

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

**Avaliação da taxa de metilação do DNA em região promotora e de
vitaminas e citocinas em mulheres com história de abortos
recorrentes**

Nathalia Sierra Monteiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a Dr^a Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2013

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

**Avaliação da taxa de metilação do DNA em região promotora e de
vitaminas e citocinas em mulheres com história de abortos
recorrentes**

Nathalia Sierra Monteiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a Dr^a Elvira Maria Guerra Shinohara

São Paulo

2013

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

Catálogo da Publicação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica

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

Monteiro, Nathalia Sierra
M776a Avaliação da taxa de metilação do DNA em região promotora
e de vitaminas e citocinas em mulheres com história de abortos
recorrentes / Nathalia Sierra Monteiro. -- 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. Imunologia 2. DNA : Metilação 3. Citocina : Bioquímica
humana 4. Regulação gênica I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira
Maria, orientador.

615.37 CDD

Nathalia Sierra Monteiro

Avaliação da taxa de metilação do DNA em região promotora e de
vitaminas e citocinas em mulheres com história de abortos recorrentes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2013.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela FAPESP e bolsa concedida pelo CNPq

Common sense is the collection of prejudices acquired by age eighteen.

Albert Einstein

Ao Providencial, por me guiar de forma onipresente no caminho da fé e pela generosidade em me munir do necessário para o meu aperfeiçoamento.

Aos meus amados pais Odair Monteiro e Doroti Viana, por todo amor e brio e por todas as lições primorosas de conduta, ética e respeito.

Ao meu irmão Leonardo Monteiro, pelas batalhas filosóficas.

À minha avó Euridice Nogueira (in memoriam), por ter estendido seus braços para o meu bem-estar.

Aos meus amigos fantásticos Juliana Almeida, Nathália Diniz, Patricia Amorim, Anderson Uyekita, Ellen Deuter, Andresa Canesin, Jackeline Soares, Pandora Lima, Dalila Cunha, Juliano Bertinato, Mayumi Gonçalves, Ana Pires, Laura de Freitas, Carla Godoy, Daniele Sinagawa, Felipe Oliveira, Rafael Stern, Gabriel Martins e Vinicius Galaverna, sem os quais não haveria luz no fim dos tuneis, por terem bravamente permanecido ao meu lado nos dias incríveis e por sua habilidade em me manter sã nos tempos caóticos.

Aos professores vitais, que ao longo da jornada acadêmica dedicaram parte de seus dias a me ensinar os caminhos da ciência e da fé.

Aos queridos companheiros da pós-graduação, que aqui e ali caminharam comigo nesta jornada científica, compartilhando cafés e incertezas.

E aos que torcem por nós.

AGRADECIMENTOS

À Dra Elvira Maria Guerra Shinohara, pela oportunidade, pelo aprendizado e pela orientação.

Aos Drs André Vettore e Vânia D'Almeida por terem mantido abertas as portas de seus laboratórios para a realização dos experimentos.

Aos Drs Mario Henrique Burlacchini de Carvalho, Antonio Gomes de Amorim Filho e Marcelo Zugaib, pela colaboração profissional no recrutamento de pacientes.

Aos Drs Joilson de Oliveira Martins, Miriam Galvonas Jasiulionis e André Luiz Vettore, pelas valiosas contribuições científicas no Exame de Qualificação.

Às doutoras Vanessa Cavalcante da Silva e Maria Aderuza Horst e à doutoranda Ana Carolina de Carvalho Peters, por terem me guiado e ensinado os passos experimentais.

À equipe do Laboratório de Hematologia pelo árduo trabalho em prol do progresso científico.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela imensa ajuda nas etapas burocráticas, pelo compartilhamento de ideias e pela colaboração acadêmica.

À FAPESP e ao CNPq, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por ter sido o palco da minha vivência acadêmica.

À Universidade de São Paulo, por ter sido fundamental na minha formação.

E às mulheres participantes do estudo, que aceitaram participar do projeto e depositaram em nós a confiança na seriedade do nosso trabalho.

*Then you better start swimmin'
or you'll sink like a stone
for the times they are a-changin'
Bob Dylan*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Inflamação.....	19
1.2 Marcadores do Processo Inflamatório	20
1.3 Gestação e Resposta Inflamatória	21
1.4 Regulação Gênica da Produção de Interferon Gama	23
1.5 Epigenética.....	24
1.6 Estado Nutricional e Metilação do DNA	27
1.7 Seleção de Genes para o Estudo de Metilação do DNA.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Casuística.....	33
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	34
3.3 Extração de DNA de leucócitos	34
3.4 Determinação da taxa de metilação na região promotora do gene IFNG	34
3.4.1 Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio	35
3.4.2 Metilação in vitro de DNA de leucócitos.....	35
3.4.3 Construção da Curva Padrão.....	36
3.4.4 Metilação específica quantitativa (qMSP - quantitative Methylation Specific PCR)	37
3.5 Determinação da concentração sérica de citocinas	39
3.6 Determinação das concentrações de folato sérico e cobalamina sérica	40
3.7 Determinação da concentração de proteína C-reativa ultra-sensível (PCRu) .	40
3.8 Determinação da concentração de homocisteína total e cisteína plasmáticas	40
3.9 Análise Estatística	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 Características da população estudada	42
4.1.1 Modelos de regressão logística univariada para as variáveis dependentes “ter aborto primário” e “ter aborto secundário”	44
4.2 Concentração de vitaminas e homocisteína total	44
4.3 Concentração de marcadores do processo inflamatório	46
4.4 Avaliação dos fatores de risco para a ocorrência de aborto recorrente	49

4.4.1 Modelos de regressão logística multivariada para a variável dependente “ter aborto primário” (Modelo 1) e “ter aborto secundário” (modelo 2)	49
4.5 Avaliação da Taxa de Metilação do DNA	51
4.5.1 Correlação entre taxa de metilação do DNA e concentrações das variáveis bioquímicas	51
4.5.1 Associação entre a taxa de metilação do DNA e as concentrações de IFN γ nos diferentes grupos.....	54
4.6 Análise de Curva ROC para os marcadores do processo inflamatório em cada grupo	54
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES.....	62
7. BIBLIOGRAFIA	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais causas relacionadas ao aborto espontâneo recorrente	18
Tabela 2 - Sequências de primers e sondas dos genes utilizados	38
Tabela 3 - Características sócio-demográficas da população estudada	43
Tabela 4 - Regressão Logística univariada para a variável dependente "ter aborto primário" (modelos 1) e "ter aborto secundário" (modelos 2)	44
Tabela 5 - Concentração de vitaminas e homocisteína total conforme os grupos....	45
Tabela 6 - Concentração de marcadores do processo inflamatório conforme os grupos AP, AS e controle	47
Tabela 7 - Concentração de marcadores do processo inflamatório entre grupos de aborto recorrente (AP + AS) e controle	47
Tabela 8 - Razões entre citocinas Th2/Th1 conforme os grupos	49
Tabela 9 - Regressão Logística multivariada (modelo enter) para a variável dependente "ter aborto primário" (modelo 1) e "ter aborto secundário" (modelo 2)..	50
Tabela 10 - Regressão Logística multivariada (modelo enter) para a variável dependente "ter aborto primário" (modelo 1) e "ter aborto secundário" (modelo 2)..	50
Tabela 11 - Correlações de Spearman entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene IFNG e as concentrações de vitaminas, homocisteína total e IMC conforme os grupos	52
Tabela 12 - Correlações de Spearman entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene IFNG e as concentrações de citocinas conforme os grupos.....	53
Tabela 13 - Comparação das taxas de metilação do DNA no gene IFNG segundo tercis das concentrações da citocina IFN γ conforme os grupos	54
Tabela 14 - Área abaixo da curva ROC para os marcadores do processo inflamatório no grupo AP.....	55
Tabela 15 - Área abaixo da curva ROC para os marcadores do processo inflamatório no grupo AS.....	55
Tabela 16 - Área abaixo da curva ROC para os marcadores do processo inflamatório no grupo AER (AP + AS)	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etiologia do aborto espontâneo recorrente.....	19
Figura 2. Ambiente celular e imunológico no desenvolvimento embrionário	22
Figura 3. Efeito da metilação do DNA na transcrição gênica.....	24
Figura 4. Modificações epigenéticas em histonas e em dinucleotídeos CpG	25
Figura 5. Conversão da citosina em 5-metilcitosina sob ação da enzima Dnmt.....	26
Figura 6. Via metabólica da remetilação da homocisteína e sua importância na metilação do DNA.....	27
Figura 7. Via metabólica do folato e da homocisteína	28
Figura 8. Via metabólica da cobalamina.....	29
Figura 9. Amplificação da Curva Padrão para os genes <i>ACTB</i> , <i>IFNG</i> e <i>STRATIFIN37</i>	
Figura 10. Comparação da concentração sérica de vitaminas e homocisteína total entre os grupos aborto primário (AP, N=117), aborto secundário (AS, N=139) e controle (C, N=264)..	46
Figura 11. Comparação da concentração sérica de citocinas entre os grupos aborto primário (AP, N=117), aborto secundário (AS, N=139) e controle (C, N=264).	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AER: Aborto espontâneo recorrente

AP: Aborto espontâneo recorrente primário

AS: Aborto espontâneo recorrente secundário

Cbl: Cobalamina

CBS: Cistationa β sintase

CpG: Citosina-fosfato-guanina

CYS: Cisteína

DMG: Dimetilglicina

DNA: Ácido desoxiribonucleico

Dnmt: DNAmetiltransferase

Dntp: Desorribonucleotídeo trifosfatado

FIV: Fertilização *in vitro*

IFN γ : Interferon gama

IMC: Índice de massa corpórea

IL: Interleucina

MTHFR: Metilenotetraidrofolato redutase

MTHF: Metiltetraidrofolato

MTR: Metionina sintase

MTRR: Metionina sintase redutase

NADP: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NK: Linfócitos Natural killer

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PCRu: Proteína C Reativa Ultrassensível

SAH: S-adenosil-homocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

TCII: Transcobalamina II

Th: Linfócitos T helper

tHcy: Homocisteína total

THF: Tetraidrofolato

TNF: Fator de necrose tumoral

RESUMO

MONTEIRO, N.S. Avaliação da taxa de metilação do DNA em região promotora e de vitaminas e citocinas em mulheres com história de abortos recorrentes. 2013. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

O aborto espontâneo recorrente (AER) caracteriza-se pela ocorrência de três ou mais abortos consecutivos espontâneos até a 20ª semana de gestação. É uma condição patológica multifatorial, em que alterações morfológicas uterinas, distúrbios endócrinos, alterações no cariótipo, polimorfismos genéticos relacionados aos genes envolvidos no metabolismo da homocisteína, hemostasia, infecções, autoanticorpos e o processo inflamatório podem contribuir para a ocorrência de AER. O estado fisiológico do endométrio é essencial para a implantação do embrião no útero durante a gestação. Na interface materno-fetal, há uma modulação de citocinas, necessária para o estabelecimento da angiogênese e desenvolvimento da placenta. Um desequilíbrio entre as citocinas pode diminuir a tolerância ao feto e ocasionar rejeição fetal. A concentração de citocinas pode ser modificada por conta de uma diminuição na expressão de alguns genes, e esta pode ser regulada pelo seu estado de metilação sítio-específica. A metilação do DNA é um mecanismo epigenético de regulação gênica, e que corresponde à incorporação de grupos metila em ilhas CpG localizadas próximas às regiões promotoras de genes humanos, e isso pode ser importante na avaliação do risco de complicações gestacionais. Além disso, o estado nutricional de vitaminas foi relacionado a alterações no padrão de metilação de alguns genes. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as concentrações dos mediadores inflamatórios em mulheres com aborto e em grupo controle, verificar correlações entre as concentrações de vitaminas, homocisteína total e taxa de metilação do DNA, verificar correlações entre concentração de citocinas e taxa de metilação do DNA e determinar odds ratio (IC 95%) de ter aborto em modelos multivariados. Foram incluídas 253 mulheres com história de aborto recorrente e 264 mulheres saudáveis (controle). O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico para o estudo de metilação. Foram separadas alíquotas de soro e plasma para dosagem de vitaminas, metabólitos e citocinas. Não foram encontradas diferenças nas taxas de metilação do DNA entre os grupos aborto e controle. A citocina TNF α está aumentada nos grupos de aborto em comparação ao controle. A taxa de metilação do DNA no gene IFNG foi correlacionada inversamente às concentrações de folato sérico e citocina IFN γ no grupo controle. E as concentrações de IL10 foram inversamente correlacionadas à taxa de metilação do DNA nos grupos de aborto secundário e controle. Neste trabalho, verificou-se que as vitaminas e as citocinas influenciam na taxa de metilação do DNA do gene *IFNG* e a citocina pró-inflamatória TNF α apresenta-se aumentada em mulheres com história de aborto.

Palavras-chave: aborto recorrente; metilação do DNA; folato; citocinas

ABSTRACT

MONTEIRO, NS. Investigation of DNA methylation rate in promoter region and vitamins and cytokines in women with a history of recurrent miscarriage. 2013. 90 f. Thesis (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Recurrent spontaneous abortion (RSA) is characterized by the occurrence of three or more consecutive spontaneous abortions until the 20th week of gestation. It is a multifactorial pathological condition in which morphological uterine, endocrine disorders, changes in the karyotype genetic polymorphisms related to genes involved in homocysteine metabolism, infection, autoimmunity and inflammatory processes may contribute to the occurrence of RSA. The physiological state of the endometrium is essential for embryo implantation in the uterus during pregnancy. In maternal-fetal interface, there is a modulation of cytokines necessary for the establishment and development of placental angiogenesis. An imbalance between cytokines can decrease tolerance to fetus and cause fetal rejection. Concentration of cytokines may be modified due to a decrease in the expression of genes related to some of these cytokines that can be regulated by DNA methylation, which is an epigenetic mechanism of gene regulation and which corresponds to the incorporation of groups Methyl CpG islands located near the promoter regions of human genes, and this may be important in assessing the risk of pregnancy complications. In addition, the nutritional status of vitamins was associated with changes in the methylation pattern of certain genes. The aims of this study were to determine the concentrations of inflammatory mediators in women with abortion and the control group, examine correlations between concentrations of vitamins, total homocysteine and DNA methylation rate, examine correlations between cytokine concentration and DNA methylation and determine odds ratio (95% CI) of having abortion in multivariate models. We included 253 women with a history of recurrent miscarriage and 264 healthy women (control). DNA was extracted from peripheral blood leukocytes for the study of methylation. Serum and plasma aliquots were used for determination of vitamins, metabolites and cytokines. There were no differences in rates of DNA methylation between control and abortion groups. The cytokine $TNF\alpha$ is increased in abortion groups compared to the control. DNA methylation rate in gene *IFNG* was inversely correlated with serum folate and serum cytokine $IFN\gamma$ in the control group. Also $IL10$ concentrations were inversely correlated to DNA methylation rate in groups of miscarriage and secondary control. In this work, it was found that vitamins and cytokines influence DNA methylation rate in the promoter region and are different in the study and control groups.

Keywords: recurrent miscarriage, DNA methylation, folate, cytokines

1. INTRODUÇÃO

O aborto espontâneo recorrente (AER) é uma condição definida pela presença de três ou mais abortos consecutivos e espontâneos até a 20ª semana de gestação (Pandey, Rani e Agrawal, 2005). O aborto é uma das mais comuns complicações gestacionais (Balasch, 2004), mas o aborto recorrente ocorre em 1 a 2% da população em idade reprodutiva (Duckitt e Qureshi, 2008) (Metwally *et al.*, 2010). Pode ser classificado em aborto primário, quando a mulher só teve ocorrências de aborto, ou secundário, quando a mulher já teve pelo menos um feto viável (Toth *et al.*, 2010). É considerada uma doença multifatorial (Tabela 1) (Stephenson, 1996; Ford e Schust, 2009), em cujas causas estão incluídas: alterações morfológicas uterinas (Porcu *et al.*, 2000; Pabuccu e Gomel, 2004), distúrbios endócrinos (Legro, 2007; Abbassi-Ghanavati, 2011), anormalidades cromossômicas dos pais (Daya, 2004; Elghezal *et al.*, 2007), presença de autoanticorpos (Fausett e Branch, 2002; Mezzesimi *et al.*, 2007; Ticconi *et al.*, 2010), infecções (Kaur *et al.*, 2007; Baud *et al.*, 2011), polimorfismos genéticos relacionados aos genes envolvidos na hemostasia e no metabolismo da cobalamina, do folato e da homocisteína, e também em genes relacionados a citocinas (Alkhourji *et al.*, 2013).

Fatores ambientais, como obesidade, definida (segundo World Health Organization, 2011) por $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$, e tabagismo também foram associados a um aumento do risco de ocorrências trombóticas, o que poderia contribuir para o aborto (Cnattingius, 2004; Lashen, Fear e Sturdee, 2004; Rittenberg *et al.*, 2011; Van Eerden, 2011).

Outro fator que contribui para a etiologia do aborto recorrente é a presença do processo inflamatório mediado por citocinas pró-inflamatórias, que culmina na perda da tolerância imunológica ao feto (Peltier, 2003; Diaz *et al.*, 2009).

Embora as causas acima mencionadas contribuam para a etiologia do aborto recorrente, sabe-se que em mais de 40% dos casos a causa do aborto permanece desconhecida (Figura 1).

Tabela 1 - Principais causas relacionadas ao aborto espontâneo recorrente

Causas	Alguns Exemplos	Referências
Alterações na morfologia uterina	Útero septado; Incompetência cervical	(Jaslow e Kutteh, 2013)
Distúrbios endócrinos	Disfunção tireoidiana; Síndrome do Ovário Policístico	(Sarkar, 2012) (Chakraborty <i>et al.</i> , 2013)
Anormalidades cromossômicas	Aneuploidias do cromossomo X; translocações	(Ou <i>et al.</i> , 2013) 2013
Presença de autoanticorpos	Síndrome Antifosfolípide; Anticorpo Antinuclear	(Sater <i>et al.</i> , 2012)
Infecções	<i>Chlamydia trachomatis</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i>	(Baud <i>et al.</i> , 2011) ((Mania-Pramanik <i>et al.</i> , 2012) (Rowe <i>et al.</i> , 2012)
Polimorfismos genéticos relacionados à hemostasia	Relacionados à formação do coágulo, à anticoagulação e à antifibrinólise	(Guerra-Shinohara <i>et al.</i> , 2012) (Su <i>et al.</i> , 2013)
Polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo de vitaminas e homocisteína	Relacionados ao transporte de cobalamina, à absorção e ao ciclo do folato e ao metabolismo de homocisteína	(Nair, Khanna e Singh, 2012) (Cao <i>et al.</i> , 2013)

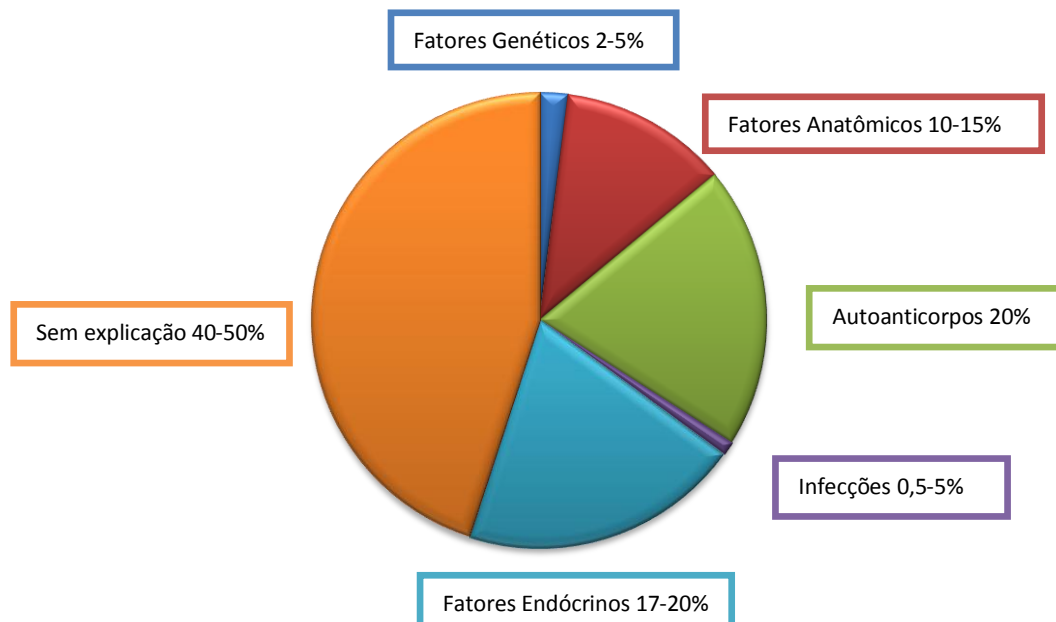


Figura 1. Etiologia do aborto espontâneo recorrente

Adaptado de (Ford e Schust, 2009).

1.1 Inflamação

A inflamação pode ser entendida como uma resposta vascular do organismo a um estímulo ou injúria. É uma resposta imune não-específica, que pode ser subdividida em aguda e crônica (Weiss *et al.*, 2009) e é essencial para a homeostase tecidual (Challis *et al.*, 2009). A fase aguda é caracterizada por alterações vasculares, recrutamento de neutrófilos e mediadores inflamatórios, com ampla participação de citocinas, quimiocinas e enzimas plasmáticas que aumentam a permeabilidade vascular. Já na fase crônica, que em geral decorre de uma resposta inflamatória aguda não resolvida, há infiltrado de mononucleares continuamente ativados e promoção da angiogênese e fibrose por conta da intensa proliferação de fibroblastos (Strutz e Neilson, 2003).

Na gestação, uma série de citocinas regula a resposta imune, promovendo alteração na população de leucócitos, requerida para proteger o feto da rejeição imunológica, além de facilitar a remodelação tecidual necessária para o desenvolvimento da placenta (Robertson, Care e Skinner, 2007). Sabe-se que variações interindividuais na resposta inflamatória via citocinas podem alterar o risco de AER (Bombell e Mcguire, 2008). A perda embrionária foi associada ao aumento

na expressão de citocinas pró-inflamatórias como $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL1}\beta$ e IL6 no útero e redução de citocinas anti-inflamatórias no início da gestação (Jenkins *et al.*, 2000).

1.2 Marcadores do Processo Inflamatório

A reação inflamatória caracteriza-se por uma resposta sistêmica do organismo, com a produção de diversas substâncias, entre elas citocinas e proteínas de fase aguda.

As citocinas são polipeptídeos envolvidos na modulação da resposta imune e das reações inflamatórias. São produzidas majoritariamente por células do sistema imune. Células T helper (Th) são responsáveis por induzir a resposta imunológica e também estimular linfócitos B a produzir anticorpos (Saini *et al.*, 2011). Após ativação das células Th, o tipo de resposta pode ser diferenciado em Th1 e Th2 (entre outros, como TReg e Th17), de acordo com o tipo de citocina produzida.

As células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias (Yao *et al.*, 2007), como o $\text{IFN}\gamma$, citocina imunoreguladora que influencia todos componentes da resposta imune; é o principal fator de ativação de macrófagos, em que ativa a citotoxicidade (Gadina *et al.*, 2001), ativando a transcrição de genes que codificam enzimas que geram intermediários reativos de oxigênio. Além disso, estimula a produção de um fator de transcrição responsável por promover a diferenciação em Th1. Ela também suprime o crescimento de células Th2. É também um potencializador da ação do $\text{TNF}\alpha$, promovendo extravasamento de linfócitos T para os locais de inflamação. O $\text{TNF}\alpha$ é uma citocina pró-inflamatória produzida por fagócitos mononucleares, células NK e células T estimuladas (Hehlgans e Pfeffer, 2005). Participa da inflamação aguda e dos danos microvasculares, além de estimular a adesão de neutrófilos e monócitos a células endoteliais.

A indução da expressão do $\text{IFN}\gamma$ e do $\text{TNF}\alpha$ é mediada pela $\text{IL1}\beta$ (Saperstein *et al.*, 2009), citocina pró-inflamatória secretada por monócitos, macrófagos e células epiteliais. O gene da $\text{IL1}\beta$ está em uma região de 40 kb no cromossomo 2. A família de IL1 apresenta 2 agonistas ($\text{IL1}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$), um antagonista (IL1 Ra) e dois

receptores (IL1 Rtl e IL1 RtlI) (Levrant, Coulam e Jeyendran, 2008). As citocinas IL1 e IL6 regulam a implantação e permitem a invasão dos trofoblastos, regulada pela metaloprotease colagenase tipo IV (Mcewan *et al.*, 2009). A IL6 é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, e tem função pró-inflamatória, mas também apresenta propriedades anti-inflamatórias. Em humanos, a produção de IL6 induz a liberação de hCG de trofoblastos, levando a uma liberação de citocinas Th2 e à supressão de citocinas Th1 (Unfried *et al.*, 2003). O gene que codifica a IL6 está localizado no cromossomo 7.

Quanto às citocinas induzidas por Th2 estão a IL 4, produzida por linfócitos Th2 e tem como função promover ativação de linfócitos B (Luzina *et al.*, 2011) . Outra função importante é que é capaz de facilitar a adesão de leucócitos ao endotélio; e a IL10, citocina anti-inflamatória envolvida na inibição da síntese de mediadores inflamatórios secretados por macrófagos e monócitos. O gene IL10 apresenta 5 éxons e ocupa 5,1 kb no cromossomo 1 entre 1q31 e 1q32 (Kim *et al.*, 1992; Eskdale *et al.*, 1997). O citotrofoblasto e as células T da decídua de gestações normais expressam IL10 e contribuem para a predominância de Th2 durante a peri-implantação (Hanna *et al.*, 2000; Viganò *et al.*, 2002).

A proteína C reativa é considerada um marcador de processo inflamatório. É produzida pelo fígado e sua concentração plasmática aumenta durante a fase aguda do processo inflamatório. Ela se liga a diversos patógenos, além de ativar o sistema complemento. Sua produção é regulada pela presença da IL-6 (Ramírez-López *et al.*, 2013). Recentemente, verificou-se que elevações mínimas nessa proteína foram associadas ao maior risco de eventos crônicos, como os cardiovasculares (Black, Kushner e Samols, 2004), além de concentrações séricas elevadas terem sido encontradas em maior proporção em mulheres que sofreram aborto (Mollamahmutoglu *et al.*, 2011) ou parto prematuro (Pitiphat *et al.*, 2005; Lohsoonthorn, Qiu e Williams, 2007).

1.3 Gestação e Resposta Inflamatória

No processo de gestação, o estado fisiológico do endométrio é essencial para a implantação do embrião no útero. Os trofoblastos formam a interface materno-fetal

e escapam do aloreconhecimento por não possuírem moléculas HLA. A tolerância na decídua é mediada em parte por trofoblastos extravilosos HLA-G (+) que invadem o tecido e impedem a ação de NK, células T citotóxicas e macrófagos (Kumpel e Manoussaka, 2012). As células NK expressam citocinas, e tal expressão pode ser afetada pela presença de HLA-G, pois sua expressão por trofoblastos inibe a ativação de células mononucleares uterinas (Riley e Yokoyama, 2008).

Na interface materno-fetal, uma resposta imune inicial é necessária para o estabelecimento da angiogênese e do desenvolvimento da placenta (Kwak-Kim, Yang e Gilman-Sachs, 2009), em que IL4 e IL10 passam a dominar o cenário (frente às citocinas IL6, TNF α e IFN γ) para garantir a tolerância imunológica ao feto (Figura 2).

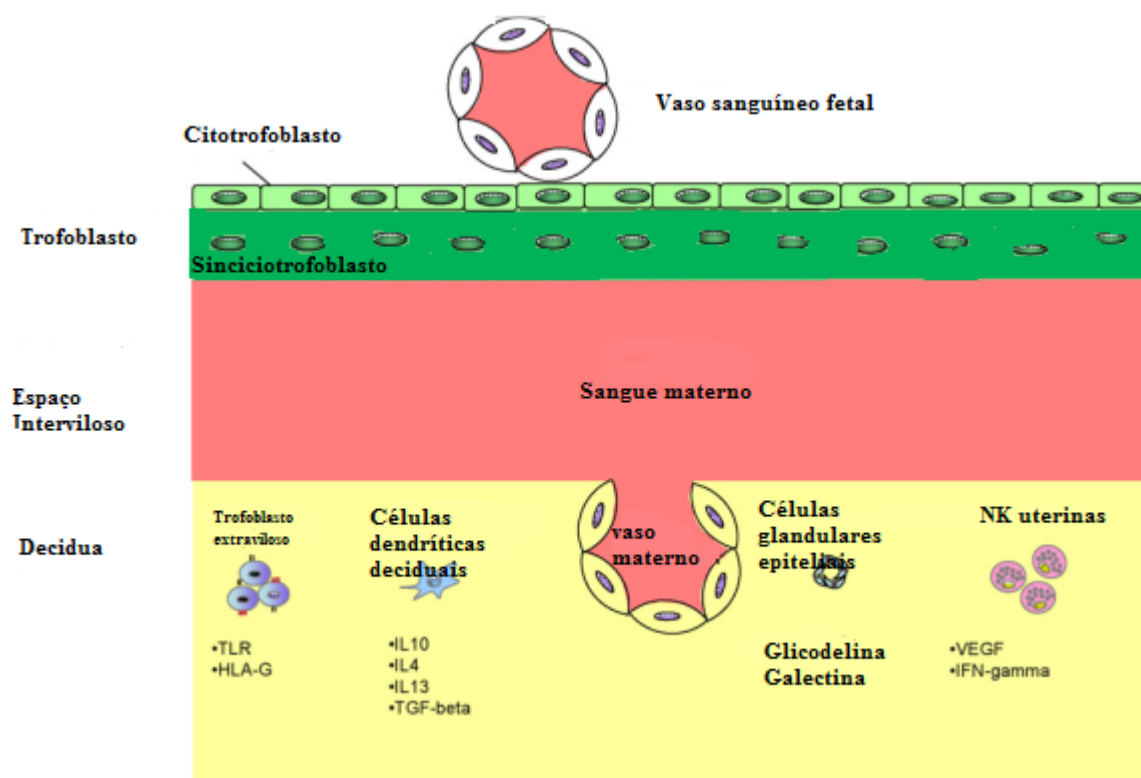


Figura 2. Ambiente celular e imunológico no desenvolvimento embrionário

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial, TLR - receptor do tipo Toll, HLA-G - complexo de histocompatibilidade. Adaptado de (Toth *et al.*, 2010).

Um desequilíbrio neste cenário desencadeia uma reação imunológica contra células fetais e trofoblásticas (Bennett *et al.*, 1996; Darmochwal-Kolarz *et al.*, 1999; Christiansen, Nielsen e Kolte, 2006), pois as citocinas produzidas no endométrio têm a função de modular as mudanças na população de leucócitos para evitar rejeição fetal, bem como para permitir o desenvolvimento adequado da placenta (Thellin *et al.*, 2000; Trowsdale e Betz, 2006; Jasper, Tremellen e Robertson, 2007).

No início da gravidez normal, há predominância de produção de citocinas IL 4 e IL 10, (Th2, cujas citocinas são direcionadas para a resposta humoral), mas no aborto recorrente, predominam IFN γ e IL 2 (Th1, cujas citocinas são direcionadas a uma resposta citotóxica) (Wegmann *et al.*, 1993a). As citocinas Th1 inibem o crescimento e induzem a apoptose de células trofoblásticas (Yui *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1999). A citocina IL 6 também está diminuída no endométrio de mulheres com história de aborto quando comparada a mulheres normais (Lim *et al.*, 2000), o que corrobora o conhecimento de que a IL 6 (juntamente com a IL 10) promovem o aumento de resistência das células trofoblásticas à apoptose (Aschkenazi *et al.*, 2002). A concentração sérica de IL 17 (presente no citotrofoblasto e no sincitiotrofoblasto, atuando na angiogênese e na homeostasia imunológica) em mulheres com história de aborto foi maior quando comparada à de mulheres normais (Wang, W.-J. *et al.*, 2010).

1.4 Regulação Gênica da Produção de Interferon Gama

A resposta imune pode também ser afetada por mecanismos epigenéticos. É também bastante conhecido o envolvimento da metilação com o silenciamento de genes (Baylin, 2005), pois a metilação na região promotora leva a um impedimento de ligação do promotor ao sítio, impedindo, assim, a transcrição gênica (Figura 3). O silenciamento gênico provocado pela hipermetilação do DNA afeta vários genes envolvidos nas vias celulares, tal como em supressores de tumor, reparação do DNA, resposta hormonal, adesão celular, além de contribuir criticamente para a resposta inflamatória, em que o estímulo antigênico leva a uma diferenciação de células T helper em diferentes subtipos com funções específicas, processo que ocorre devido a um remodelamento da cromatina e modificação do acesso de

fatores transcripcionais à região promotora de genes codificadores de citocinas com ação crucial no processo inflamatório (Sawalha, 2008). Foi demonstrado que em murinos, as células Th1 são hipometiladas na região promotora do *IFNG*, enquanto as células Th2 são hipermetiladas deste gene (Young *et al.*, 1994).

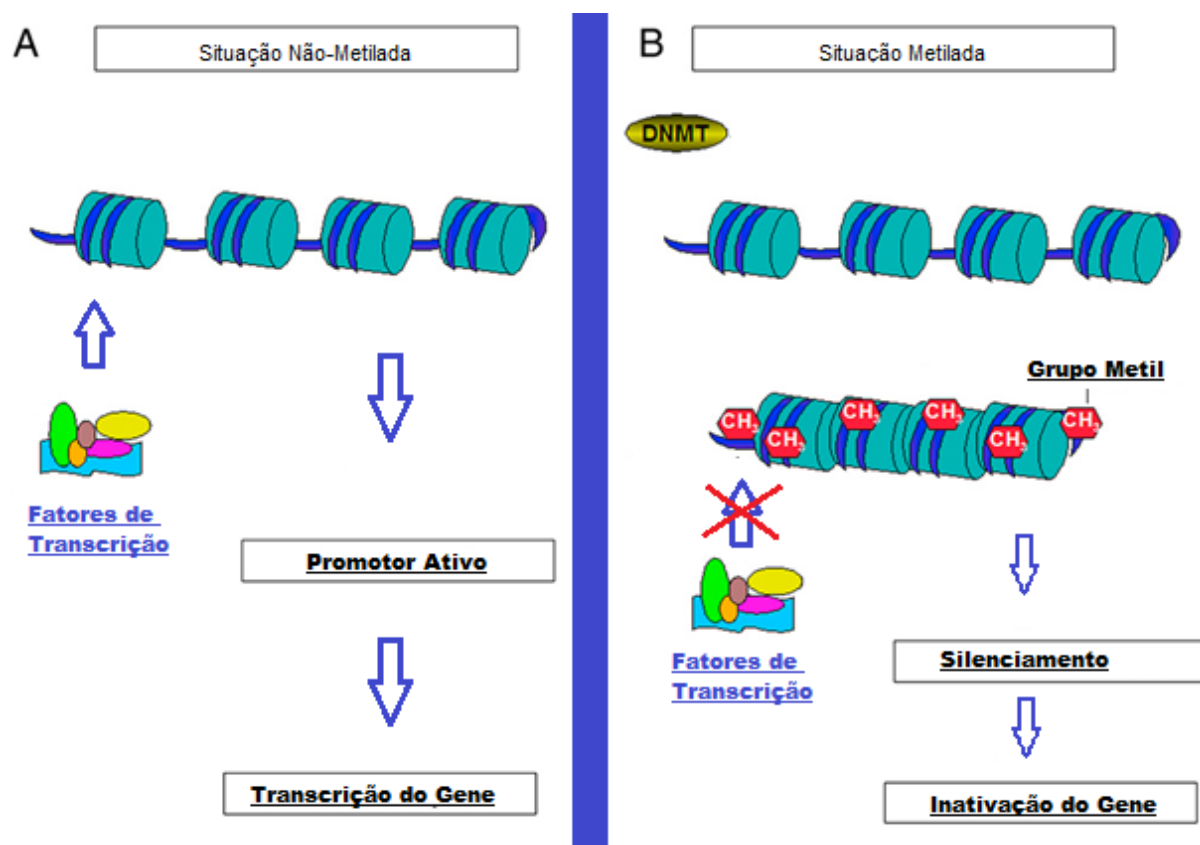


Figura 3. Efeito da metilação do DNA na transcrição gênica

(A) Quando a região promotora não está metilada, os fatores de transcrição se ligam ao DNA e ocorre ativação da expressão gênica. (B) Quando as citocinas da região promotora estão metiladas, os fatores de transcrição não conseguem se ligar ao DNA e ocorre inibição da transcrição.

Adaptado de (Cardoso *et al.*, 2010).

1.5 Epigenética

A epigenética avalia o padrão de expressão gênica, conferido por uma série de modificações (sem alteração da sequência do DNA), e cujos principais mecanismos são metilação de dinucleotídeos, metilação, acetilação, fosforilação de histonas, promovendo remodelação da cromatina (figura 4). Essas modificações são

herdáveis e fortemente influenciadas pelo ambiente (como dieta, xenobióticos e radiação). A epigenômica é suscetível a alterações, particularmente durante a gestação, por conta da alta taxa de síntese de DNA que ocorre neste período (Dolinoy, Weidman e Jirtle, 2007).

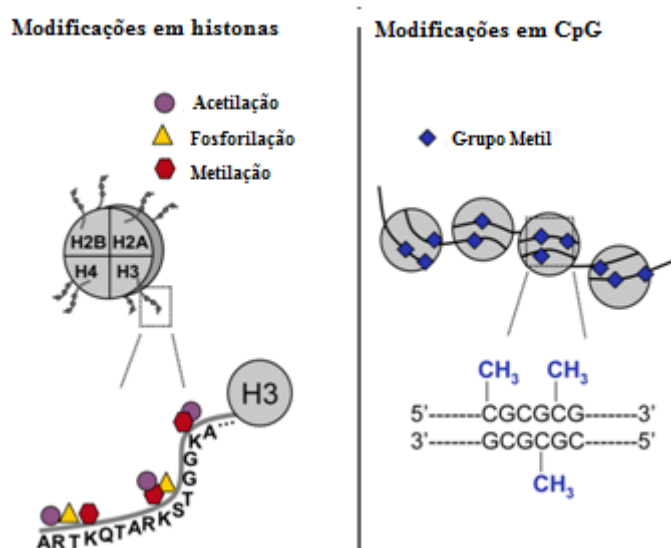


Figura 4. Modificações epigenéticas em histonas e em dinucleotídeos CpG

Adaptado de (Penner *et al.*, 2010).

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais estudados e está relacionado a uma interferência na transcrição gênica quando presente na região promotora. A metilação aberrante do DNA está relacionada em muitos casos à instabilidade cromossômica (Shaknovich, 2013). Tal mecanismo ocorre em geral em citosinas ligadas a uma guanina (Bird, 2002), denominadas dinucleotídeos CpGs, cuja maior parte se encontra metilada na espécie humana (Hellebrekers, Griffioen e Van Engeland, 2007).

O padrão de metilação nas ilhas CpG tem sido alvo de muitas análises por causa da sua habilidade em alterar a expressão do gene. A metilação do DNA é responsável pela inativação de um cromossomo X em mulheres e pelo *imprinting* genômico, fenômeno que ocorre na linhagem germinativa, em alguns genes, promovendo uma marcação origem-específica (paterna ou materna) e que leva a expressão do alelo de uma das origens e à inativação do alelo da outra origem (Li e Sasaki, 2011; Tomizawa e Sasaki, 2012).

O processo de metilação nas ilhas CpG envolve a transferência de um grupamento metil coordenada por enzimas denominadas metiltransferases Dnmt1 e Dnmt3, para o carbono 5 do anel de citosina, formando a 5-metilcitosina, a qual age em uma série de funções celulares (Figura 5).

A Dnmt1 reconhece substratos de DNA metilados em apenas uma das fitas (hemimetilados), o que permite a manutenção do padrão de metilação nas fitas recém-metiladas (Bird, 2002). Já a Dnmt3 é bastante expressa em células tronco-embrionárias e metila o DNA hemimetilado e também o não metilado (Yang, Yan e Davidson, 2001), e está relacionada com a metilação “*de novo*” e o estabelecimento de novos padrões de metilação (Chédin, 2011).

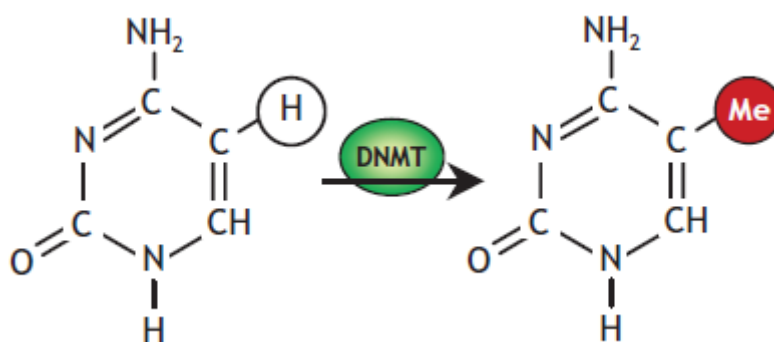


Figura 5. Conversão da citosina em 5-metilcitosina sob ação da enzima Dnmt

Adaptado de (Rodenhiser e Mann, 2006).

A formação da 5-metilcitosina depende da doação de um grupamento metil da S-adenosilmetionina (SAM) produto da via metabólica de remetilação da homocisteína a metionina (Figura 6), promovida pelas metilases.

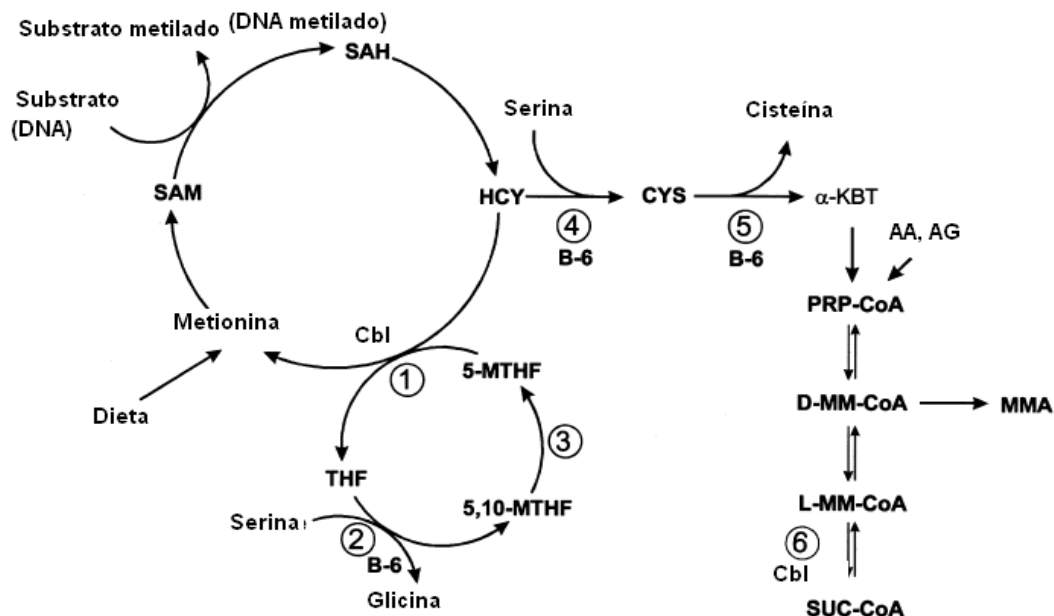


Figura 6. Via metabólica da remetilação da homocisteína e sua importância na metilação do DNA

1 – Metionina sintase; 2 – Serina hidroximetiltransferase; 3 – Metileno-tetra-hidrofolato-redutase; 4 – Cistationina-β-sintase; 5 – Cistationase ; 6 – Metilmalonil-CoA mutase .

Adaptado de (Herrmann *et al.*, 2001).

1.6 Estado Nutricional e Metilação do DNA

O padrão de metilação é estabelecido durante o desenvolvimento embrionário e teoricamente mantido durante a vida, mas se sabe que variações nutricionais podem levar a alterações no padrão de expressão gênica (Yoo e Jones, 2006).

A elevação da concentração sérica de homocisteína vem sendo relacionada a uma alteração na metilação do DNA (Guthikonda e Haynes, 2006). A homocisteína é um aminoácido não essencial sintetizado a partir da metionina. A hiperhomocisteinemia foi associada a ocorrências trombóticas (Kamat *et al.*, 2010), por ter a capacidade de induzir estresse oxidativo, levando a injúrias vasculares, promovendo mobilização de íons cálcio e uma inflamação crônica, com disfunção endotelial e remodelação da matriz extracelular, alterando parede vascular, função de plaquetas, com aumento da atividade do fator tecidual e inibição da atividade da trombosmodulina, levando a um estado pró-trombótico (Dionisio *et al.*, 2010). Além disso, foi relatado que a elevação na concentração de homocisteína pode levar a um

estado de hipometilação gênica em células endoteliais vasculares (Lee e Wang, 1999). Alterações na concentração da homocisteína podem estar associadas a fatores genéticos, tais como polimorfismos nas enzimas MTHFR, MTR, MTRR, CBS, e a fatores nutricionais, tais como deficiências em ácido fólico e cobalamina. Ademais, foi observada relação entre embriotoxicidade e alta concentração de homocisteína (Van Mil, Oosterbaan e Steegers-Theunissen, 2010), componente da via metabólica do folato (Figura 7).

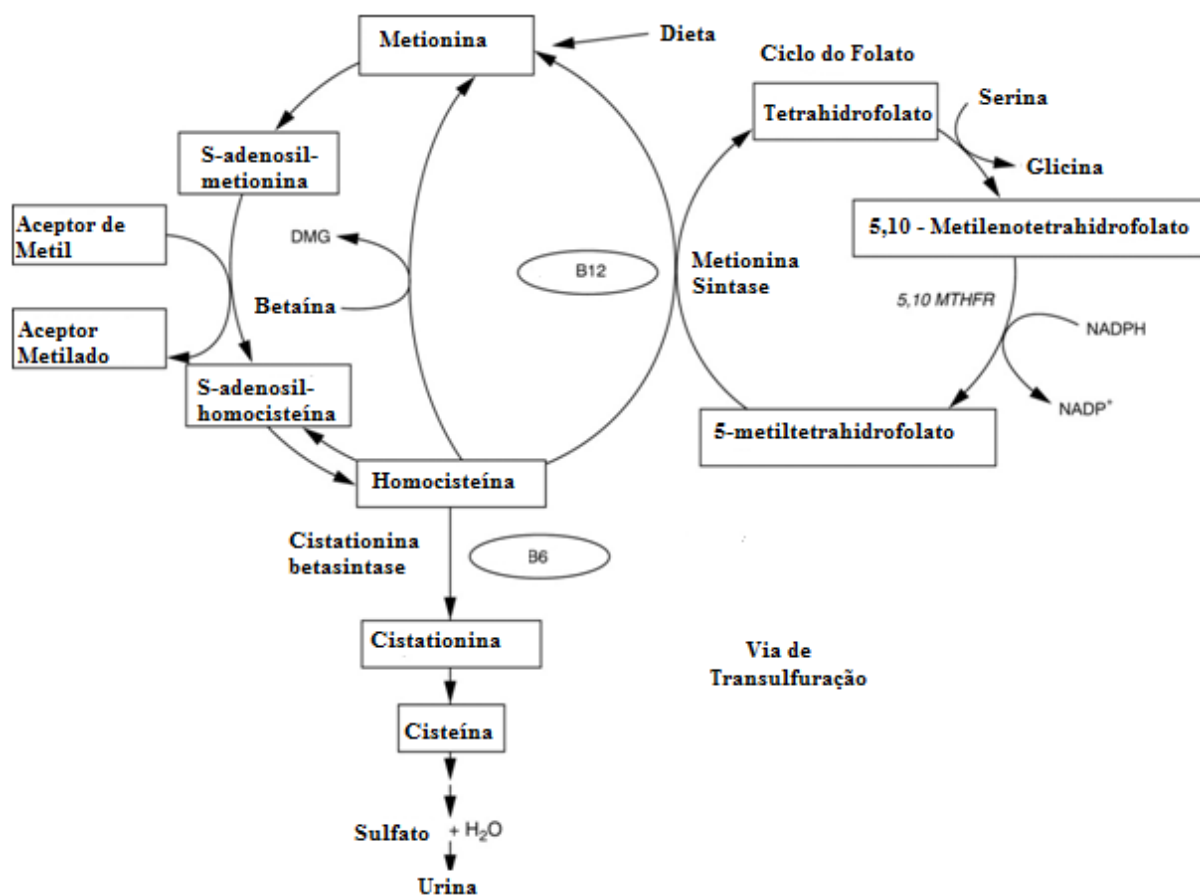


Figura 7. Via metabólica do folato e da homocisteína

Adaptado de (Robinson, 2000).

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel que desempenha um papel essencial no desenvolvimento embrionário, momento em que há aumento da necessidade de síntese de DNA, e o folato intermedeia a transferência de

grupamentos metil, síntese de purinas, formação do timidato e conversão de homocisteína a metionina (Fenech, 2011).

A cianocobalamina ou vitamina B12 tem como função atuar como coenzima na remetilação de homocisteína metionina e na conversão de metilmalonil-CoA a succinil-CoA (Guerra-Shinohara *et al.*, 2004; Stabler, 2013) Polimorfismos no gene da transcobalamina (enzima responsável pelo transporte de cobalamina até as células) (Figura 8), poderiam também levar a um quadro de hiperhomocisteinemia (Zetterberg, 2004; Nadir, Hoffman e Brenner, 2007; Guerra-Shinohara *et al.*, 2010);

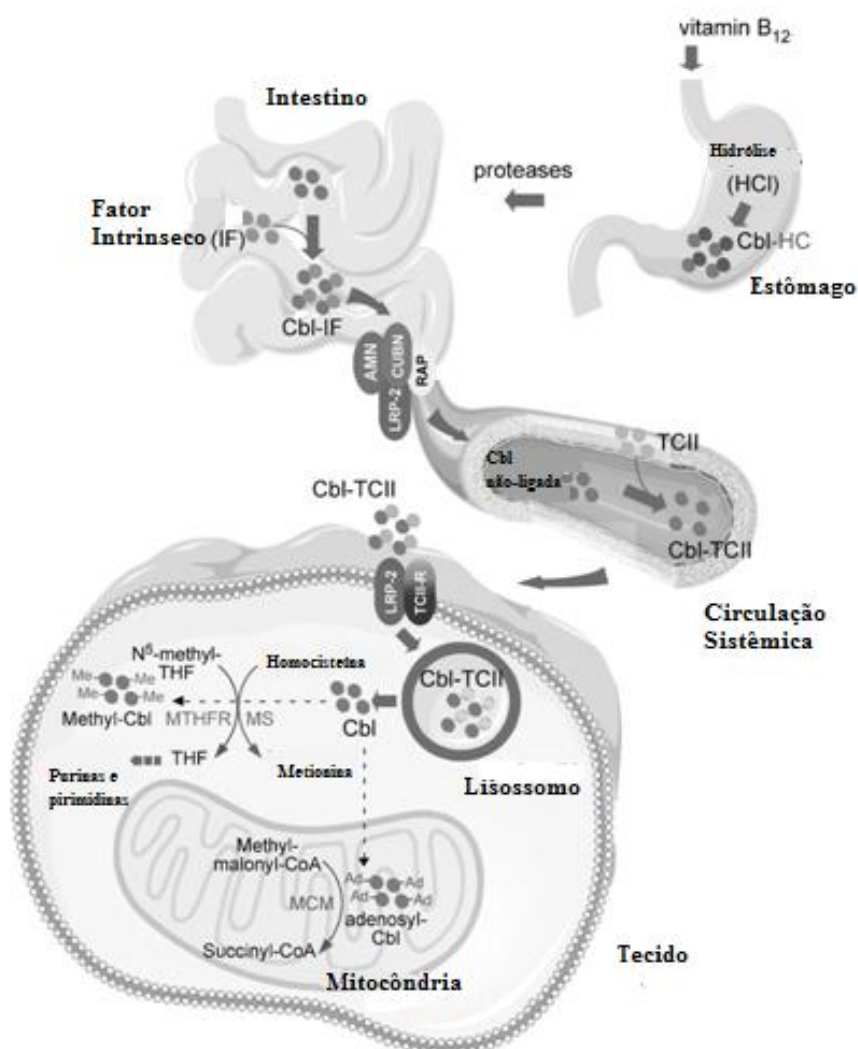


Figura 8. Via metabólica da cobalamina

Adaptado de (Dali-Youcef e Andrès, 2009).

O efeito da suplementação com doadores de grupo metil (combinado de ácido fólico, vitamina B12, colina e betaína) em camundongos foi um aumento da taxa de metilação nas ilhas CpG em locus específico para coloração amarela (Dolinoy, Weidman e Jirtle, 2007), mas a suplementação com ácido fólico em mulheres gestantes relacionou-se a uma menor taxa de metilação de ilhas CpG do gene *IFN γ* (Silva, 2010).

1.7 Seleção de Genes para o Estudo de Metilação do DNA

A escolha dos genes *IFNG* e *SFN* para avaliar a taxa de metilação do DNA na região promotora foi feita com base em estudos anteriores que mostraram que estes genes estão metilados em amostras de DNA de leucócitos (White *et al.*, 2002; Bonilla-Henao *et al.*, 2005a; Chim, S. S. C. *et al.*, 2005). A hipometilação do gene *IFNG* foi associada a um efeito tóxico à placenta, e, portanto, pode estar relacionada a um processo inflamatório na interface materno-fetal (Boehm *et al.*, 1997). O Stratifin (14-3-3-sigma) é um gene supressor de tumor cuja hipermetilação na região promotora está associada à ocorrência de câncer de mama (Umbricht *et al.*, 2001; Zurita *et al.*, 2010). Foi verificado que o aumento da homocisteína plasmática e a diminuição da vitamina B6 estão relacionados ao aumento taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *SFN* (Silva, 2010). Pacientes com anemia megaloblástica (por deficiência de cobalamina) apresentaram menor razão SAM/SAH (Guerra-Shinohara *et al.*, 2007), indicando que um menor aporte de cobalamina leva a um déficit na produção de SAM. Corroborando esta informação, recém-nascidos de mães deficientes em cobalamina apresentaram menor razão SAM/SAH e maior concentração de tHcy (Guerra-Shinohara *et al.*, 2004).

Entende-se, pois, que a avaliação dos fatores nutricionais envolvidos na formação de doador de grupamentos metil (SAM), utilizados fundamentalmente para as reações de metilação no DNA, que, por sua vez, está relacionada à regulação da transcrição gênica, faz-se muito importante no estudo de genes em que alterações no padrão de metilação poderiam levar a uma modificação da resposta imune em mulheres com história de abortos recorrentes em comparação a mulheres com gestações normais sem história de aborto.

Foram identificados diversos polimorfismos em genes de citocinas e em receptores de citocinas relacionados ao aborto recorrente (Reid *et al.*, 2001; Daher *et al.*, 2003; Medica *et al.*, 2009), apesar de serem recorrentes as contradições nos resultados (Bombell e Mcguire, 2008; Choi e Kwak-Kim, 2008)- Vários estudos investigaram as concentrações sanguíneas (Daher *et al.*, 2004). Entretanto, pouco se sabe a respeito das concentrações basais das citocinas em mulheres com história de aborto recorrente, bem como das razões entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. A importância do presente estudo é a de acessar as características basais em nível sérico e verificar se este já é previamente alterado em comparação ao das mulheres que nunca enfrentaram AER. Pois apesar de a expressão de citocinas se destacar frente a um processo inflamatório e voltar a concentrações basais em pouco tempo, um desequilíbrio crônico poderia estar envolvido no desenvolvimento do aborto recorrente.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as concentrações dos mediadores da resposta inflamatória e das taxas de metilação do DNA na região sítio-específica do gene *IFNG* em leucócitos de sangue periférico de mulheres com história de abortos recorrentes e de mulheres saudáveis (grupo controle).

Objetivos Específicos

- Avaliar as concentrações dos mediadores inflamatórios nos três grupos, bem como as razões entre as citocinas ($IFN\gamma/IL\ 4$, $IFN\gamma/IL\ 10$, $TNF\alpha/IL\ 4$ e $TNF\alpha/IL\ 10$)
- Determinar se existe correlação entre as concentrações vitaminas (Cbl e folato), tHcy e taxa de metilação na região promotora do gene *IFNG* nos três grupos
- Determinar se existe correlação entre as concentrações de citocinas e taxa de metilação na região promotora do gene *IFNG* nos três grupos
- Avaliar se as concentrações de $IFN\gamma$ estão relacionadas com alterações da taxa de metilação do DNA nos três grupos
- Determinar *odds ratio* (IC95%) de ter aborto primário e secundário, em modelo multivariado, considerando como variáveis independentes: idade, uso de bebidas alcoólicas, fumo, IMC, PCRu, vitaminas, tHcy e citocinas

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

No projeto que serve como base para o presente estudo, foi utilizado cálculo para determinação do tamanho amostral com estudo analítico para estimação de diferença de proporções entre os grupos (Hulley e Cummings, 1988). Considerando a estimativa da frequência de genótipo *MTHFR* 677TT de 10% em mulheres controles e de 17% em mulheres com história de aborto espontâneo recorrente (Unfried *et al.*, 2002), fixando alfa de 5% (erro tipo I) e beta (erro tipo II) em 20% (poder do teste de 80%), obtendo-se desse modo, um número amostral de 371 mulheres em cada grupo como amostra representativa para comparação da frequência do genótipo TT do polimorfismo *MTHFR* C677T entre controles e casos.

No entanto, por conta da dificuldade de encontrar casos de aborto recorrente foram incluídas no estudo apenas 257 mulheres com história de aborto espontâneo recorrente (sendo 118 com aborto primário - AP e 139 com aborto secundário - AS), atendidas no Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e 264 mulheres saudáveis com até 45 anos, com dois ou mais filhos de gestações normais, sem história de abortos. No momento da coleta, as mulheres não estavam grávidas. Todas as mulheres foram informadas sobre os objetivos do projeto, e, tendo aceitado participar do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Aplicou-se, também, um questionário para obtenção de dados sócio-econômicos e informações sobre idade, IMC, antecedentes obstétricos, uso de medicamentos, bebidas alcoólicas e tabagismo. As amostras foram colhidas de veias periféricas em jejum, com material descartável. Alíquotas de cada amostra foram acondicionadas em dois tubos Vacutainer® com K₃EDTA e em dois tubos Vacutainer® sem anticoagulante para obtenção do soro. A coleta foi realizada uma única vez para cada mulher e o volume total de sangue foi de 30 mL.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no grupo de estudo mulheres com três ou mais abortos espontâneos consecutivos e com idade inferior a 45 anos. No grupo controle foram incluídas mulheres com idades semelhantes ao do grupo de estudo, com história de duas ou mais gestações normais, com nascimentos de bebês de termo, e que não tenham tido história de abortos ou natimortos, episódios tromboembólicos ou problemas obstétricos na gravidez.

Foram excluídas do presente estudo as mulheres grávidas e aquelas que estavam fazendo uso de medicamentos contendo ácido fólico e vitamina B6 ou medicamentos que possam interferir no ciclo do folato. Foram excluídas também mulheres portadoras de doenças crônicas.

O presente projeto faz parte de um projeto maior, intitulado “FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE – Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6”, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Anexos I a V).

3.3 Extração de DNA de leucócitos

O DNA genômico foi extraído manualmente a partir de sangue total através do protocolo *QIAamp® DNA BLOOD MINI* kit (PreAnaytix/Qiagen, Germany). A integridade das amostras do DNA extraído foi avaliada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Sambrook et al, 2001a). A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (Sambrook e Russell, 2001), utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc – Estados Unidos).

3.4 Determinação da taxa de metilação na região promotora do gene IFNG

3.4.1 Tratamento do DNA com Bissulfito de Sódio

Foi realizado tratamento do DNA com bissulfito de sódio conforme previamente descrito (Jeronimo *et al.*, 2004). O bissulfito de sódio converte as citosinas não metiladas em uracilas, não alterando as citosinas metiladas. A 2 µg de DNA genômico dissolvidos em um volume final de 17µL de água foram adicionados 1 µL de *Hering DNA* (5mg/ml) e 2 µL de NaOH 3 M. Esta mistura foi incubada por 20 minutos a 50°C. Então, foram adicionados 500µL de solução de Bissulfito de Sódio (2,5 M de Bissulfito de Sódio, 125 mM de Hidroquinona e 350 mM de NaOH) e as amostras foram incubadas por 3 horas a 50°C na ausência de luz. O DNA tratado foi purificado com o kit *Wizard DNA Clean-up System* (Promega), eluído em 45 µL de água e dessulfonado através da adição de 5 µL de NaOH 3 M, e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Fez-se precipitação com etanol, ressuspensão em 50 µL de água e posteriormente foram estocados a -80°C.

3.4.2 Metilação *in vitro* de DNA de leucócitos

Dez mililitros de sangue periférico de cinco indivíduos saudáveis foram submetidos a centrifugação por 10 minutos a 1.500 RPM para separação do soro e da porção celular. À porção celular foram adicionados 10 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0) para lise das hemácias. Após centrifugação a 1.500 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi submetida a nova lavagem com 10 mL de TE. O *pellet* de leucócitos foi ressuspenso em 1 mL de TE. Os leucócitos foram transferidos para tubo de 1,5 mL e submetidos a centrifugação por 1 minuto a 13.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de leucócitos armazenado a -70°C até o momento de utilização

A metilação *in vitro* do DNA de leucócitos foi realizada com o kit *CpG Methylase-SssI* (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante. 20 µg de DNA foram misturados a 0,032 mM de SAM e 25 unidades da enzima metilase, em um volume final da reação de 250 µL. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C. Posteriormente, adicionaram-se 0,064 mM de SAM e 12,5 unidades da enzima metilase. Após nova incubação de 4 horas a 37°C, as amostras foram submetidas a

extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Os *pellets* de DNA metilado *in vitro* foram ressuspensos em 15 μL de água e estocados a -20°C .

Vinte microgramas do DNA metilado *in vitro* (10 alíquotas de 2 μg) foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrito anteriormente (Jeronimo et al., 2001). Ao final todas as alíquotas foram ressuspendidas em um volume final de 50 μL de água, quantificadas em espectrofotômetro e diluídas para uma concentração final de 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

O DNA de leucócitos metilado *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio foi empregado como controle positivo e na construção das curvas padrão das reações de qMSP.

3.4.3 Construção da Curva Padrão

Após ter realizado a metilação *in vitro* do DNA de leucócitos e o tratamento com bissulfito de sódio, foi preparada a curva padrão. A amostra metilada *in vitro* e tratada foi quantificada e a partir, dela, construiu-se o primeiro ponto da curva, a fim de se obter um volume de 10 μL a uma concentração de 30 $\text{ng}/\mu\text{L}$. A partir deste primeiro microtubo (que corresponde ao primeiro ponto da curva padrão), foi feita uma diluição seriada, a ponto de se obter os 5 pontos seguintes da curva, respectivamente 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 de diluição.

Foi feita a corrida da placa com o gene de referência *ACTB* para testar a curva e acertar os parâmetros, e também foram feitos testes com os genes estudados para verificar se houve amplificação (Figura 9).

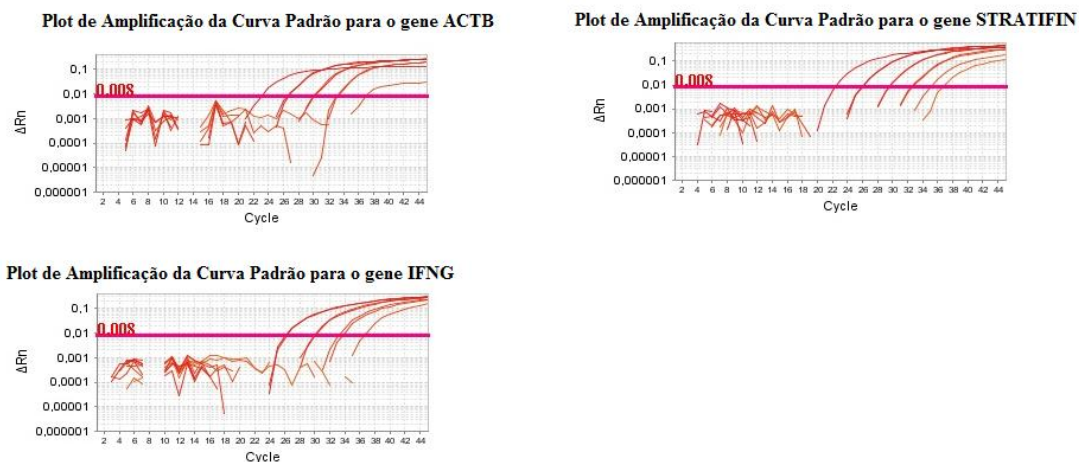


Figura 9. Amplificação da Curva Padrão para os genes *ACTB*, *IFNG* e *STRATIFIN*

3.4.4 Metilação específica quantitativa (qMSP - quantitative Methylation Specific PCR)

As reações de qMSP foram realizadas conforme prévia descrição (Eads *et al.*, 2000).

A qMSP é uma abordagem quantitativa baseada em PCR em tempo real, em que se utilizam um par de *primers* e uma sonda específica marcada com 2 fluoróforos: um *reporter* (6-carboxi-fluoresceína – FAM) na extremidade 5' e um *quencher* (6-carboxi-tetrametil-rodamina – TAMRA) na extremidade 3'. O *reporter* é um emissor de fluorescência, a qual é captada pelo *quencher* devido à proximidade entre ambos. Durante a fase de extensão da reação de PCR, a atividade de exonuclease 5' da *Taq DNA Polimerase* hidrolisa a sonda, separando o *reporter* do *quencher* e, assim, a fluorescência emitida pode ser captada pelo aparelho. Portanto, o nível de fluorescência detectado pelo aparelho é proporcional à quantidade de produto amplificado formado. A quantidade de amostra presente no início da reação pode ser inferida tendo como base o valor de C_T , o qual representa o ciclo da PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. Para que as amostras pudessem ser quantificadas foi necessário construir uma curva padrão a partir de diluições seriadas de uma amostra com quantidade conhecida de DNA.

Como controle interno das reações foi utilizado o gene referência *ACTB*, cujos *primers* e sonda foram desenhados em região livre de nucleotídeos “CG”, e, portanto, a amplificação do gene referência ocorre independente do estado de metilação da amostra. As seqüências dos *primers* e sondas para os genes *IFNG* e Stratifin que possuem “CGs” foram o desenhadas com base nas seqüências das regiões promotoras destes genes considerando somente a situação metilada de acordo com estudos citados na literatura ((Bonilla-Henao *et al.*, 2005b; Chim, S. S. *et al.*, 2005) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequências de primers e sondas dos genes utilizados

Gene	Localização Cromossômica		
ACTB	7p22	<i>Primer Forward</i>	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT
		<i>Primer Reverse</i>	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
		<i>Sonda</i>	FAM/ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA/TAMRA
IFNG	12q14	<i>Primer Forward</i>	TGAAGAGTTATAATTTTATTAGGGCGAA
		<i>Primer Reverse</i>	TTCCTTTAAACTCCTTAAATCCTTTAACG
		<i>Sonda</i>	FAM/ACAAACCCATTATACCCACCTA/TAMRA
SFN	1p36.11	<i>Primer Forward</i>	GAGGAGGGTTCGGAGGAGAA
		<i>Primer Reverse</i>	ATCGCACACGCCCTAAAACCT
		<i>Sonda</i>	FAM/TCTCCCGATACTCACGCACCTCGAA/TAMRA

As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20µL contendo tampão *Home Made* 1X (sulfato de amônio 16,6mM, Tris-HCl pH8,0 67mM, cloreto de magnésio 6,7mM, β-mercaptoetanol 10mM, DMSO 0,1%), 10mM de dNTP, 100µM de cada um dos *primers*, 100nM de sonda, 0,12 µL de *Platinum Taq Polimerase (Invitrogen)* e 3µL de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação consistem de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C

por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 40 segundos. Todas as reações foram preparadas em placas de *96-wells* e todas as amostras foram analisadas em triplicatas no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Além das amostras, cada placa também comportou uma curva padrão construída a partir de uma diluição seriada (90ng; 9ng; 0,9ng; 0,09ng; 0,009ng e 0,0009ng) de DNA de leucócitos metilados *in vitro* e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio.

Antes da realização das reações de qMSP foram verificadas as eficiências de amplificação de todos os conjuntos de *primers* e sondas. Para tanto, foram construídas curvas padrão para cada um dos genes, incluindo o gene referência *ACTB*. Essas curvas foram construídas a partir de uma diluição seriada (como descrita acima) de uma mesma amostra de DNA de leucócitos metilados *in vitro*. Após a amplificação a eficiência foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, onde E é a eficiência e *slope* é o coeficiente de inclinação da reta formada pelos pontos da curva padrão. As eficiências de amplificação para os conjuntos de *primers* e sondas foram consideradas adequadas quando os valores foram de 100±10%.

No método qMSP foi adotado o seguinte critério: as amostras foram consideradas metiladas quando foi possível detectar amplificação em pelo menos duas das triplicatas. A ausência de amplificação ou amplificação de apenas uma das triplicatas indicava que a amostra era não-metilada. A porcentagem de metilação relativa (PMR) de cada amostra foi calculada através da divisão da média do número de cópias do gene alvo pela média do número de cópias do gene referência vezes 100, em cada gene estudado.

3.5 Determinação da concentração sérica de citocinas

A dosagem sérica das citocinas IL1 β , IFN γ , IL4, IL6, IL10 e TNF α foi realizada por método imunoenzimático (ELISA), com kits Ebioscience (San Diego, CA, USA), conforme protocolo especificado pelo fabricante. O limite de detecção foi de 7 pg/mL.

3.6 Determinação das concentrações de folato sérico e cobalamina sérica

A determinação da concentração de cobalamina (Kelleher *et al.*, 1987; Kelleher e Broin, 1991) e folato sérico (O'broin e Kelleher, 1992) foi realizada por método microbiológico, em que se utilizam bactérias não patogênicas que necessitam dessas vitaminas para seu crescimento, que é proporcional à turvação quantificada por um fotômetro (MultiSkan FC da ThermoScientific®).

3.7 Determinação da concentração de proteína C-reativa ultra-sensível (PCRu)

Foi realizada através da técnica de imunoturbidimetria (pelo Laboratório CRIESP), a qual se baseia na detecção óptica de partículas suspensas. Quando o anticorpo anti-proteína C reativa humana que reveste as partículas de látex reage com a PCR presente na amostra, são formados imunocomplexos insolúveis, que provocam aglutinação e turbidez, a qual pode ser mensurada em espectrofotômetro. Tal turbidez é proporcional à concentração de PCRu na amostra.

3.8 Determinação da concentração de homocisteína total e cisteína plasmáticas

A homocisteína plasmática total foi determinada por HPLC com detecção por fluorescência, conforme descrito por (Pfeiffer, Huff e Gunter, 1999; Guerra-Shinohara *et al.*, 2002). Resumidamente, a 50 µL de plasma são adicionados cistamina (padrão interno) tris-[2-carboxietil]-fosfina (TCEP), para reduzir e liberar as ligações tióis, seguido de incubação em temperatura ambiente. Adicionam-se ácido tricloroacético (TCA) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para desproteínização da amostra, e centrifuga-se por 13000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante é transferido para microtubo âmbar, e é adicionado o fluoróforo 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid ammonium salt (SBD-F) em tampão borato, incuba-se por 1 hora a 60°C sob agitação. Transfere-se para vials de HPLC. As condições da corrida são: coluna Prodigy ODS2 150x3,2mmx2µm (Phenomenex), fluxo 0,7 mL/min e fase móvel pH 5,5 com ácido acético 0,1M e

acetato de sódio 0,1M (1:1), com 3% de metanol e detecção por fluorescência (385 nm excitação e 515 nm emissão).

3.9 Análise Estatística

O banco de dados e as análises estatísticas foram realizados no programa SPSS versão 17 (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os gráficos foram construídos no programa GraphPad Prism 5 (California, EUA). Foi avaliado se as variáveis obedecem a uma distribuição normal através do teste de aderência Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizadas tabelas de frequência de variáveis categóricas e estatísticas descritivas das variáveis contínuas para descrição do perfil do grupo estudado. Foram utilizados testes que comparam proporções (Qui-quadrado, teste Exato de Fisher ou *Likelihood*), bem como o teste t de *Student* para verificação de diferenças nas variáveis numéricas entre os grupos. Para as variáveis numéricas que não obedeceram à distribuição normal, foram utilizados testes não-paramétricos como Mann-Whitney, para comparação de variáveis entre dois grupos, e Kruskal-Wallis, para comparação de variáveis entre três ou mais grupos.

Correlações de Spearman foram utilizadas para avaliar a relação entre as taxas de metilação na região promotora do gene IFN γ e também para verificar as correlações entre as concentrações de vitaminas e metabólitos com as taxas de metilação.

Modelos de regressão linear foram utilizados para avaliar os fatores de predição para as taxas de metilação na região promotora do gene IFN γ (variáveis dependentes), e outros modelos de regressão foram utilizados para avaliar os fatores de predição para a ocorrência de AER (variável dependente). As variáveis independentes incluídas nos modelos foram cobalamina sérica, folato sérico, homocisteína total, PCRu, IMC e idade.

Análise de Curva ROC foi realizada para verificar quais modelos discriminam melhor os grupos quanto aos resultados observados. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

Modelos de regressão logística foram utilizados para avaliar o risco da ocorrência de aborto.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados referem-se às análises realizadas entre os grupos de aborto primário, aborto secundário e controle. Em alguns momentos, no entanto, foram realizadas comparações entre o grupo de aborto (primário e secundário) e o grupo controle.

4.1 Características da população estudada

Verificou-se que os três grupos (AP, AS e C) apresentaram-se semelhantes quanto às variáveis IMC, frequência de obesidade ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) fumo e uso de bebidas alcoólicas (Tabela 3), e diferentes com relação à idade, sendo as mulheres com aborto secundário mais velhas que as dos demais grupos, entretanto, essa diferença é de 2,6 anos entre AP e AS. Além disso, houve diferença na cor da pele declarada, observando-se uma maior porcentagem de brancas no grupo controle que nos demais. Entretanto, atenta-se ao fato deste último dado ser pouco relevante em um estudo realizado no Brasil, por conta da forte presença de miscigenação na população.

Tabela 3 - Características sócio-demográficas da população estudada

	Aborto Primário (117)	Aborto Secundário (139)	Controle (264)	p
Idade	31,1 (30,5 - 32,8) ^a	33,7 (32,7 - 34,7) ^b	32,9 (32,2 - 33,6) ^{a,b}	0,032
IMC	24,4 (22,2 - 28,6)	25,3 (22,7 - 29,6)	24,6 (22,1 - 27,3)	0,125
(IMC>30 kg/m²)	54 (46,6)	74 (53,6)	119 (45,1)	0,255 ⁽¹⁾
Fumo	18 (15,4)	31 (22,3)	40 (15,2)	0,169 ⁽¹⁾
Uso de bebidas alcoólicas	55 (47,0)	57 (41,0)	95 (36,0)	0,121 ⁽¹⁾
Cor da pele declarada				
Branca	52 (44,4)	56 (40,3)	144 (54,5)	0,022⁽²⁾
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)	
India	0 (0,0)	1 (0,7)	0 (0,0)	
Número de Abortos Consecutivos				
Até 3	64 (54,7)	73 (52,5)	-	0,762 ⁽²⁾
4 e 5	41 (35,0)	56 (40,3)	-	
6 e 7	8 (6,8)	6 (4,3)	-	
8 e 9	3 (2,6)	2 (1,4)	-	
≥ 10	1 (0,9)	2 (1,4)	-	

Os valores das variáveis numéricas idade e IMC foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis para os 3 grupos, e os resultados foram apresentadas em média geométrica e IC 95%. As variáveis categóricas foram comparadas utilizando os testes de Qui-quadrado⁽¹⁾ ou Likelihood Ratio⁽²⁾, e os resultados das frequências foram apresentados em número de mulheres e porcentagem entre parenteses.

4.1.1 Modelos de regressão logística univariada para as variáveis dependentes “ter aborto primário” e “ter aborto secundário”

Foram utilizados 5 modelos de regressão logística univariada para a variável dependente “ter aborto primário” e cinco modelos para a variável dependente “ter aborto secundário”.

O uso de bebidas alcoólicas se mostrou relevante no aumento do risco de AP em comparação com o grupo controle e o IMC aumentou o risco de AS em comparação com o grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Regressão Logística univariada para a variável dependente "ter aborto primário" (modelos 1) e "ter aborto secundário" (modelos 2)

Modelo	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	p
1			
1.a	Idade	1,04 (1,00 - 1,08)	0,044
1.b	IMC	0,96 (0,91 - 1,02)	0,181
1.c	IMC>30 kg/m ²	1,08 (0,70 - 1,69)	0,732
1.d	Fumo	0,93 (0,50 - 1,73)	0,813
1.e	Bebidas Alcoólicas	1,64 (1,05 - 2,58)	0,030
2			
2.a	Idade	0,98 (0,95 - 1,02)	0,409
2.b	IMC	0,94 (0,90 - 1,00)	0,014
2.c	IMC>30 kg/m ²	1,28 (0,90 - 1,81)	0,164
2.d	Fumo	1,30 (0,81 - 2,07)	0,274
2.e	Bebidas Alcoólicas	1,41 (0,98 - 2,01)	0,061

Foram realizadas cinco regressões univariadas para cada modelo, identificadas por letras de **a** a **e**. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos e estão destacados em negrito.

4.2 Concentração de vitaminas e homocisteína total

Mulheres dos grupos AP e AS apresentaram maior concentração de folato sérico que o grupo controle (Tabela 5), o que é explicado pelo fato de que muitas

dessas mulheres permanecem utilizando ácido fólico por conta própria enquanto tentam engravidar. Além disso, também apresentaram também maior concentração de cobalamina em comparação ao grupo controle, apesar de não relatarem uso suplementar desta vitamina (Figura 10).

Tabela 5 - Concentração de vitaminas e homocisteína total conforme os grupos

	Aborto Primário (117)	Aborto Secundário (139)	Controle (264)	P valor
Homocisteína total ($\mu\text{mol/L}$)	9,1 (8,7 - 9,6)	9,4 (8,9 - 10,0)	9,2 (8,9 - 9,6)	0,896
Cobalamina (pmol/L)	424,2 (394,8 - 455,6) ^a	398,9 (369,4 - 430,7) ^a	355,0 (335,5 - 375,6) ^b	<0,001
Folato sérico (nmol/L)	41,0 (36,7 - 45,8) ^a	33,4 (30,6 - 36,6) ^a	29,2 (27,7 - 30,7) ^b	<0,001

Os valores apresentados são médias geométricas (IC 95%). Kruskal Wallis. * $p < 0,05$. Quando houve diferença significativa no teste de Kruskal Wallis, foi realizado o teste post hoc de Dunn's. Letras diferentes nas linhas correspondem a diferenças entre os grupos.

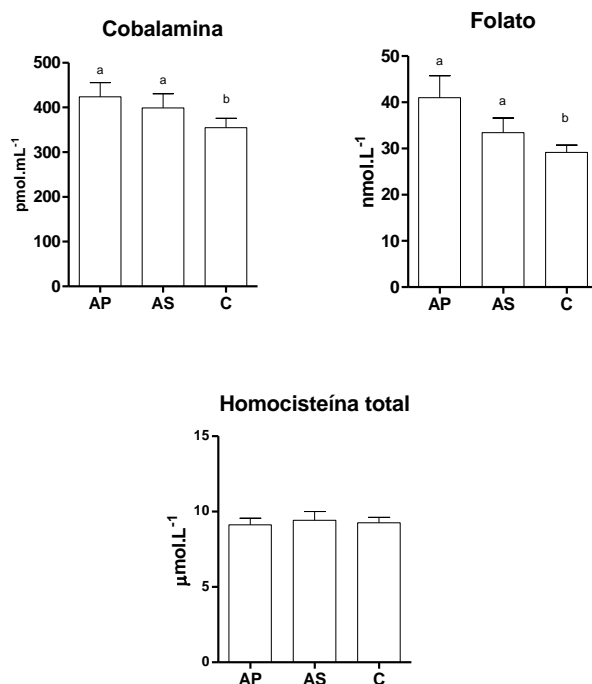


Figura 10. Comparação da concentração sérica de vitaminas e homocisteína total entre os grupos aborto primário (AP, N=117), aborto secundário (AS, N=139) e controle (C, N=264).

Os valores apresentados são médias geométricas (IC 95%). Kruskal Wallis. * $p < 0,05$. Quando houve diferença significativa no teste de Kruskal Wallis, foi realizado o teste post hoc de Dunn's. Letras diferentes nas colunas correspondem a diferenças entre os grupos.

4.3 Concentração de marcadores do processo inflamatório

Quando comparados os três grupos juntos, mulheres dos grupos de aborto primário e secundário apresentaram-se com valor significativamente maior que o grupo controle na concentração da citocina TNF α . As mulheres do grupo de aborto secundário apresentaram valores maiores que o grupo controle nas concentrações de INF γ , IL1 β , IL4 e IL6. Não houve diferença nas concentrações de IL10 nos três grupos (Tabela 6 e Figura 11). A concentração de PCRu e de tHcy foi semelhante nos 3 grupos. O valor referente à porcentagem de metilação do DNA no gene *IFNG* foi semelhante em ambos os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração de marcadores do processo inflamatório conforme os grupos AP, AS e controle

	Aborto Primário (117)	Aborto Secundário (139)	Controle (264)	P valor
PCR Ultrasensível (mg/dL)	0,17 (0,13 - 0,21)	0,18 (0,14 - 0,21)	0,16 (0,14 - 0,18)	0,534
PMR <i>IFNG</i>	83,0 (69,1 - 99,9)	80,4 (70,0 - 92,3)	92,0 (84,4 - 100,1)	0,552
IFN γ (pg/mL)	54,2 (39,5 - 74,5) ^{a,b}	83,5 (63,0 - 110,6) ^a	37,7 (20,5 - 46,6) ^b	<0,001
IL1 β (pg/mL)	22,4 (18,0 - 27,8) ^{a,b}	29,0 (23,8 - 35,2) ^a	19,0 (16,4 - 22,0) ^b	0,004
IL4 (pg/mL)	16,3 (13,6 - 19,6) ^{a,b}	19,7 (16,5 - 23,4) ^a	14,8 (13,1 - 16,6) ^b	0,016
IL6 (pg/mL)	18,4 (15,0 - 22,5) ^{a,b}	21,9 (18,4 - 26,1) ^a	16,4 (14,6 - 18,3) ^b	0,009
IL10 (pg/mL)	23,2 (18,0 - 29,9)	26,4 (20,8 - 33,7)	25,1 (21,2 - 29,7)	0,794
TNF α (pg/mL)	71,6 (53,8 - 95,2) ^a	82,4 (64,4 - 105,4) ^a	48,4 (40,6 - 57,8) ^b	<0,001

Os valores apresentados são médias geométricas (IC 95%). A comparação das variáveis entre os grupos foi realizada utilizando o teste Kruskal Wallis. * $p < 0,05$. Quando houve diferença significativa no teste de Kruskal Wallis, foi realizado o teste post hoc de Dunn's. Letras diferentes nas linhas correspondem a diferenças entre os grupos.

Quando foram analisados os dois grupos de aborto em conjunto (N=256) em comparação ao grupo controle, foi verificado que as concentrações das citocinas IFN γ , IL1 β , IL4, IL6 e TNF α foram maiores no grupo de aborto que no grupo controle (Tabela 7). Além disso, foram avaliadas também as razões entre citocinas pró e anti-inflamatórias (Tabela 8) e verificou-se que o grupo controle apresentou maiores razões IL4/IFN γ e IL10/IFN γ que os grupos de aborto.

Tabela 7 - Concentração de marcadores do processo inflamatório entre grupos de aborto recorrente (AP + AS) e controle

	(AP + AS) N=256	Controle N=264	P valor
PCR Ultrasensível (mg/dL)	0,2 (0,15 - 0,20)	0,2 (0,1 - 0,2)	0,288
PMR <i>IFNG</i>	81,5 (72,8 - 91,3)	91,9 (84,4 - 100,1)	0,292
IFN γ (pg/mL)	68,2 (55,2 - 84,4)	37,7 (30,5 - 46,6)	<0,001
IL1 β (pg/mL)	25,8 (22,3 - 29,8)	19,0 (16,4 - 22,0)	0,003
IL4 (pg/mL)	18,2 (15,9 - 20,6)	14,7 (13,1 - 16,6)	0,012
IL6 (pg/mL)	20,2 (17,7 - 23,0)	16,3 (14,6 - 18,3)	0,008
IL10 (pg/mL)	25,0 (21,0 - 29,8)	25,1 (21,2 - 29,7)	0,969
TNF α (pg/mL)	78,0 (64,7 - 93,9)	48,4 (40,6 - 57,8)	<0,001

Os valores apresentados são médias geométricas (IC 95%). A comparação das variáveis entre os grupos foi realizada utilizando o teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

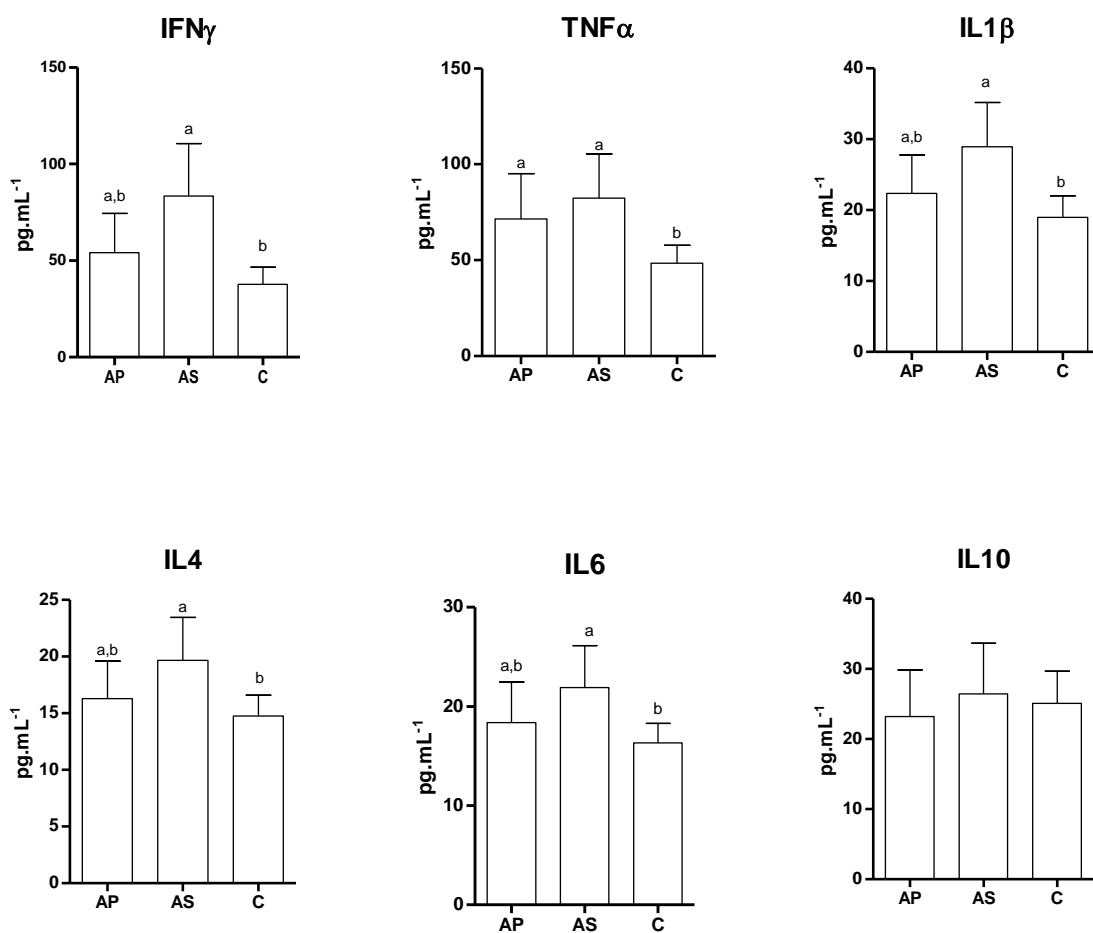


Figura 11. Comparação da concentração sérica de citocinas entre os grupos aborto primário (AP, N=117), aborto secundário (AS, N=139) e controle (C, N=264).

Os valores apresentados são médias geométricas (IC 95%). Kruskal Wallis. * $p < 0,05$. Quando houve diferença significativa no teste de Kruskal Wallis, foi realizado o teste post hoc de Dunn's. Letras diferentes correspondem a diferenças entre os grupos

Tabela 8 - Razões entre citocinas Th2/Th1 conforme os grupos

	Aborto Primário (117)	Aborto Secundário (139)	Controle (264)	P valor
Razão IL10/IFNγ	0,25 (0,00-1,00)	0,60 (0,00-1,00)	1,00 (0,00-3038,3)	0,011
Razão IL10/TNFα	0,25 (0,00-1,00)	0,44 (0,00-1,00)	0,65 (0,00-1,06)	0,063
Razão IL4/IFNγ	0,22 (0,00-1,00)	0,18 (0,00-1,00)	1,00 (0,00-1,00)	0,030
Razão IL4/TNFα	0,20 (0,06-1,00)	0,25 (0,08-0,71)	0,28 (0,10-1,00)	0,112

Os valores das variáveis numéricas foram comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis para os 3 grupos, Os valores foram multiplicados por fator 10 e estão apresentados como media geométrica (IC 95%).

4.4 Avaliação dos fatores de risco para a ocorrência de aborto recorrente

Após a avaliação individual das variáveis nos diferentes grupos, procurou-se identificar os fatores de risco para o aborto recorrente. Para tanto, a regressão logística multivariada é uma análise robusta que visa pontuar o risco do desfecho “aborto”, com base nas variáveis selecionadas.

4.4.1 Modelos de regressão logística multivariada para a variável dependente “ter aborto primário” (Modelo 1) e “ter aborto secundário” (modelo 2)

No primeiro modelo multivariado apresentado, destacam-se a citocina pró-inflamatória TNF α para o desfecho AP e a IL6 para o desfecho AS sem, entretanto, aumentar o risco (Tabela 9). O mesmo ocorre para os modelos em que as razões entre citocinas Th1/Th2 são utilizadas, em que se destaca a razão TNF α /IL10 para o desfecho “AP” sem, no entanto, aumentar o risco de forma significativa (Tabela 10).

Tabela 9 - Regressão Logística multivariada (modelo enter) para a variável dependente "ter aborto primário" (modelo 1) e "ter aborto secundário" (modelo 2)

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	p
1	IFN γ (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,468
	IL1 β (pg/mL) x 10	1,00 (0,99 - 1,00)	0,401
	IL4 (pg/mL) x 10	1,00 (0,99 - 1,02)	0,466
	IL6 (pg/mL) x 10	1,01 (1,00 - 1,01)	0,191
	IL10 (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,104
	TNF α (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,010
2	IFN γ (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,205
	IL1 β (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,862
	IL4 (pg/mL) x 10	1,01 (1,00 - 1,02)	0,651
	IL6 (pg/mL) x 10	1,01 (1,00 - 1,02)	0,077
	IL10 (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,040
	TNF α (pg/mL) x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,079

Modelo 1: foram incluídos os grupos de aborto primário e controle. Modelo 2: foram incluídos os grupos de aborto secundário e controle.

Tabela 10 - Regressão Logística multivariada (modelo enter) para a variável dependente "ter aborto primário" (modelo 1) e "ter aborto secundário" (modelo 2)

Modelos	Variáveis Independentes	OR (IC 95%)	p
1	Razão IFN γ /IL4 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,150
	Razão IFN γ /IL10 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,190
	Razão TNF α /IL4 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,779
	Razão TNF α /IL10 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,037
2	Razão IFN γ /IL4 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,855
	Razão IFN γ /IL10 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,194
	Razão TNF α /IL4 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,360
	Razão TNF α /IL10 x 10	1,00 (1,00 - 1,00)	0,327

Modelo 1: foram incluídos os grupos de aborto primário e controle. Modelo 2: foram incluídos os grupos de aborto secundário e controle.

4.5 Avaliação da Taxa de Metilação do DNA

4.5.1 Correlação entre as taxas de metilação do DNA e concentrações das variáveis bioquímicas

A associação entre a taxa de metilação do DNA no gene *IFNG* e as variáveis bioquímicas foi avaliada conforme os grupos (aborto primário, aborto secundário e controle). Na tabela 11 estão apresentados os dados de correlação entre as taxas de metilação do DNA e as variáveis cobalamina, folato, tHcy e IMC. Foi observada correlação direta entre cobalamina e folato para os três grupos. Verificou-se uma correlação inversa entre Hcy e as vitaminas Cbl e folato. Além disso, os resultados mostram uma correlação inversa entre concentração sérica de folato e a taxa de metilação do DNA apenas grupo controle. Na tabela 12, estão apresentados os dados de correlação entre as taxas de metilação do DNA e as concentrações de citocinas. Dentre as particularidades, observa-se no grupo controle correlação inversa entre a porcentagem de metilação do DNA no gene *IFNG* e a concentração sérica da citocina IFN γ . A observação das tabelas também permite verificar que para todos os grupos, consta correlação direta entre as concentrações séricas das citocinas.

Tabela 11 - Correlações de Spearman entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene IFNG e as concentrações de vitaminas, homocisteína total e IMC conforme os grupos

	Aborto Primário (N = 117)			Aborto Secundário (N = 139)			Controle (N=264)		
	Cbl	Folato serico	tHcy	Cbl	Folato serico	tHcy	Cbl	Folato serico	tHcy
Cbl		r=0,225 p=0,015 n=117	r=-0,344 p<0,001 n=117		r=0,205 p=0,015 n=139	r=-0,145 p=0,089 n=139		r=0,130 p=0,036 n=264	r=-0,240 p<0,001 n=264
Folato sérico	r=0,225 p=0,015 n=117		r=0,238 p=0,010 n=117	r=0,205 p=0,015 n=139		r=-0,351 p<0,001 n=139	r=0,130 p=0,036 n=264		r=-0,268 p<0,001 n=264
IMC	r=-0,226 p=0,014 n=117	r=-0,073 p=0,437 n=117	r=0,108 p=0,248 n=117	r=-0,061 p=0,474 n=139	r=-0,045 p=0,602 n=139	r=-0,079 p=0,360 n=139	r=0,028 p=0,649 n=264	r=-0,016 p=0,799 n=264	r=-0,061 p=0,327 n=264
PMR IFNG	r=-0,052 p=0,582 n=114	r=0,001 p=0,989 n=114	r=0,011 p=0,909 n=114	r=-0,060 p=0,498 n=131	r=-0,016 p=0,855 n=131	r=0,097 p=0,270 n=131	r=-0,068 p=0,279 n=260	r=-0,154 p=0,013 n=260	r=-0,063 p=0,315 n=260

Tabela 12 - Correlações de Spearman entre os valores das taxas de metilação do DNA na região promotora do gene IFNG e as concentrações de citocinas conforme os grupos

	Aborto Primário (N = 117)			Aborto Secundário (N = 139)			Controle (N=264)		
	PMR IFNG	IFN γ	TNF α	PMR IFNG	IFN γ	TNF α	PMR IFNG	IFN γ	TNF α
IFNγ	r=0,022 p=0,817 n=114		r=0,080 p=0,388 n=117	r=-0,023 p=0,792 n=131		r=0,114 p=0,182 n=139	r=-0,130 p=0,036 n=260		r=0,216 p<0,001 n=264
IL1β	r=-0,084 p=0,379 n=114	r=0,231 p=0,013 n=117	r=0,144 p=0,122 n=117	r=-0,086 p=0,331 n=131	r=0,172 p=0,043 n=139	r=0,239 p=0,005 n=139	r=-0,090 p=0,151 n=260	r=0,234 p<0,001 n=264	r=0,333 p<0,001 n=264
IL4	r=0,073 p=0,439 n=114	r=0,096 p=0,304 n=117	r=0,336 p<0,001 n=117	r=0,063 p=0,477 n=131	r=0,126 p=0,140 n=139	r=0,296 p<0,001 n=139	r=0,008 p=0,904 n=260	r=0,221 p<0,001 n=264	r=0,321 p<0,001 n=264
IL 6	r=0,056 p=0,557 n=114	r=0,273 p=0,003 n=117	r=0,295 p=0,001 n=117	r=0,014 p=0,870 n=131	r=0,275 p=0,001 n=139	r=0,320 p<0,001 n=139	r=-0,002 p=0,978 n=260	r=0,209 p<0,001 n=264	r=0,495 p<0,001 n=264
IL 10	r=-0,051 p=0,587 n=114	r=0,276 p=0,003 n=117	r=0,314 p=0,001 n=117	r=-0,204 p=0,019 n=131	r=0,125 p=0,143 n=139	r=0,320 p<0,001 n=139	r=-,0193 p=0,002 n=260	r=0,023 p=0,714 n=264	r=0,199 p<0,001 n=264
TNFα	r=-0,053 p=0,573 n=114	r=0,080 p=0,388 n=117		r=0,239 p=0,005 n=131	r=0,114 p=0,182 n=139		r=-0,040 p=0,521 n=260	r=0,216 p<0,001 n=264	

4.5.1 Associação entre a taxa de metilação do DNA e as concentrações de IFN γ nos diferentes grupos

Foram avaliadas as taxas de metilação do DNA (PMR) no gene *IFNG* em mulheres classificadas segundo tercís da concentração da citocina IFN γ nos três grupos (Tabela 13), e não foram observadas diferenças entre os grupos.

Tabela 13 - Comparação das taxas de metilação do DNA no gene *IFNG* segundo tercís das concentrações da citocina IFN γ conforme os grupos

PMR nos grupos	Grupos formados segundo os tercís de IFN			p
	IFN γ <7,00	7,00<IFN γ <184,85	IFN γ ≥184,85	
AP	89,8 (55,7 - 121,4)	88,3 (66,6 - 160,5)	93,8 (71,8 - 116,6)	0,696
AS	90,2 (70,1 - 128,9)	87,6 (60,5 - 106,1)	98,6 (65,2 - 143,7)	0,339
C	99,6 (74,0 - 130,0)	99,3 (67,1 - 144,4)	91,5 (63,7 - 130,9)	0,325

4.6 Análise de Curva ROC para os marcadores do processo inflamatório em cada grupo

No modelo 1, verificou-se que a razão TNF α /IL10 e a concentração de TNF α têm discreto poder discriminatório para a variável dependente “ter aborto primário” (Tabela 14). No modelo 2, as variáveis IFN γ , IL1, IL4, IL6, TNF α , razão TNF α /IL10, razão IFN γ /IL4 e razão IFN γ /IL10 têm discreto poder discriminatório para a variável “ter aborto secundário” (Tabela 15). Já no modelo 3, as variáveis IFN γ , IL1, IL4, IL6, TNF α , razão TNF α /IL10, razão TNF α /IL4, razão IFN γ /IL4 e razão IFN γ /IL10 têm discreto poder discriminatório para a variável dependente “ter aborto recorrente” (Tabela 16).

Tabela 14 - Área abaixo da curva ROC (modelos univariados) para os marcadores do processo inflamatório no grupo AP

Modelo	Var. Independentes	AUC (IC 95%)	Sensibilidade e Especificidade %	p
1	IFN γ x 10	0,555 (0,493 - 0,618)	50 e 61	0,066
2	IL1 β x 10	0,538 (0,475 - 0,601)	42 e 68	0,241
3	IL4 x 10	0,531 (0,467 - 0,596)	42 e 62	0,331
4	IL6 x 10	0,526 (0,428 - 0,592)	42 e 62	0,428
5	IL10 x 10	0,488 (0,424 - 0,552)	38 e 68	0,424
6	TNF α x 10	0,582 (0,518 - 0,646)	48 e 72	0,011
7	Ratio TNF/IL4 x 10	0,557 (0,493 - 0,621)	56 e 58	0,075
8	Ratio TNF/IL10 x 10	0,565 (0,503 - 0,626)	58 e 42	0,044
9	Ratio IFN/IL4 x 10	0,540 (0,476-0,604)	56 e 52	0,211
10	Ratio IFN/IL10 x 10	0,558 (0,497-0,618)	50 e 30	0,072

Tabela 15 - Área abaixo da curva ROC (modelos univariados) para os marcadores do processo inflamatório no grupo AS

Modelo	Var. Independentes	AUC (IC 95%)	Sensibilidade e Especificidade %	p
1	IFN γ x 10	0,620 (0,563 - 0,679)	64 e 60	<0,001
2	IL1 β x 10	0,595 (0,537 - 0,653)	60 e 62	0,002
3	IL4 x 10	0,582 (0,522 - 0,643)	42 e 78	0,007
4	IL6 x 10	0,589 (0,528 - 0,651)	44 e 76	0,003
5	IL10 x 10	0,507 (0,446 - 0,568)	42 e 62	0,812
6	TNF α x 10	0,619 (0,560 - 0,679)	64 e 58	<0,001
7	Ratio TNF/IL4 x 10	0,550 (0,490 - 0,609)	46 e 60	0,102
8	Ratio TNF/IL10 x 10	0,563 (0,503 - 0,622)	64 e 60	0,039
9	Ratio IFN/IL4 x 10	0,583 (0,523 - 0,643)	70 e 50	0,006
10	Ratio IFN/IL10 x 10	0,596 (0,538 - 0,654)	50 e 62	0,002

Tabela 16 - Área abaixo da curva ROC (modelos univariados) para os marcadores do processo inflamatório no grupo AER (AP + AS)

Modelo	Var. Independentes	AUC (IC 95%)	Sensibilidade e Especificidade %	p
1	IFNγ x 10	0,591 (0,541 - 0,640)	60 e 60	<0,001
2	IL1β x 10	0,569 (0,519 - 0,618)	50 e 64	0,007
3	IL4 x 10	0,559 (0,509 - 0,609)	50 e 60	0,021
4	IL6 x 10	0,560 (0,510 - 0,610)	40 e 50	0,018
5	IL10 x 10	0,498 (0,448 - 0,548)	42 e 60	0,948
6	TNFα x 10	0,602 (0,553 - 0,651)	54 e 62	<0,001
7	Ratio TNF/IL4 x 10	0,553 (0,504 - 0,603)	50 e 60	0,036
8	Ratio TNF/IL10 x 10	0,564 (0,514 - 0,613)	48 e 58	0,012
9	Ratio IFN/IL4 x 10	0,563 (0,514 - 0,613)	42 e 66	0,013
10	Ratio IFN/IL10 x 10	0,578 (0,529 - 0,628)	48 e 60	0,002

5. DISCUSSÃO

Por volta de 15% das gestações clinicamente reconhecidas terminam em aborto (Daya, 2004). Já o aborto recorrente acomete 1% dos casais (Finan *et al.*, 2010), e com frequência as mulheres afetadas por esta condição apresentam mais de um fator predisponente, além da não identificação de causa em quase metade dos casos (Matthiesen, Kalkunte e Sharma, 2012).

Tem sido proposto que durante a gestação, é de essencial importância que o sistema imunológico materno sofra uma modulação em seu perfil de citocinas de forma a garantir tolerância ao feto, considerado um semi-enxerto. No intuito de entender como se estabelece esse ambiente de tolerância imunológica, há anos muitos estudos têm focado no objetivo de elucidar as particularidades, seja estudando os componentes durante o período gestacional ou o pós-gestacional no âmbito imunológico. Existem, no entanto, múltiplas abordagens para a compreensão deste problema que acomete tantas mulheres em período fértil. Isto porque existem muitos componentes essenciais que interagem entre si e tornam bastante complexa a análise. De maneira geral, sabe-se que as células CD4+ T helper diferenciam-se em Th1, Th2, TReg e Th17, e essa divisão funcional, bem como sua interação e seu consequente estímulo ou supressão de células NK está bastante implicada na ocorrência do aborto (Bansal, 2010). As Treg estão diminuídas na decídua e no sangue de gestantes com histórico de AER, e há evidências de que a citocina IL6 tem papel chave no bloqueio do desenvolvimento da Treg (Arruvito *et al.*, 2009). No presente estudo, mulheres com histórico de AER apresentaram maior concentração de IL6 que o grupo controle, o que também pode ser visto para as citocinas IL1 β , IL4, IFN γ e TNF α , e essas diferenças entre grupos também foram obtidas em estudo que comparou concentrações plasmáticas de citocinas em mulheres com história de aborto e em mulheres grávidas sem história prévia de aborto, independente da idade gestacional em que as últimas se encontravam (Calleja-Agius *et al.*, 2012). Assim como no presente estudo, o TNF α foi maior no grupo de aborto em comparação ao de controle em um estudo recente com gestantes (Piosik *et al.*, 2013). O papel do TNF α no aborto se dá, muito provavelmente, por atuar em células NK, cuja ativação pode levar a danos na placenta (Finan *et al.*, 2010). Foi observado também que mulheres com história de aborto ou de infertilidade apresentaram maior produção de

IFN γ e TNF α por linfócitos de sangue periférico que o grupo controle, mas diferentemente do presente estudo, a produção de IL10 foi menor que o grupo controle (Wilczynski *et al.*, 2012). A IL10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, pois, durante a gravidez, age inibindo células T citotóxicas, existindo até mesmo a proposta de ser administrada para pacientes com gestação de alto risco (Matthiesen, Kalkunte e Sharma, 2012).

A observação de que as citocinas do eixo Th2 também estão aumentadas no grupo de aborto em comparação ao controle, apesar de inicialmente contraditório, pode ser um indício de que a razão e/ou cooperação entre as citocinas Th1/Th2 seja mais importante que a quantidade de cada citocina propriamente dita (Wilczynski *et al.*, 2012), levando a crer cada vez mais que a razão entre as citocinas é crucial no equilíbrio imunológico gestacional.

Em mulheres maltesas com gestação de risco (em que houve sangramento vaginal antes da 24ª semana gestacional entre outras alterações), as concentrações séricas de citocinas IFN γ , IL10 e IL6 foram semelhantes às de grávidas controle, não grávidas controle e não grávidas com história de aborto, mas a razão entre TNF α /IL10 foi maior em não grávidas com história de aborto em comparação aos demais grupos (grávidas controle, grávidas com risco e não grávidas controle). A razão IFN γ /IL6 foi menor em não grávidas que abortaram e em mulheres com gestação de risco em comparação ao controle (Calleja-Agius *et al.*, 2011). A avaliação das razões séricas entre citocinas Th1/Th2 em mulheres que passaram por fertilização in vitro (FIV) mostrou que mulheres com história de aborto e falha na FIV apresentaram razões TNF α /IL4 e IFN γ /IL4 maiores que o grupo controle (FIV seguida de gestação sem história prévia de aborto). Ou seja, mulheres com histórico de aborto apresentaram um desbalanço nos eixos Th1/Th2 (Kalu *et al.*, 2008), tendendo para o eixo Th1, das citocinas pró-inflamatórias, o que vem ao encontro do que se encontrou no presente trabalho, em que as razões IFN γ /IL10 e IFN γ /IL4 foram significativamente maiores no grupo de aborto primário.

O que se pode verificar com base nesses resultados é que a teoria inicialmente proposta de que a predominância de citocinas do eixo Th2 fosse responsável pela normalidade da gestação (Wegmann *et al.*, 1993b) e evidenciada em outros estudos (Jenkins *et al.*, 2000) talvez não baste para justificar as alterações que vem sendo

verificadas nos estudos recentes, e a tendência atual é a de que a manifestação do aborto pode ser decorrente não só de concentrações alteradas de citocinas, mas muito provavelmente também por conta de uma desregulação de proporções de citocinas nas etapas cruciais de implantação e desenvolvimento do embrião, contribuindo também as inter-relações entre essas citocinas e as células Treg e Th17 (Wang, W. J. *et al.*, 2010) e as células NK (De Carolis, Perricone e Perricone, 2010).

Avaliação da taxa de metilação do DNA e sua relação com citocinas, vitaminas e outros metabólitos

Neste estudo, foi verificada forte correlação entre as taxas de metilação do DNA nos genes *IFNG* e *STRATIFIN* (ANEXO F). É importante salientar que, como tais genes não estão relacionados, e como o *STRATIFIN* tem sido descrito como um gene hipermetilado, tal resultado permite inferir que o maior ou menor provimento de grupamentos metil vai interferir na alteração da metilação como um todo, em todos os genes cuja regulação é influenciada pela metilação. Entretanto, vale ressaltar que estudos recentes trabalham com a dualidade do papel do ácido fólico, ou seja, de ele estar associado a hipermetilação em alguns genes e hipometilação em outros. Neste estudo, não houve diferença na taxa de metilação nos diferentes tercis de concentrações séricas de IFN γ , apesar de a literatura vigente considerar que a produção de citocinas sofre influência regulatória da metilação do DNA (Aune *et al.*, 2013), (Falvo *et al.*, 2013) (Ouyang *et al.*, 2013). Tal contradição, poderia, mais uma vez, ser explicada pela ideia de que o mais importante é a interação entre as citocinas, em que a razão entre elas é definitivamente modulador da implantação e da manutenção da gestação. Foi verificada neste estudo correlação inversa significativa entre taxa de metilação no gene *IFNG* e as citocinas IFN γ e IL10 no grupo controle, o que permite inferir que as concentrações de citocinas, apesar de influenciadas pela taxa de metilação no DNA no promotor do gene *IFNG*, são reguladas por outras modificações, como, por exemplo, o que foi verificado em um recente estudo, de que modificações epigenéticas nas células T de memória parecem regular a atividade de citocinas de maneira mais enfática que a atividade dos promotores de genes imunologicamente relevantes (Hashimoto *et al.*, 2013).

Por conta da intensa síntese de DNA que ocorre na gestação, o aporte adequado das vitaminas envolvidas na via de síntese do DNA é de suma importância na gestação. A cobalamina e o ácido fólico são, neste contexto, essenciais e alterações em sua concentração, bem como a presença de polimorfismos em genes que codificam seus transportadores e receptores. Neste estudo, as mulheres com AER apresentaram concentrações séricas significativamente maiores de folato e cobalamina com relação ao grupo controle, mas nenhuma diferença quanto à homocisteína total plasmática. De forma geral, neste estudo, a taxa de metilação do DNA foi associada inversamente à concentração de vitaminas. Por todo o conhecimento da via metabólica do folato e suas implicações na metilação do DNA que se tem até agora, seria de se esperar que um aumento do suprimento deste nutriente levasse a uma elevação nas taxas de metilação do DNA, conforme verificado na literatura (Pufulete, Emery e Sanders, 2003), apesar do fato de que diferentes metodologias têm sido utilizadas, o que pode estar relacionado aos resultados distintos encontrados nos estudos de metilação. Em mulheres em pós-menopausa, verificou-se que baixa concentração de folato levou a um quadro de hiperhomocisteinemia e hipometilação do DNA em linfócitos (Jacob *et al.*, 1998). No presente estudo, também foi encontrada uma relação inversa entre concentração de folato e homocisteína nos grupos de aborto secundário e controle, apesar do aumento do folato ter levado à diminuição na taxa de metilação do DNA. Um estudo com gestantes encontrou que a taxa de metilação do DNA do gene *IFNG* foi maior em gestantes que não fizeram uso de suplementação de folato quando comparadas a gestantes que fizeram uso de ácido fólico suplementar (Silva, 2010). No presente estudo, foi utilizada a mesma metodologia de quantificação da metilação do DNA, a qMSP deste estudo com gestantes. Em outro estudo, em que se avaliou a taxa de metilação global do DNA frente ao início e à retirada de suplementação de folato, verificou-se que após a inserção da suplementação, ocorreu diminuição na metilação global do DNA (Crider *et al.*, 2011), mas uma diminuição ainda maior ocorreu na retirada do suplemento. Em alguns estudos de metilação global, não foi verificada alteração na taxa de metilação por conta do aumento de concentração de folato (Axume *et al.*, 2007). Em gestantes, verificou-se uma correlação inversa entre folato e homocisteína, e o aumento da concentração de homocisteína foi associado a uma diminuição da taxa de metilação global na placenta (Park *et al.*, 2005), mas foi encontrada

hipermetilação do DNA no gene ER α em uma maior concentração de homocisteína em pacientes com aterosclerose (Huang, Zhi e Wang, 2009). No presente estudo, a concentração de homocisteína não apresentou relação significativa com a taxa de metilação do DNA nos grupos aborto primário e no controle.

Este é um dos primeiros estudos em que se observam características séricas do ambiente imunológico em mulheres com história de aborto recorrente com a abordagem de razões entre as citocinas com atividades conhecidamente antagônicas e sua relação com taxas de metilação do DNA. Mesmo necessitando de estudos posteriores que venham a elucidar o papel não só das concentrações ideais das citocinas para que se desenvolva uma gestação adequada, a importância do presente trabalho foi o de propor um olhar mais dinâmico em uma tentativa inicial de investigar as concentrações e razões de citocinas em nível sérico, o que, sem dúvida, poderá, em alguns anos, trazer novos marcadores imunológicos, com uma técnica menos invasiva que a avaliação *in situ* do aborto. Apesar das limitações deste trabalho quanto ao uso de ácido fólico pelas mulheres do grupo estudo, esses resultados são inéditos no assunto e abrem caminho para abordagens futuras para auxiliar na prática clínica da prevenção desta importante condição patológica.

6. CONCLUSÕES

- Não houve diferença na taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNG* entre os grupos aborto recorrente primário, aborto recorrente secundário e controle.
- O $TNF\alpha$ está aumentado nos dois grupos de aborto quando comparados ao grupo controle
- Apenas no grupo controle a taxa de metilação do DNA no gene *IFNG* foi correlacionada inversamente às concentrações de folato sérico e citocina $IFN\gamma$
- Foi observada correlação inversa significativa entre a taxa de metilação do DNA na região promotora do gene *IFNG* e a concentração sérica da citocina IL10 no grupo controle e no grupo de aborto secundário.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBASSI-GHANA VATI, M. Thyroid autoantibodies and pregnancy outcomes. **Clin Obstet Gynecol**, v. 54, n. 3, p. 499-505, Sep 2011. ISSN 1532-5520. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21857181> >.

ALKHURIJI, A. F. et al. The relationship between cytokine gene polymorphism and unexplained recurrent spontaneous abortion in Saudi females. **Saudi Med J**, v. 34, n. 5, p. 484-9, May 2013. ISSN 0379-5284. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677264> >.

ARRUVITO, L. et al. IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. **J Reprod Immunol**, v. 82, n. 2, p. 158-65, Nov 2009. ISSN 1872-7603. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665805> >.

ASCHKENAZI, S. et al. Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1853-1861, Jun 2002. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175760400040 >.

AUNE, T. M. et al. Epigenetic Activation and Silencing of the Gene that Encodes IFN-gamma. **Front Immunol**, v. 4, p. 112, 2013. ISSN 1664-3224.

AXUME, J. et al. Global leukocyte DNA methylation is similar in African American and Caucasian women under conditions of controlled folate intake. **Epigenetics**, v. 2, n. 1, p. 66-8, 2007 Jan-Mar 2007. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965592> >.

BALASCH, J. Antiphospholipid antibodies: a major advance in the management of recurrent abortion. **Autoimmunity Reviews**, v. 3, n. 3, p. 228-233, Mar 2004. ISSN 1568-9972. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221500600009 >.

BANSAL, A. S. Joining the Immunological Dots in Recurrent Miscarriage. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 5, p. 307-315, Nov 2010. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282693400001 >.

BAUD, D. et al. Role of Chlamydia trachomatis in Miscarriage. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1630-1635, Sep 2011. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294656100007 >.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2 Suppl 1, p. S4-11, Dec 2005. ISSN 1743-4254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341240> >.

BENNETT, W. A. et al. Cytokine expression by models of human trophoblast as assessed by a semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction technique. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 36, n. 5, p. 285-294, Nov 1996. ISSN 8755-8920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VT37300008 >.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 2002. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782440> >.

BLACK, S.; KUSHNER, I.; SAMOLS, D. C-reactive protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 47, p. 48487-48490, Nov 19 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225098100002 >.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 749-795, 1997 1997. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997WT66900028 >.

BOMBELL, S.; MCGUIRE, W. Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: Meta-analysis. **Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 48, n. 2, p. 147-154, 2008. ISSN 0004-8666. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000254381500004 >.

BONILLA-HENAO, V. et al. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN-gamma in human lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, n. 6, p. 1339-1346, Dec 2005a. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233921700019 >.

_____. Different signaling pathways inhibit DNA methylation activity and up-regulate IFN-gamma in human lymphocytes. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1339-46, Dec 2005b. ISSN 0741-5400 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16204617 >.

CALLEJA-AGIUS, J. et al. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. **Hum Reprod**, v. 27, n. 2, p. 349-57, Feb 2012. ISSN 0268-1161.

_____. Obstetric outcome and cytokine levels in threatened miscarriage. **Gynecol Endocrinol**, v. 27, n. 2, p. 121-7, Feb 2011. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500112> >.

CAO, Y. et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. **Gene**, v. 514, n. 2, p. 105-11, Feb 10 2013. ISSN 0378-1119.

CARDOSO, F. P. et al. Methylation pattern of the IFN-gamma gene in human dental pulp. **J Endod**, v. 36, n. 4, p. 642-6, Apr 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20307737> >.

CHAKRABORTY, P. et al. Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64446, 2013. ISSN 1932-6203.

CHALLIS, J. R. et al. Inflammation and Pregnancy. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 2, p. 206-215, Feb 2009. ISSN 1933-7191. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000263386400012 >.

CHIM, S. S. et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 41, p. 14753-8, Oct 11 2005. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16203989 >.

CHIM, S. S. C. et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 41, p. 14753-14758, Oct 11 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232603600050 >.

CHOI, Y. K.; KWAK-KIM, J. Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: A comprehensive review. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 2, p. 91-110, Aug 2008. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257513800001 >.

CHRISTIANSEN, O. B.; NIELSEN, H. S.; KOLTE, A. M. Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 13, n. 1, p. 71-83, Jul 2006. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000238943800014 >.

CHÉDIN, F. The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 101, p. 255-85, 2011. ISSN 1878-0814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21507354> >.

CNATTINGIUS, S. The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. **Nicotine & Tobacco Research**, v. 6, p. S125-S140, Apr 2004. ISSN 1462-2203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221640100004 >.

CRIDER, K. S. et al. Genomic DNA methylation changes in response to folic acid supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e28144, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22163281> >.

DAHER, S. et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, n. 1-2, p. 151-157, Jun 2004. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222729500016 >.

_____. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, n. 1, p. 69-77, Feb 2003. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181496800005 >.

DALI-YOUCHEF, N.; ANDRÈS, E. An update on cobalamin deficiency in adults. **QJM**, v. 102, n. 1, p. 17-28, Jan 2009. ISSN 1460-2393. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990719> >.

DARMOCHWAL-KOLARZ, D. et al. T helper 1-and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 86, n. 2, p. 165-170, Oct 1999. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082612400010 >.

DAYA, S. Evidence-based management of miscarriage: optimal diagnostic recurrent protocol. **Advances in Fertility and Reproductive Medicine**, v. 1266, p. 318-327, 2004 2004. ISSN 0531-5131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000223166200043 >.

DE CAROLIS, C.; PERRICONE, C.; PERRICONE, R. NK cells, autoantibodies, and immunologic infertility: a complex interplay. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 39, n. 3, p. 166-75, Dec 2010. ISSN 1559-0267. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19908167> >.

DIAZ, L. et al. Calcitriol inhibits TNF-alpha-induced inflammatory cytokines in human trophoblasts. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 81, n. 1, p. 17-24, Jul 2009. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268607000003 >.

DIONISIO, N. et al. Homocysteine, intracellular signaling and thrombotic disorders. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 27, p. 3109-19, 2010. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629621> >.

DOLINOY, D. C.; WEIDMAN, J. R.; JIRTLE, R. L. Epigenetic gene regulation: Linking early developmental environment to adult disease. **Reproductive Toxicology**, v. 23, n. 3, p. 297-307, Apr-May 2007. ISSN 0890-6238. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246646800006 >.

DUCKITT, K.; QURESHI, A. Recurrent Miscarriage (Reprinted from Clin Evid Handbook, June, pg 486-487, 2008). **American Family Physician**, v. 78, n. 8, p. 977-978, 2008. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260345300010 >.

EADS, C. A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 8, Apr 15 2000. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000207916400005 >.

ELGHEZAL, H. et al. Prevalence of chromosomal abnormalities in couples with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 3, p. 721-723, Sep 2007. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000249751900032 >.

ESKDALE, J. et al. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5 ' flanking sequence. **Immunogenetics**, v. 46, n. 2, p. 120-128, 1997 1997. ISSN 0093-7711. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XE88800007 >.

FALVO, J. V. et al. Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation. **Adv Immunol**, v. 118, p. 37-128, 2013. ISSN 0065-2776.

FAUSETT, A. B.; BRANCH, D. W. Autoimmunity and pregnancy loss. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 599-+, Aug 2002. ISSN 0889-8561. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178163800012 >.

FENECH, M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. **Mutat Res**, Nov 2011. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093367> >.

FINAN, R. R. et al. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. **J Reprod Immunol**, v. 84, n. 2, p. 186-92, Mar 2010. ISSN 0165-0378.

FORD, H. B.; SCHUST, D. J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. **Rev Obstet Gynecol**, v. 2, n. 2, p. 76-83, 2009. ISSN 1941-2797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609401> >.

GADINA, M. et al. Signaling by Type I and II cytokine receptors: ten years after. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, n. 3, p. 363-373, Jun 2001. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168477300015 >.

GUERRA-SHINOHARA, E. M. et al. Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss. **Thromb Haemost**, v. 108, n. 4, p. 693-700, Oct 2012. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245.

_____. Elevated serum S-adenosylhomocysteine in cobalamin-deficient megaloblastic anemia. **Metabolism**, v. 56, n. 3, p. 339-47, Mar 2007. ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292722> >.

_____. Low ratio of S-adenosylmethionine to S-adenosylhomocysteine is associated with vitamin deficiency in Brazilian pregnant women and newborns. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 5, p. 1312-21, Nov 2004. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531681> >.

_____. Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12. **BJOG**, v. 109, n. 7, p. 784-91, Jul 2002. ISSN 1470-0328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135215> >.

_____. Increased MMA concentration and body mass index are associated with spontaneous abortion in Brazilian women A pilot study. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 5-6, p. 423-427, 2010. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275586300021 >.

GUTHIKONDA, S.; HAYNES, W. G. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. **Curr Atheroscler Rep**, v. 8, n. 2, p. 100-6, Mar 2006. ISSN 1523-3804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510043> >.

HANNA, N. et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 11, p. 5721-5728, Jun 1 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087154800023 >.

HASHIMOTO, S. et al. Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells. **J Immunol**, v. 190, n. 8, p. 4076-91, Apr 15 2013. ISSN 0022-1767.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 1-20, May 2005. ISSN 0019-2805. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228291900001 >.

HELLEBREKERS, D. M.; GRIFFIOEN, A. W.; VAN ENGELAND, M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1775, n. 1, p. 76-91, Jan 2007. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930846> >.

HERRMANN, W. et al. Total homocysteine, vitamin B(12), and total antioxidant status in vegetarians. **Clin Chem**, v. 47, n. 6, p. 1094-101, Jun 2001. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375297> >.

HO, S. et al. The role of Bcl-2 expression in EGF inhibition of TNF-alpha/IFN-gamma-induced villous trophoblast apoptosis. **Placenta**, v. 20, n. 5-6, p. 423-430, Jul-Aug 1999. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000081312900006 >.

HUANG, Y. S.; ZHI, Y. F.; WANG, S. R. Hypermethylation of estrogen receptor-alpha gene in atheromatosis patients and its correlation with homocysteine. **Pathophysiology**, v. 16, n. 4, p. 259-65, Oct 2009. ISSN 0928-4680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19285843> >.

HULLEY, S.; CUMMINGS, S. **Designing Clinical Research**. Philadelphia, USA: Williams & Wilkins, 1988.

JACOB, R. A. et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J Nutr**, v. 128, n. 7, p. 1204-12, Jul 1998. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649607> >.

JASLOW, C. R.; KUTTEH, W. H. Effect of prior birth and miscarriage frequency on the prevalence of acquired and congenital uterine anomalies in women with recurrent miscarriage: a cross-sectional study. **Fertil Steril**, v. 99, n. 7, p. 1916-22.e1, Jun 2013. ISSN 0015-0282.

JASPER, M. J.; TREMELLEN, K. P.; ROBERTSON, S. A. Reduced expression of IL-6 and IL-1 alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent

miscarriage. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 73, n. 1, p. 74-84, 2007. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244545400009 >.

JENKINS, C. et al. Evidence of a T(H)1 type response associated with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 6, p. 1206-1208, Jun 2000. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000087548700023 >.

JERONIMO, C. et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 24, p. 8472-8478, Dec 15 2004. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225957800045 >.

KALU, E. et al. Serial estimation of Th1:th2 cytokines profile in women undergoing in-vitro fertilization-embryo transfer. **Am J Reprod Immunol**, v. 59, n. 3, p. 206-11, Mar 2008. ISSN 1046-7408 (Print)

1046-7408.

KAMAT, G. V. et al. A cross-sectional study to detect the prevalence of hyperhomocysteinemia in cases of deep vein thrombosis. **Indian J Surg**, v. 72, n. 4, p. 323-6, Aug 2010. ISSN 0972-2068. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21938196> >.

KAUR, S. et al. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1889-1896, Nov 2007. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250263400055 >.

KELLEHER, B. P.; BROIN, S. D. Microbiological assay for vitamin B12 performed in 96-well microtitre plates. **J Clin Pathol**, v. 44, n. 7, p. 592-5, Jul 1991. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1856292> >.

KELLEHER, B. P. et al. Microbiological assay for vitamin B12 with use of a colistin-sulfate-resistant organism. **Clin Chem**, v. 33, n. 1, p. 52-4, Jan 1987. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3542297> >.

KIM, J. M. et al. STRUCTURE OF THE MOUSE IL-10 GENE AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF THE MOUSE AND HUMAN GENES. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 11, p. 3618-3623, Jun 1 1992. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992HW13600042 >.

KUMPEL, B. M.; MANOUSSAKA, M. S. Placental immunology and maternal alloimmune responses. **Vox Sang**, v. 102, n. 1, p. 2-12, Jan 2012. ISSN 1423-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884528> >.

KWAK-KIM, J.; YANG, K. M.; GILMAN-SACHS, A. Recurrent pregnancy loss: A disease of inflammation and coagulation. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 35, n. 4, p. 609-622, Aug 2009. ISSN 1341-8076. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270030700001 >.

LASHEN, H.; FEAR, K.; STURDEE, D. W. Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. **Human Reproduction**, v. 19, n. 7, p. 1644-1646, Jul 2004. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222400100027 >.

LEE, M. E.; WANG, H. Homocysteine and hypomethylation - A novel link to vascular disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 1-2, p. 49-54, Jan-Feb 1999. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000079179100008 >.

LEGRO, R. S. Pregnancy considerations in women with polycystic ovary syndrome. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 1, p. 295-304, Mar 2007. ISSN 0009-9201. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246780000024 >.

LEVRANT, S.; COULAM, C. B.; JEYENDRAN, R. S. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms are not risk factors for recurrent pregnancy loss: Evaluation of couples. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 3, p. 224-228, Sep 2008. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000258440400006 >.

LI, Y.; SASAKI, H. Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 466-473, Mar 2011. ISSN 1001-0602. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288064900008 >.

LIM, K. J. H. et al. The role of T-helper cytokines in human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 1, p. 136-142, Jan 2000. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084537500026 >.

LOHSOONTHORN, V.; QIU, C.; WILLIAMS, M. A. Maternal serum C-reactive protein concentrations in early pregnancy and subsequent risk of preterm delivery. **Clin Biochem**, v. 40, n. 5-6, p. 330-5, Mar 2007. ISSN 0009-9120. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17289011> >.

LUZINA, I. G. et al. Alternatively spliced variants of interleukin-4 promote inflammation differentially. **J Leukoc Biol**, v. 89, n. 5, p. 763-70, May 2011. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21285395> >.

MANIA-PRAMANIK, J. et al. Current Chlamydia trachomatis Infection, A Major Cause of Infertility. **J Reprod Infertil**, v. 13, n. 4, p. 204-10, Oct 2012. ISSN 2228-5482. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926547> >.

MATTHIESEN, L.; KALKUNTE, S.; SHARMA, S. Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm. **Am J Reprod Immunol**, v. 67, n. 4, p. 334-40, Apr 2012. ISSN 1046-7408.

MCEWAN, M. et al. Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 3, p. 241-9, Jun 2009. ISSN 1879-0305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487153> >.

MEDICA, I. et al. Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage - a meta-analysis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 19, n. 3, p. 406-414, Sep 2009. ISSN 1472-6483. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269966400018 >.

METWALLY, M. et al. Body mass index and risk of miscarriage in women with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 1, p. 290-295, 2010. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278858200048 >.

MEZZESIMI, A. et al. The detection of anti-beta 2-glycoprotein I antibodies is associated with increased risk of pregnancy loss in women with threatened abortion in the first trimester. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 133, n. 2, p. 164-168, Aug 2007. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248981300006 >.

MOLLAMAHMUTOĞLU, L. et al. Troponin I, C-reactive protein and fibrinogen levels in missed abortions. **Clin Exp Obstet Gynecol**, v. 38, n. 1, p. 60-2, 2011. ISSN 0390-6663. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21485729> >.

NADIR, Y.; HOFFMAN, R.; BRENNER, B. Association of homocysteine, vitamin B-12, folic acid, and MTHFR C677T in patients with a thrombotic event or recurrent fetal loss. **Annals of Hematology**, v. 86, n. 1, p. 35-40, Jan 2007. ISSN 0939-5555. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242496500006 >.

NAIR, R. R.; KHANNA, A.; SINGH, K. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. **Reprod Sci**, v. 19, n. 2, p. 210-5, Feb 2012. ISSN 1933-7191.

O'BROIN, S.; KELLEHER, B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells. **J Clin Pathol**, v. 45, n. 4, p. 344-7, Apr 1992. ISSN 0021-9746. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577973> >.

ORGANIZATION, W. H. **Obesity and overweight** 2011.

OU, S. et al. [Cytogenetic analysis of 105 new human abnormal karyotypes]. **Yi Chuan**, v. 35, n. 7, p. 885-9, Jul 2013. ISSN 0253-9772 (Print)

0253-9772.

OUYANG, B. et al. Interferon-gamma promoter is hypermethylated in blood DNA from workers with confirmed diisocyanate asthma. **Toxicol Sci**, v. 133, n. 2, p. 218-24, Jun 2013. ISSN 1096-0929.

PABUCCU, R.; GOMEL, V. Reproductive outcome after hysteroscopic metroplasty in women with septate uterus and otherwise unexplained infertility. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 6, p. 1675-1678, Jun 2004. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000222108800035 >.

PANDEY, M. K.; RANI, R.; AGRAWAL, S. An update in recurrent spontaneous abortion. **Arch Gynecol Obstet**, v. 272, n. 2, p. 95-108, Jul 2005. ISSN 0932-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15906053> >.

PARK, B. H. et al. [Folate and homocysteine levels during pregnancy affect DNA methylation in human placenta]. **J Prev Med Public Health**, v. 38, n. 4, p. 437-42, Nov 2005. ISSN 1975-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16358830> >.

PELTIER, M. R. Immunology of term and preterm labor. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, p. 122, Dec 2003. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651749> >.

PENNER, M. R. et al. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. **Front Aging Neurosci**, v. 2, p. 9, 2010. ISSN 1663-4365. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552047> >.

PFEIFFER, C. M.; HUFF, D. L.; GUNTER, E. W. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 290-292, Feb 1999. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078496700022 >.

PIOSIK, Z. M. et al. Plasma TNF-alpha Levels are Higher in Early Pregnancy in Patients with Secondary Compared with Primary Recurrent Miscarriage. **Am J Reprod Immunol**, May 9 2013. ISSN 1046-7408.

PITIPHAT, W. et al. Plasma C-reactive protein in early pregnancy and preterm delivery. **Am J Epidemiol**, v. 162, n. 11, p. 1108-13, Dec 2005. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236995> >.

PORCU, G. et al. Hysteroscopic metroplasty for septate uterus and repetitive abortions: reproductive outcome. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 88, n. 1, p. 81-84, Jan 2000. ISSN 0301-2115. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000084033300014 >.

PUFULETE, M.; EMERY, P. W.; SANDERS, T. A. Folate, DNA methylation and colorectal cancer. **Proc Nutr Soc**, v. 62, n. 2, p. 437-45, May 2003. ISSN 0029-6651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506892> >.

RAMÍREZ-LÓPEZ, G. et al. Interleukin-6 polymorphisms are associated with obesity and hyperglycemia in Mexican adolescents. **Arch Med Res**, v. 44, n. 1, p. 62-8, Jan 2013. ISSN 1873-5487. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23142265> >.

REID, J. G. et al. The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 45, n. 1, p. 35-40, Jan 2001. ISSN 8755-8920. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166680100006 >.

RILEY, J. K.; YOKOYAMA, W. M. NK cell tolerance and the maternal-fetal interface. **Am J Reprod Immunol**, v. 59, n. 5, p. 371-87, May 2008. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18405308> >.

RITTENBERG, V. et al. Influence of BMI on risk of miscarriage after single blastocyst transfer. **Human Reproduction**, v. 26, n. 10, p. 2642-2650, Oct 2011. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294969500007 >.

ROBERTSON, S. A.; CARE, A. S.; SKINNER, R. J. Interleukin 10 regulates inflammatory cytokine synthesis to protect against lipopolysaccharide-induced abortion and fetal growth restriction in mice. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 5, p. 738-748, May 2007. ISSN 0006-3363. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245906600001 >.

ROBINSON, K. Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease. **Heart**, v. 83, n. 2, p. 127-130, Feb 2000. ISSN 1355-6037. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085144800001 >.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174, n.

3, p. 341-348, Jan 31 2006. ISSN 0820-3946. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234978600022 >.

ROWE, J. H. et al. *Listeria monocytogenes* cytoplasmic entry induces fetal wastage by disrupting maternal Foxp3+ regulatory T cell-sustained fetal tolerance. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 8, p. e1002873, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916020> >.

SAINI, V. et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 9-10, p. 702-708, Apr 11 2011. ISSN 0009-8981. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288634500004 >.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2001.

SAPERSTEIN, S. et al. IL-1beta augments TNF-alpha-mediated inflammatory responses from lung epithelial cells. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 5, p. 273-84, May 2009. ISSN 1557-7465. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19231998> >.

SARKAR, D. Recurrent pregnancy loss in patients with thyroid dysfunction. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 16, n. Suppl 2, p. S350-1, Dec 2012. ISSN 2230-8210 (Print) 2230-9500.

SATER, M. S. et al. Anti-phosphatidylserine, anti-cardiolipin, anti- β 2 glycoprotein I and anti-prothrombin antibodies in recurrent miscarriage at 8-12 gestational weeks. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 163, n. 2, p. 170-4, Aug 2012. ISSN 1872-7654. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22555404> >.

SAWALHA, A. H. Epigenetics and T-cell immunity. **Autoimmunity**, v. 41, n. 4, p. 245-252, 2008 2008. ISSN 0891-6934. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255274300002 >.

SHAKNOVICH, R. Gene expression and epigenetic deregulation. **Adv Exp Med Biol**, v. 792, p. 133-50, 2013. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24014295> >.

SILVA, T. A. **Avaliação da taxa de metilação do DNA de leucócitos na região promotora dos genes IFNg, Serpin B5 e Stratifin durante o período gestacional e sua relação com o metabolismo das vitaminas e metabólitos**. 2010. 102 (Mestrado). Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

STABLER, S. P. Vitamin B12 deficiency. **N Engl J Med**, v. 368, n. 21, p. 2041-2, May 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23697526> >.

STEPHENSON, M. D. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. **Fertility and Sterility**, v. 66, n. 1, p. 24-29, Jul 1996. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UT30400005 >.

STRUTZ, F.; NEILSON, E. G. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. **Springer Semin Immunopathol**, v. 24, n. 4, p. 459-76, May 2003. ISSN 0344-4325. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778339> >.

SU, M. T. et al. Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. **Thromb Haemost**, v. 109, n. 1, p. 8-15, Jan 2013. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245.

THELLIN, O. et al. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 6, p. 731-737, Dec 2000. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165218000019 >.

TICCONI, C. et al. Antinuclear Autoantibodies in Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 6, p. 384-392, 2010. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283947200003 >.

TOMIZAWA, S. I.; SASAKI, H. Genomic imprinting and its relevance to congenital disease, infertility, molar pregnancy and induced pluripotent stem cell. **J Hum Genet**, Jan 2012. ISSN 1435-232X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237588> >.

TOTH, B. et al. Placental Interleukin-15 Expression in Recurrent Miscarriage. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 6, p. 402-410, 2010. ISSN 1046-7408. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000283947200005 >.

TROWSDALE, J.; BETZ, A. G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nature Immunology**, v. 7, n. 3, p. 241-246, Mar 2006. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000235360400008 >.

UMBRICHT, C. B. et al. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 26, p. 3348-3353, Jun 7 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000169248800005 >.

UNFRIED, G. et al. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, v. 18, n. 2, p. 267-270, Feb 2003. ISSN 0268-1161. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000181040800007 >.

_____. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. **Obstetrics and Gynecology**, v. 99, n. 4, p. 614-619, Apr 2002. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174635200020 >.

VAN EERDEN, P. Obesity in pregnancy. **S D Med**, v. Spec No, p. 46-50, 2011. ISSN 0038-3317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721188> >.

VAN MIL, N. H.; OOSTERBAAN, A. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: a review. **Reprod Toxicol**, v. 30, n. 4, p. 520-31, Dec 2010. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656016> >.

VIGANO, P. et al. Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 12, p. 5730-5736, Dec 2002. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000179976300058 >.

WANG, W.-J. et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 2, p. 164-170, Mar 2010. ISSN 0165-0378. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275965100006 >.

WANG, W. J. et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. **J Reprod Immunol**, v. 84, n. 2, p. 164-70, Mar 2010. ISSN 0165-0378.

WEGMANN, T. G. et al. BIDIRECTIONAL CYTOKINE INTERACTIONS IN THE MATERNAL-FETAL RELATIONSHIP - IS SUCCESSFUL PREGNANCY A TH2 PHENOMENON. **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, Jul 1993a. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LN04300007 >.

_____. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunol Today**, v. 14, n. 7, p. 353-6, Jul 1993b. ISSN 0167-5699 (Print)

0167-5699.

WEISS, G. et al. Inflammation in reproductive disorders. **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 216-29, Feb 2009. ISSN 1933-7205. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208790> >.

WHITE, G. P. et al. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and Non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD45RO(-) T cells. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 6, p. 2820-2827, Mar 15 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000174280400033 >.

WILCZYNSKI, J. R. et al. Immunotherapy of patients with recurrent spontaneous miscarriage and idiopathic infertility: does the immunization-dependent Th2 cytokine overbalance really matter? **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 60, n. 2, p. 151-60, Apr 2012. ISSN 0004-069x.

YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N. E. DNA methylation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 8, n. 2, p. 115-27, Jun 2001. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11446343> >.

YAO, Q. et al. Synergistic inhibition of pseudorabies virus replication by porcine alpha/beta interferon and gamma interferon in vitro. **European Cytokine Network**, v. 18, n. 2, p. 71-77, Jun 2007. ISSN 1148-5493. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248713800003 >.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 1, p. 37-50, Jan 2006. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16485345> >.

YOUNG, H. A. et al. DIFFERENTIATION OF THE T-HELPER PHENOTYPES BY ANALYSIS OF THE METHYLATION STATE OF THE IFN-GAMMA GENE. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 8, p. 3603-3610, Oct 15 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PM58100026 >.

YUI, J. et al. CYTOTOXICITY OF TUMOR-NECROSIS-FACTOR-ALPHA AND GAMMA-INTERFERON AGAINST PRIMARY HUMAN PLACENTAL TROPHOBLASTS. **Placenta**, v. 15, n. 8, p. 819-835, Dec 1994. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PY77000004 >.

ZETTERBERG, H. Methylene tetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, p. 7, Feb 2004. ISSN 1477-7827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14969589> >.

ZURITA, M. et al. Hypermethylated 14-3-3-sigma and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. **Bmc Cancer**, v. 10, May 20 2010. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000279786700002 >.

Anexo A - Parecer CAPPesq HC



Diretoria Clínica

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº: 1232/07	Data de entrada: 14/12/2007 Data sessão: 02/02/2011
-----------------------------------	--

TÍTULO DA PESQUISA: FATORES GENÉTICOS E BIOQUÍMICOS ASSOCIADOS AO ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE - METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA, FOLATO, COBALAMINA E VITAMINA B6

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Mario Henrique Burlacchinil de Carvalho

PESQUISADOR (A) EXECUTANTE: Débora de Lima Robi

DEPARTAMENTO: Obstetrícia e Ginecologia


CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:

Trata-se do relatório parcial do projeto que teve como objetivo estudar os fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente-metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6. O projeto não foi concluído por problemas de retardo na liberação de verbas, assim como no recrutamento de mulheres para a pesquisa, tanto do grupo controle como do estudado. Até a presente data os resultados obtidos foram relatados e estão aprovados. Por outro lado os pesquisadores solicitam a continuidade do projeto com a inclusão de um novo TCLE. Solicitamos que o TCLE seja reformulado lembrando que os sujeitos da pesquisa são leigos na área de pesquisa médica e necessitam de maior simplicidade no vocabulário. Devolvido para atender a solicitações do relator.

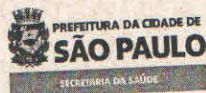
CONCLUSÃO Devolver para atender as solicitações.

ENVIAR Á CONEP	SIM () INFOME A ÁREA TEMÁTICA:	NÃO (X)

AS RESPOSTAS ÀS PENDÊNCIAS,
DEVERÃO SER APRESENTADAS
NO PRAZO DE 60 DIAS.


PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo B - Parecer Comitê de Ética - Secretaria Municipal de Saúde



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 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, trimetoprina, pirimetamina, colestiramina, barbitúricos, difenilidantóina 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,

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

Anexo C - Parecer Comitê de Ética - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comitê de Ética em PesquisaParecer CEP/FCF/129/2011
Protocolo CEP/FCF/451
CAAE – 0127.0.162.018-07

- I. **Título do Projeto:** "Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente – Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6; hemostasia e processo inflamatório" (Protocolo CEP/FCF/451).
- II. **Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.
- III. **Equipe:**
- mestrandos: Kelma Cordeiro da Silva Giusti; Robson José Lázaro; Juliano Felix Bertinato e Nathalia Sierra Monteiro.
 - alunos de iniciação científica: Fernanda Midori Seino; Jéssica Carrilho Britto; Silvana Henrique Cavalcante; Marina Boacnin; Guilherme Wataru Gomes e Mario Guilherme Lamberti.
- IV. **Situação:** Protocolo aprovado em 24/09/2007.
Alterações aprovadas em: 29 de outubro de 2007, 11 de fevereiro de 2008 e 07 de fevereiro de 2011.

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Controle**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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 e que tenham tido pelo menos duas gestações normais e que tenham até 45 anos (chamado de grupo controle). Esta pesquisa está sendo realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e conta com a colaboração deste Centro de Saúde. 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 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, algumas vitaminas (ácido fólico, cobalamina) e algumas citocinas (TNF alfa, IFN gama, IL1, IL6, IL10 e proteína C-reativa), e a normalidade do DNA, relativa à 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 reação (metilação do DNA) e as diferenças do DNA de cada indivíduo (polimorfismos) nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TC2*, *RFC1* e *GCP2*, cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados com alterações nas concentrações de homocisteína no sangue, uma vez que concentrações elevadas de homocisteína foram associadas a vários abortos e nos genes *MTHFD1*, *CBS*, *THBM*, *TFPI*, *SERPINC1*, *PROC*, *TAFI*, *PAI1*, *FV*, no gene da protrombina e no gene da cadeia beta do fibrinogênio, cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados à formação e destruição de coágulos. A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à 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, e 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 exames realizados no sangue serão enviados ao Centro de Saúde e serão colocados no seu prontuário para acompanhamento de seu médico. Caso seja de seu interesse, disponibilizarei os resultados dos testes genéticos no final da pesquisa, que vai durar dois anos.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Centro de Saúde não será afetado. 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, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à 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 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, em 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 E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Aborto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 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, algumas vitaminas (ácido fólico, cobalamina) e algumas citocinas (TNF alfa, IFN gama, IL1, IL6, IL10 e proteína C-reativa), e a normalidade do DNA, relativa à 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 reação (metilação do DNA) e as diferenças do DNA de cada indivíduo (polimorfismos) nos genes *MTHFR*, *MTR*, *MTRR*, *TC2*, *RFC1* e *GCP2*, cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados com alterações nas concentrações de homocisteína no sangue, uma vez que concentrações elevadas de homocisteína foram associadas a vários abortos e nos genes *MTHFD1*, *CBS*, *THBM*, *TFPI*, *SERPINC1*, *PROC*, *TAFI*, *PAI1*, *FV*, no gene da protrombina e no gene da cadeia beta do fibrinogênio, cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados à formação e destruição de coágulos. A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à 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, e 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 exames realizados no sangue serão enviados ao Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas e serão colocados no seu prontuário para acompanhamento de seu médico. Caso seja de seu interesse, disponibilizarei os resultados dos testes genéticos no final da pesquisa, que vai durar dois anos.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no 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, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à 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 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, em 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 da Testemunha

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

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 F

Correlação entre as taxas de metilação nos genes IFN e SFN nos grupos AP, AS e Controle

	PMR IFN AP	PMR IFN AS	PMR IFN Controle
PMR SFN AP	r= 0,895 p<0,001 N=117		
PMR SFN AS		r= 0,883 p<0,001 N=139	
PMR SFN Controle			r= 0,805 p<0,001 N=264