FAN), anti-DNA, anticardiolipina, anti-fosfolípidos.

Secretaria Municipal da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/SMS

2

PARECER Nº 0120/08 – CEP/SMS
CAAE: 0127.0.162.018-07

A taxa de metilação na região promotora dos genes será realizada por PCR em tempo real. As genotipagens para os polimorfismos *MTHFR* (C677T e A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *TC2* (C776G e A76G), *RCF1*(A80G) e *GCP2* (C1561T) será determinado por PCR-RFLP.

Será aplicado um questionário a cada mulher para obtenção das seguintes informações: idade, dados sócio-econômicos (escolaridade, renda *per capita* e ocupação), antecedentes obstétricos, uso de medicamentos, uso de bebidas alcoólicas, fumo.

Serão colhidos, das veias periféricas, 30 ml de sangue das mulheres em jejum, uma única vez, por profissionais da saúde treinados. Serão utilizados materiais descartáveis para a coleta. Outro procedimento do estudo é a avaliação antropométrica. Para tanto as mulheres serão pesadas e medidas.

As mulheres com história de aborto serão submetidas também aos seguintes exames no Hospital das Clínicas da FMUSP (rotina ambulatorial):

- Determinação da função tireoidiana através da dosagem de T3, T4 e TSH.
- Dosagem da glicemia em jejum
- Realização da histerossalpingografia e ultrassom pélvica.
- Determinação de Clamydia na secreção cérvico-uterina.
- Sorologia para detecção de sífilis, toxoplasmose e citomegalovírus.
- Determinação do cariótipo

As mulheres serão informadas sobre os objetivos do projeto e consultadas sobre a vontade de participar da pesquisa. Sendo favoráveis, assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

➤ **Os critérios de inclusão das mulheres participantes são:**

- Para o grupo de estudo: história de três ou mais abortos espontâneos consecutivos com menos de 20 semanas e ser proveniente do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP;
- Para o grupo controle: ser saudável; não ter história de abortos espontâneos; ter tido pelo menos duas gestações normais (de termo) e serem provenientes do Centro Saúde Escola do Butantã e do Centro de Saúde do Rio Pequeno de São Paulo. Serão selecionadas de maneira pareada segundo as idades e grupos étnicos.

➤ **Serão critérios de exclusão:**

- gravidez;
- uso de medicamentos contendo ácido fólico, vitamina B12 e vitamina B6, ou de medicamentos que podem interferir no ciclo folato como metotrexate, fenitoína, carbamazepina, trimetropina, pirimetamina, colestiramina, barbitúricos, difenilidantoína e sulfonamida;
- ser portadoras de neoplasias e hipertensão arterial.

III - Considerações

Não é projeto multicêntrico.

A Folha de Rosto está corretamente preenchida. Os currículos do pesquisador responsável e dos colaboradores estão de acordo com a proposta da pesquisa. O orçamento e o cronograma da pesquisa estão adequados.

Não haverá envio de material biológico para o exterior. O projeto prevê a formação de banco de material biológico e foi adequado à RES 347/05 CNS. A metodologia é adequada aos objetivos e apresenta desconforto mínimo às participantes, referente à coleta do sangue e aos demais exames para diagnóstico diferencial.

Secretaria Municipal da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/SMS

3

**PARECER Nº 0120/08 – CEP/SMS
CAAE: 0127.0.162.018-07**

O melhor entendimento dos fatores determinantes de abortos pode colaborar para aprimorar o tratamento da disfunção, trazendo assim benefício às mulheres que apresentam o problema.

Os direitos fundamentais das participantes referente à informação, recusa e desistência inócuos, de continuidade do atendimento, de privacidade e de acesso ao pesquisador e ao CEP estão garantidos no TCLE.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está redigido na forma de convite à participação no estudo, é conciso e objetivo e sua linguagem é adequada ao nível sócio-cultural dos sujeitos de pesquisa.

Há identificação dos riscos e desconfortos esperados e explicitação das garantias referidas no item IV. 1 da Res. CNS 196/96. Permite a saída do sujeito de pesquisa da experimentação, sem prejuízo de seus cuidados. Está garantido às voluntárias o direito aos resultados dos exames que serão enviados para os locais de atendimento da participante e ficarão arquivadas no prontuário de cada uma. Foi elaborado um TCLE para mulheres que participarão do grupo controle e outro para mulheres do grupo em estudo.

O TCLE também informa a possibilidade de armazenamento do DNA das participantes para futuras pesquisas.

- Este projeto não precisa ser enviado para análise da CONEP.

III. Parecer do CEP: Projeto APROVADO

Como procedimento adotado por este Comitê de Ética em Pesquisa, solicitamos a inclusão, no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do seguinte: qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: Comitê de Ética em Pesquisas da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo - Rua General Jardim, 36 - 2º andar - Telefone: 3218-4043 - e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br

Lembramos que este parecer não basta para que seu estudo possa se realizar na unidade de saúde, é necessária também a permissão da autoridade administrativa.

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

1. O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma ou sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - item IV.1f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento livre e esclarecido, na íntegra por ele assinado (item IV.2.d)
2. O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O relatório final deve ser apresentado ao CEP, logo que o estudo estiver concluído.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Iara Coelho Zito Guerriero
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa da
Secretaria Municipal da Saúde – CEP/SMS

Anexo 6 – Parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30/01/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 1232/07, intitulado: "**FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE - METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA, FOLATO, COBALAMINA E VITAMINA B6**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **MARIO HENRIQUE BURLACCHINI DE CARVALHO**

Pesquisador (a) Executante: **DÉBORA DE LIMA ROBI**

CAPPesq, 11 de Fevereiro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa**