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

Associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de folato (RFC1, GCP2, MTHFR e MTHFD1) e alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína em mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes

Kelma Cordeiro da Silva Giusti

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientadora:

**Profa. Dra. Elvira Maria Guerra
Shinohara**

**São Paulo
2012**

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

Giusti, Kelma Cordeiro da Silva
G538a Associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de folato (RFC1, GCP2, MTHFR e MTHFD1) e alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína em mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes / Kelma Cordeiro da Silva Giusti. -- São Paulo, 2012.
109p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

I. Hematologia 2. Obstetrícia 3. Biologia molecular I. T.
II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.15 CDD

Kelma Cordeiro da Silva Giusti

Associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de folato (RFC1, GCP2, MTHFR e MTHFD1) e alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína em mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Lidia Helena, que, com absoluta dedicação e carinho, esteve sempre me apoiando em todos os momentos da minha vida.

Ao meu pai, Ozete, por sua preocupação, ajuda e apoio incondicional em mais esta fase de minha vida.

Aos meus irmãos, Vagner, Nivaldo, Keila e Angela, que, de maneira direta ou indireta, tiveram a preocupação de me apoiar. Também aos meus cunhados, Thiago e Anderson, e às minhas cunhadas, Eliane e Cassiana, pelo carinho.

A todas as mulheres que participaram da pesquisa, sem as quais este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade no Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

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

Aos doutores do HC-FM-USP, Prof. Dr. Marcelo Zugaib, Prof. Dr. Mario Henrique Burlachini de Carvalho e Prof. Dr. Antonio Gomes de Amorim Filho, e ao pessoal da obstetrícia, Amadeu, Daniela, Evangelina, Ivanilde, Jeane, Josefa, Joyce, Márcia, Maria das Graças, Maria do Carmo e Regina, pela dedicação, pela ajuda e pelo carinho demonstrado em todo momento que estive no HC-FM-USP

Às mulheres que participaram, por colaborarem no projeto, em especial:
Angélica, Mônica, Ana Cláudia, Márcia e Sara.

Às meninas do LIMFM-USP, Isis, Salet Terezinha, Keila, Kátia e Nalva, e ao Rodrigo, pela disponibilidade do empréstimo do laboratório e equipamento para a separação do material biológico.

Ao CHSP, por realizar as dosagens bioquímicas.

Aos laboratórios dos hospitais: Servidor Público e HU-USP, Professora Kioko, Daniela e Juliana, que contribuíram com o conhecimento e com o empréstimo dos equipamentos para análise laboratorial.

À UNIFESP, Vanessa Cavalcante e Profa. Dra. Vania D'Almeida, pelo conhecimento e pelo empréstimo de equipamento para dosagem de homocisteína.

Aos secretários da FCF-USP, Ana, Edna, Sueli, Dora, Jorge e Elaine, pelo carinho, pela paciência e pelo atendimento prestativo.

Aos colegas que participaram destes anos de estudo, que me ensinaram e colaboraram, e também aos que se tornaram amigos: Débora, Thaiomara, Paola, Paulo, Rodrigo, Ananka, Cristiane, Carmem, Patricia, Fernanda, Silvana, Juliano, Maria Luiza, Marina, Carol, Ana Cláudia, Cady, Guilherme Wataru,

Mário Guilherme, Nathalia, Clovis, Douglas, Mayla, Laura, Jéssica, Renata e Daniela. Especialmente aos amigos: Dr. Amorim, Dr. Mario, Robson e Luciene.

Aos participantes da banca de qualificação: Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata, Prof. Dr. Mario Henrique Burlachini de Carvalho e Prof. Dr. Carlos Eduardo Andrade Chagas.

Agradecimento especial aos meus pais, pois sem o apoio incondicional deles não teria conseguido chegar até aqui.

E, o mais importante, ao Criador do Universo, que me ajudou com saúde, paciência e sabedoria.

RESUMO

GIUSTI, K. C. S. **Associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de folato (RFC1, GCP2, MTHFR e MTHFD1) e alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína em mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes.** 106 fls. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

O aborto espontâneo recorrente (AER) é caracterizado pela ocorrência de três ou mais abortos consecutivos e acomete 2-4% das mulheres em idade fértil. A etiologia está associada a vários fatores de risco, tais como anomalias uterinas, aberrações cromossômicas, autoimunidade, trombofilias, elevação na concentração de homocisteína (tHcy), porém cerca de 40% dos casos permanece sem causa definida. O metabolismo de unidades de carbono desempenha papel fundamental na disponibilidade de folato na célula, sendo essencial para o desenvolvimento placentário e fetal. Deficiência de vitaminas que regulam este metabolismo, como o ácido fólico, e polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de folato (MTHFR, RFC1, GCP2 e MTHFD1) podem levar à redução das concentrações desta vitamina e ao aumento das concentrações de tHcy. Objetivo foi avaliar a associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do folato (RFC1, GCP2, MTHFR e MTHFD1) e o risco de se ter AER, bem como avaliar a associação entre estes polimorfismos e as alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína. Foram constituídos três grupos: AER primário: 117 mulheres com AER e nenhum feto viável; AER secundário: 139 mulheres com AER e pelo menos um feto viável; e Controle: 264 mulheres sem história de aborto espontâneo. Nenhuma das mulheres estava grávida no momento da coleta do sangue. Amostras de sangue foram obtidas para dosagens bioquímicas (folato, Cbl, tHcy, entre outras), imunológicas e extração de DNA genômico. As genotipagens foram feitas por PCR-RFLP ou PCR em tempo real. As concentrações séricas de folato e Cbl foram maiores no AER primário e secundário ($p < 0,05$). A distribuição dos genótipos de todos os polimorfismos foi semelhante nos três grupos. O aumento nas concentrações de folato sérico (OR: 1,05, 95% IC: 1,03 – 1,07, $p < 0,001$), Cbl (OR: 1,00, 95% IC: 1,00 – 1,00, $p = 0,016$), tHcy (OR: 1,03, 95% IC: 0,97 – 1,11, $p = 0,033$) e T4 (OR: 1,02, 95% IC: 1,00 – 1,03, $p = 0,006$) e a presença de FAN reagente (1:160) (OR: 2,90, 95% IC: 1,25 – 6,75, $p = 0,013$) foram considerados fatores de risco para aborto primário. Para o aborto secundário, foram considerados fatores de risco o aumento nas concentrações de folato sérico (OR: 1,04, 95% IC: 1,02 – 1,05, $p < 0,001$), Cbl (OR: 1,00, 95% IC: 1,00 – 1,00, $p = 0,019$) e tHcy (OR: 1,05, 95% IC: 1,00 – 1,09, $p = 0,039$), maiores idades (OR: 1,02, 95% IC: 0,98 – 1,06, $p = 0,031$), hábito de fumar (OR: 2,54, 95% IC: 1,41 – 4,60, $p = 0,002$) e ter maior IMC (OR: 1,42, 95% IC: 1,07 – 1,88, $p = 0,015$). Os polimorfismos estudados não foram associados ao maior risco de se ter AER, quando analisados isoladamente, e também não foram associados a alterações nas concentrações séricas de folato, Cbl e tHcy, com exceção do genótipo MTHFR 677TT, cujas portadoras apresentaram maior concentração de tHcy, quando comparadas com as portadoras de genótipos 677CC e 677CT nos três grupos. As variáveis concentrações de folato, Cbl, tHcy e T4 e presença de FAN reagente foram associadas ao maior risco de se ter

aborto primário. As variáveis idade, IMC, tabagismo, concentrações de folato, Cbl e tHcy foram associadas ao maior risco de aborto secundário.

Palavras-chave: folato, cobalamina, homocisteína, aborto espontâneo recorrente, polimorfismos

ABSTRACT

GIUSTI, K. C. S. Association between polymorphisms in genes related to folate metabolism (RFC1, GCP2, MTHFR and MTHFD1) and changes in the concentrations of folate, cobalamin and homocysteine in women with a history of recurrent miscarriages. 106 fls. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

The recurrent spontaneous abortion (RSA) is characterized by the occurrence of three or more consecutive miscarriages and affects 2-4% of women of childbearing age. The etiology is associated with several risk factors such as uterine abnormalities, chromosomal aberrations, autoimmunity, thrombophilia, increased concentration of homocysteine (tHcy). About 40% of cases remains unknown cause. The units of carbon metabolism plays an essential role in the availability of the cell folate, is essential for the placental and fetal development. A deficiency of the vitamins that regulate this metabolism, like folic acid, and polymorphisms in genes encoding enzymes related to folate metabolism (MTHFR, RFC1, and GCP2 MTHFD1) may lead to decreased concentrations of this vitamin and increased concentrations of tHcy. Objective was to evaluate the association between polymorphisms in genes related to folate metabolism (RFC1, GCP2, MTHFD1 and MTHFR) and the risk of having AER, and to evaluate the association between these polymorphisms and changes in concentrations folate, cobalamin, and homocysteine. Three groups were divided: AER primary: 117 women with RSA and no viable fetus, AER secondary: 139 women with RSA and at least one viable fetus and Control: 264 women with no history of miscarriage. None of the women was pregnant at time of blood collection. Blood samples were taken for biochemical (folate, Cbl, tHcy, etc.), immunological and genomic DNA extraction. The genotyping were carried out by PCR-RFLP or real time PCR. Serum concentrations of folate and Cbl were higher in groups 1 and 2 ($p < 0.05$). The distribution of genotypes of *MTHFR* c.677C> T, *MTHFR* c.1298A> C, *MTHFD1* c.1958G> A, *RFC1* c.80G>GCP2 A and c.1561C> T was similar among the three groups. The increased concentrations of serum folate (OR: 1.05, 95% CI: 1.03 - 1.07, $p < 0.001$), Cbl (OR: 1.00, 95% CI: 1.00 to 1.00, $p = 0.016$), tHcy (OR: 1.03, 95% CI: 0.97 to 1.11, $p = 0.033$) and T4 (OR: 1.02, 95% CI: 1.00 to 1.03, $p = 0.006$) and the presence of ANA (1:160) (OR: 2.90, 95% CI: 1.25 - 6.75, $p = 0.013$) were considered risk factors primary for abortion. For secondary abortion, were considered risk factors increased the concentrations of serum folate (OR: 1.04, 95% CI: 1.02 - 1.05, $p < 0.001$), cobalamin (OR: 1.00, 95 % CI: 1.00 to 1.00, $p = 0.019$) and tHcy (OR: 1.05, 95% CI: 1.00 to 1.09, $p = 0.039$), higher age (OR: 1.02, 95% CI: 0.98 to 1.06, $p = 0.031$), cigarette smoking (OR: 2.54, 95% CI: 1.41 to 4.60, $p = 0.002$) and had a higher BMI (OR : 1.42, 95% CI: 1.07 to 1.88, $p = 0.015$). The studied polymorphisms were not associated with increased risk of having RSA when analyzed separately, and were not associated with changes in serum folate, Cbl and tHcy, with the exception of the MTHFR 677TT genotype, whose patients had a higher concentration of total tHcy compared with those with 677CC and 677CT genotypes in the three groups. The variable concentrations of folate, Cbl, tHcy, and T4, presence of ANA and have been associated with increased risk for miscarriage primary. The variables age, BMI, smoking, concentrations of folate, Cbl and tHcy were associated with increased risk of secondary miscarriage.

Keywords: folate, cobalamin, homocysteine, recurrent spontaneous abortion polymorphisms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico.....	21
Figura 2. Absorção e metabolismo do folato.....	24
Figura 3. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição <i>Hinf</i> I para o polimorfismo <i>MTHFR</i> c.677C>T após coloração com brometo de etídeo.....	46
Figura 4. Eletroforese, em gel de poliacrilamida a 8%, dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição <i>HhaI</i> para o polimorfismo <i>RFC1</i> c.80G>A.....	47
Figura 5. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição <i>AccI</i> para o polimorfismo <i>GCP2</i> c.1561C>T, após coloração com brometo de etídeo.....	48
Figura 6. Distribuição da concentração de cobalamina nos três grupos estudados.....	56
Figura 7. Distribuição da concentração de folato sérico nos três grupos estudados.....	56
Figura 8. Distribuição dos valores de homocisteína total nos três grupos estudados.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de IMC classificados segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).....	41
Tabela 2. Descrição dos polimorfismos estudados. Genotipagem feita pela técnica de PCR em tempo real (<i>MTHFR</i> c.1298A>C e <i>MTHFD1</i> c.198G>A).....	49
Tabela 3. Características das mulheres dos grupos estudo (Abortos primário e secundário) e grupo controle, quanto a idade, IMC, uso de contraceptivo oral, tabagista e uso de bebidas alcoólicas, número consecutivos de perdas e período das perdas.....	52
Tabela 4. Uso de ácido fólico nas mulheres do AER primário, secundário e grupo controle	54
Tabela 5. Dados bioquímicos das mulheres do AER primário, secundário e grupo controle.....	55
Tabela 6. Frequência dos genótipos, alelos e haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C>T, c.1298A>C do AER primário, secundário e grupo controle.....	58
Tabela 7. Frequência dos genótipos, alelos e haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C>T, c.1298A>C do AER primário, secundário e grupo controle, após excluir causas conhecidas de abortos.....	59
Tabela 8. Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2).....	60
Tabela 9. Frequência dos genótipos, alelos para os polimorfismos <i>RFC1</i> c.80G>A, <i>GCP2</i> c.1561C>T e <i>MTHFD1</i> c.1958G>A do AER primário, secundário e grupo controle.....	61
Tabela 10. Frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos <i>RFC1</i> c.80G>A, <i>GCP2</i> c.1561C>T e <i>MTHFD1</i> c.1958G>A do AER primário, secundário e grupo controle, após excluir causas conhecidas de abortos.....	62

Tabela 11. Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2).....	63
Tabela 12. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C>T, <i>MTHFR</i> c.1298A>C, <i>MTHFD1</i> c.1958G>A, <i>GCP2</i> c.1561C>T e <i>RFC1</i> c.80G>A do AER primário, secundário e grupo controle.....	64
Tabela 13. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos <i>RFC1</i> c.80G>A, <i>MTHFR</i> c.1298A>C, <i>MTHFD1</i> c.1958G>A, <i>GCP2</i> c.1561C>T e do AER primário, secundário e grupo controle.....	65
Tabela 14. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos <i>GCP2</i> c.1561C>T, <i>MTHFR</i> c.1298A>C e <i>MTHFD1</i> c.1958G>A do AER primário, secundário e grupo controle.....	66
Tabela 15. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.1298A>C e <i>MTHFD1</i> c.1958G>A do AER primário, secundário e grupo controle.....	67
Tabela 16. Concentrações de folato sérico, cobalamina e homocisteína total das mulheres do AER primário, secundário e grupo controle, segundo os genótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C>T, <i>MTHFR</i> c.1298A>C, <i>RFC1</i> c.80G>A, <i>GCP2</i> c.1561C>T e <i>MTHFD1</i> c.1958G>A.....	69
Tabela 17. Regressão logística multivariada para a variável dependente ter aborto.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5,10-formilTHF	5,10-formiltetraidrofolato
5,10-metenilTHF	5,10-meteniltetraidrofolato
5,10-metilenoTHF	5,10-metilenotetraidrofolato
5-metilTHF	5-metiltetraidrofolato
AER	Aborto espontâneo recorrente
AF	Ácido fólico
ALT	Aspartato alanintransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
Cbl	Cobalamina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DFTN	Defeitos de fechamento do tubo neural
DHF	Diidrofolato
DHFR	Diidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAN	Fator antinúcleo
FI	Fator intrínseco
GCP2	Glutamato caboxipeptidase 2
Hcy	Homocisteína
IMC	Índice de massa corporal
LLA	Leucemia linfoblástica aguda

MTHFD1	Metilenotetraidrofolato desidrogenase 1
MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
MTR	Metionina sintetase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido para-aminobenzoico
pb	Pares de base
PCFT	Transportador de folato próton acoplado
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
RFC1	Transportador de folato reduzido 1
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> – restrição enzimática
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TBE	Tris-ácido-bórico-EDTA
TCII	Transcobalamina II
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
tHcy	Homocisteína total
THF	Tetraidrofolato
TSH	Hormônio estimulante da tireoide

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Ácido fólico.....	21
1.2 Cobalamina.....	26
1.3 Homocisteína.....	28
1.4 Suplementação vitamínica.....	30
1.5 Alterações genéticas envolvidas no metabolismo do folato.....	31
1.5.1 Polimorfismos no gene da metilenotetraidrofolato redutase c.677C>T e c.1298A>C.....	31
1.5.2 Polimorfismo no transportador de folato reduzido c.80G>A.....	33
1.5.3 Polimorfismo no gene da glutamato carboxipeptidase 2 c.1561C>T.....	34
1.5.4 Polimorfismo no gene da metilenotetraidrofolato desidrogenase 1 c.1958G>A.....	35
2. OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODO.....	39
3.1 Casuística.....	39
3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	40
3.1.1.1 Grupo estudo.....	40
3.1.1.2 Grupo controle.....	40
3.2 Avaliação antropométrica.....	41
3.3 Amostras biológicas.....	41
3.4 Metodologia laboratorial.....	42
3.4.1 Determinações bioquímicas.....	42

3.4.2 Determinação de fator antinúcleo (FAN).....	43
3.4.3 Extração e avaliação do DNA genômico.....	43
3.4.3.1 Avaliação dos polimorfismos <i>MTHFR</i> c.677C> T, <i>RFC1</i> c.80G> A e <i>GCP2</i> c.1561C> T.....	44
3.4.3.2 Polimorfismo <i>MTHFR</i> c.677C>T.....	45
3.4.3.3 Polimorfismo <i>RFC1</i> c.80G>A.....	46
3.4.3.4 Polimorfismo <i>GCP2</i> c.1561C>T.....	47
3.4.3.5 Análise dos polimorfismos <i>MTHFR</i> c.1298A>C e <i>MTHFD1</i> c.1598G>A.....	48
3.5 Análise estatística.....	49
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Características gerais.....	51
4.2 Dosagens bioquímicas, vitamínicas e tireoidianas.....	53
4.3 Análise da frequência de polimorfismos genéticos.....	58
4.4 Análise de regressão logística multivariada.....	71
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS.....	82
8. ANEXOS.....	96

1. Introdução

O aborto é definido como a interrupção da gestação antes da 20ª semana ou quando o feto pesa menos do que 500g (Christiansen, 2006; Zugaib, 2008). Pode ser classificado em precoce, que ocorre até a 12ª semana de gestação, e tardio, quando ocorre após este período (Lejeune, 2006). Em revisão realizada por Bates (2010), foi demonstrado que o aborto ocorre em cerca de 50% das mulheres em idade fértil.

A ocorrência de três ou mais abortos consecutivos é denominada aborto espontâneo recorrente (AER). Esta caracterização é aceita em alguns países como Brasil, Inglaterra e Estados Unidos da América (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva) (Jauniaux, Farquharson *et al.*, 2006; Stephenson e Kutteh, 2007; Zugaib, 2008); embora estudos tenham demonstrado a existência da mesma frequência a partir de dois eventos (Jaslow, Carney *et al.*, 2010), podendo se considerar, desta forma, duas perdas como suficientes para a denominação de AER (Harger, Archer *et al.*, 1983).

O AER é observado em 2 a 4% das mulheres em idade reprodutiva (Stephenson e Kutteh, 2007; Jaslow, Carney *et al.*, 2010). Mulheres que apresentam histórico de AER podem ou não ter tido feto viável em algum momento do período fértil. Denomina-se aborto primário aquele em que não se teve nenhum feto viável e aborto secundário quando já ocorreu alguma gestação resultante em feto viável (Amorim-Filho, *et al.*, 2010; Toth, Jeschke *et al.*, 2010).

Sabe-se que o AER é uma condição multifatorial. Entre os fatores de risco podem ser destacados:

- idade materna, obesidade, antecedentes obstétricos, uso ou exposição ao tabaco, uso de bebidas alcoólicas (Stephenson e Kutteh, 2007);
- alterações cromossômicas: aneuploidias, rearranjos estruturais, etc (Carp, 2008; Group, 2008; Kwak-Kim, Yang *et al.*, 2009; Amorim-Filho, *et al.*, 2010);
- fatores anatômicos: má formação uterina, incompetência cervical (Saravolos, Cocksedge *et al.*, 2008; Amorim-Filho, *et al.*, 2010; Reichman e Laufer, 2010), descolamento pré-maturo da placenta (Reichman e Laufer, 2010), miomas (dependendo do tamanho e da localização) e sinéquias uterinas, entre outros (Saravolos, Cocksedge *et al.*, 2008; Kwak-Kim, Yang *et al.*, 2009; Amorim-Filho, *et al.*, 2010; Toth, Jeschke *et al.*, 2010);
- fatores endócrinos: hipotireoidismo (Thangaratinam, Tan *et al.*, 2011), diabetes mellitus descompensada (Jauniaux, Farquharson *et al.*, 2006; Amorim-Filho, *et al.*, 2010), hipersecreção do hormônio luteinizante, altas concentrações de andrógenos, entre outros (Jauniaux, Farquharson *et al.*, 2006; Kwak-Kim, Yang *et al.*, 2009);
- trombofilias: polimorfismos nos genes da protrombina (*F2* c. 20210G>A), do Fator V de Leiden (*F5* c. 1691G>A) e da metilenotetraidrofolatoredutase (*MTHFR* c.677C>T) com hiperhomocisteinemia, etc. (Rai e Regan, 2006; Amorim-Filho, *et al.*, 2010);
- elevação da concentração de homocisteína plasmática com baixas concentrações de folato (Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009);

- Outros fatores: imunológicos (aloimunidade e autoimunidades) (Carp, 2007; Amorim-Filho, *et al*, 2010), (Kwak-Kim, Yang *et al.*, 2009; Shetty e Ghosh, 2009; Amorim-Filho, *et al*, 2010), infecções maternas (Kwak-Kim, Yang *et al.*, 2009; Amorim-Filho, *et al*, 2010), medicamentos (Rai e Regan, 2006; Toth, Jeschke *et al.*, 2010; Mislanova, Martsenyuk *et al.*, 2011), outros polimorfismos (Kwak-Kim, Yang *et al.*, 2009).

Apesar de diversos fatores e causas estarem relacionados ao AER e de grande número de exames diagnósticos disponíveis na avaliação dessa condição, aproximadamente 40% dos casos não têm a etiologia elucidada (Amorim-Filho, *et al*, 2010).

Sabe-se que o crescimento fetal está relacionado com interações hormonais e nutricionais entre mãe, placenta e feto, sendo o transporte nutricional de fundamental importância (Kalhan e Marczewski, 2012). Para se obter desenvolvimento placentário e fetal adequado, é essencial a duplicação celular e, para que isso ocorra, são necessárias quantidades suficientes de cobalamina (vitamina B12) e ácido fólico (Guerra-Shinohara, Paiva *et al.*, 2002; Furness, Fenech *et al.*, 2008; Lopreato, Stabler *et al.*, 2008; Yajnik e Deshmukh, 2012), entre outras vitaminas e aminoácidos (Molloy, Mills *et al.*, 2005; Kalhan e Marczewski, 2012; Yajnik e Deshmukh, 2012). A deficiência de micronutrientes (vitaminas hidrossolúveis, especialmente o folato) está associada a elevados riscos para a fertilidade, variando da infertilidade até doenças fetais estruturais (Berti, Biesalski *et al.*, 2011).

1.1 Ácido fólico

O ácido fólico (AF) é uma vitamina hidrossolúvel que pertence à família de vitaminas do complexo B (Zhao, Matherly *et al.*, 2009; Talaulikar e Arulkumaran, 2011), encontrada naturalmente em vegetais de folhas verdes, legumes, frutas cítricas, fígado e outras carnes (Kim, 2007). Nos alimentos, o AF está na forma de poliglutamato e desempenha papel essencial nas células dos mamíferos, como na biossíntese de unidades de carbono e processos epigenéticos (Laanpere, Altmäe *et al.*, 2010; Roy, Evers *et al.*, 2012). Além disso, é co-fator essencial para metilação da homocisteína em metionina (Zhao, Matherly *et al.*, 2009; Talaulikar e Arulkumaran, 2011; Benammar, Sermondade *et al.*, 2012).

Figura 1. Estrutura química do ácido fólico. Adaptado de KIM, 2007.

Quimicamente, o AF consiste de um anel pteridina ligado ao ácido para-aminobenzoico (PABA) unido a uma ou mais moléculas de ácido glutâmico (Zhao, Matherly *et al.*, 2009) (Figura 1). Folato é um termo genérico que se

refere aos compostos com estruturas químicas e propriedades nutricionais similares. O AF é a forma monoglutamyl completamente oxidada da vitamina e que possui maior estabilidade (Eichholzer, Tönz *et al.*, 2006), usada em suplementos, na terapêutica e na fortificação de alimentos (Kim, 2007). Em condições fisiológicas e na natureza, a forma mais abundante é a de poliglutamato (possui mais de uma molécula de ácido glutâmico) (Sans-Sabrafen, 1988).

A absorção do AF ocorre por hidrólise do poliglutamato para monoglutamato, através da enzima glutamato carboxipeptidase 2 (GCP2) (Figura 2). Em seguida, a forma monoglutamato é conduzida pelo transportador de folato próton acoplado (PCFT) para dentro dos enterócitos (Zhao, Matherly *et al.*, 2009; Laanpere, Altmäe *et al.*, 2010). Tanto a hidrólise quanto o transporte têm que ocorrer em pH ideal (pH 6), no microambiente da vilosidade do jejuno (Zhao, Matherly *et al.*, 2009). No enterócito, os monoglutamatos são convertidos em 5-metiltetraidrofolato (5-metilTHF) e transportados para a corrente sanguínea sem alteração adicional (Caro, 2007).

O 5-metilTHF é a maior fração de folato circulante no plasma e apresenta alta afinidade por receptores de folato na membrana celular (Green, 2010). A absorção celular ocorre por meio da proteína carreadora de folato reduzido 1 (RFC1) (Figura 2), um transportador específico. Em tecidos específicos, como o fígado e o intestino, é utilizado o PCFT para o transporte transmembrana. O folato tecidual atua como doador e receptor de unidades de carbono em diversas reações metabólicas. Estas unidades de carbono podem estar no nível de oxidação do metanol (5-metilTHF), do formaldeído (5,10-metilenoTHF) ou do formiato (5, ou 10-formilTHF ou 5,10-metenilTHF) (Pietrzik, Bailey *et al.*, 2010).

Cada uma das formas de folato desempenha um papel específico no metabolismo intracelular. Praticamente todas as estruturas de folato tecidual estão na forma poliglutamato, que é necessária para a atividade biológica. O folato participa como coenzima em ciclos metabólicos necessários para a síntese de timidilato e purinas, que são precursores para a síntese de DNA e RNA, e de metionina, a partir da homocisteína e da interconversão de serina em glicina (Pietrzik, Bailey *et al.*, 2010).

O 5,10-metilenoTHF pode ser usado diretamente para a síntese de timidilato, reduzido a 5-metilTHF no ciclo de síntese da metionina, ou oxidado para 10-formilTHF, para ser usado na síntese das purinas. Este ciclo ocorre no citosol, mas também pode ocorrer em nível mitocondrial em mamíferos (Pietrzik, Bailey *et al.*, 2010).

A serina é o principal fornecedor de unidades de carbono para o metabolismo de unidades de carbono folato-dependente. Nesse metabolismo, a serina doa β -carbono para o THF, para gerar glicina e 5,10-metilenoTHF. A timidilato sintase catalisa a transferência de unidade de carbono de 5,10-metilenoTHF, para gerar desoxitimidina monofosfato (dTMP) a partir de desoxiuridina monofosfato (dUMP). Nesta reação, o THF é oxidado a diidrofolato (DHF). Em seguida, a DHF gerada será reduzida novamente para THF, através da diidrofolato redutase (DHFR) (Pietrzik, Bailey *et al.*, 2010).

A metilação de homocisteína, para produzir metionina, utiliza 5-metilTHF como doador de grupo metil, em uma reação catalisada por metionina sintetase (MTR), dependente de cobalamina. O 5-metilTHF é gerado a partir de 5,10-metilenoTHF, numa reação catalisada pela metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) (o 5-metilTHF também é proveniente da dieta). A metionina pode ser

Altmäe *et al.*, 2010). A deficiência de folato é particularmente problemática quando associada ao uso de álcool e ao tabagismo, doença intestinal, insuficiência renal ou hepática e uso de alguns medicamentos, havendo necessidade de suplementação com folato (Talaulikar e Arulkumaran, 2011). A suplementação de folato também é necessária em casos de demandas excessivas, como gravidez, administração de medicamentos antifolato (por exemplo, o metotrexato) e terapia com anticonvulsivante (Fairbanks e Klee, 1998). Além disso, a deficiência pode estar relacionada a variantes alélicas nos genes ligados à absorção do folato, como o transportador de folato reduzido (RFC1) e a glutamato carboxipeptidase 2 (GCP2), e genes ligados ao metabolismo do folato, tais como a metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) e a metilenotetraidrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1) (Shi, Caprau *et al.*, 2003) (Figura 2).

A principal manifestação clínica da deficiência de folato é anemia megaloblástica (Fairbanks e Klee, 1998). Outros fatores associados com a deficiência de folato são: altas concentrações de homocisteína (fator de risco para doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral) (Wald, Law *et al.*, 2002; Casas, Bautista *et al.*, 2005), demência, doença de Alzheimer (Seshadri, Beiser *et al.*, 2002), alteração na metilação de DNA e instabilidade genômica uracil induzida, ambas associadas com o aumento do risco de câncer (Blount, Mack *et al.*, 1997; Choi e Mason, 2002).

Alterações no metabolismo das purinas e pirimidinas podem afetar o crescimento fetal, resultando em malformações congênitas (Kalhan e Marczewski, 2012). A deficiência de folato em gestantes está relacionada a defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN) do feto, tais como espinha bífida

(Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group, 1991; Czeizel e Dudás, 1992)(Wright, Dainty *et al.*, 2007), lábio leporino e fenda palatina (Kelly, O'dowd *et al.*, 2012).

1.2 Cobalamina

A vitamina B12, ou cianocobalamina, faz parte da família de compostos denominada genericamente de cobalaminas (Zago e Malvezzi, 2001). A forma predominante no soro é a metilcobalamina, enquanto no citosol é a adenosilcobalamina (Fairbanks e Klee, 1998; Klee, 2000). Quimicamente, é uma corrina, consistindo de um átomo de cobalto (Co^{3+}), circundado por quatro anéis pirróis ligados ao nucleotídeo 5,6-dimetilbenzimidazol (Moestrup, 2006; Watanabe, 2007).

É uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos, encontrada em praticamente todos os tecidos animais e estocada primariamente no fígado, na forma de adenosilcobalamina (Henry, 1999). A fonte natural de cobalamina (Cbl) na dieta humana restringe-se a alimentos de origem animal (Herrmann, Schorr *et al.*, 2003).

Em humanos, a absorção de Cbl é complexa. Após ser liberada das proteínas alimentares, ela se liga à haptocorrina no estômago. Ao chegar ao duodeno, ocorre proteólise, fazendo com que ela se ligue ao fator intrínseco (FI), formando um complexo Cbl-FI (Watanabe, 2007). Esse complexo é absorvido no íleo terminal (Afman, Van Der Put *et al.*, 2001) e transportado para a circulação portal, onde a Cbl é transferida para transcobalamina II (TCII) (Andrès, Dali-Youcef *et al.*, 2009). A TCII é uma proteína transportadora de Cbl,

produzida pelo fígado, pelos macrófagos e enterócitos ileais. Nas células, a internalização de Cbl é feita através de endocitose, utilizando receptores específicos (Chanarin, 1987).

No organismo humano, este nutriente funciona como um co-fator essencial para duas enzimas: metionina sintase e L-metilmalonil-coA mutase (Morris, Jacques *et al.*, 2002; Obeid, Kuhlmann *et al.*, 2005), ambas direta ou indiretamente envolvidas no metabolismo da homocisteína total (tHcy). A metionina sintase promove a metilação da tHcy à metionina, tendo o5-metilTHF como doador de grupamento metil e a metilcobalamina como co-fator (Clarke, Refsum *et al.*, 2003; Obeid, Kuhlmann *et al.*, 2005). Já a L-metilmalonil-coA mutase catalisa a conversão de metilmalonil coenzima A para succinil coenzima A, tendo a adenosilcobalamina como co-fator (Morris, Jacques *et al.*, 2002; Obeid, Kuhlmann *et al.*, 2005).

É conhecida a necessidade fisiológica de Cbl onde a concentração circulante deve estar entre 150 e 673 pmol/L. A deficiência é uma desordem que se manifesta por um quadro clássico caracterizado por anemia megaloblástica associada a sintomas neurológicos (Carmel, Green *et al.*, 2003; Andrès, Loukili *et al.*, 2004).

Há evidências de que a Cbl tem papel importante no crescimento fetal e de que sua baixa ingestão apresenta consequências tardias (Kalhan e Marczewski, 2012). A deficiência de Cbl em gestantes aumenta o risco de má formação fetal, ocasionando DFTN (Afman, Van Der Put *et al.*, 2001). Esta deficiência está associada também com sinais de desmielinização e grave retardamento da mielinização no sistema nervoso do feto (Black, 2008; Zampieri, Biselli *et al.*, 2012). Além disso, esta deficiência é a causa de algumas

síndromes, alterações metabólicas e condições degenerativas (Yajnik e Deshmukh, 2012).

Assim, tanto a deficiência de folato quanto a de Cbl podem ocasionar transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares (Andrès, Loukili *et al.*, 2004), por serem necessárias às reações de metilação e devido as suas influências no metabolismo da homocisteína (Venâncio, Burini *et al.*, 2004).

1.3 Homocisteína

A homocisteína (Hcy) é um aminoácido não proteico, formado pela desmetilação da metionina proveniente da dieta ou de seu catabolismo (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008; Koz, Gouwy *et al.*, 2010). A Hcy total (tHcy) é a soma das formas de Hcy livre e ligada à proteína (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008).

A tHcy requer 5-metilTHF como doador de grupamentos metil, tendo a Cbl como co-fator, para que possa ser remetilada à metionina e, assim, não se acumular (Venâncio, Burini *et al.*, 2004). Após a metilação da tHcy, a metionina formada é convertida em S-adenosilmetionina (SAM), que é o principal doador do grupo metil para a síntese de DNA, de proteínas e de neurotransmissores (Trková, Kapras *et al.*, 2000; Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009; Kalhan e Marczewski, 2012). Após a doação de um grupo metil, a SAM se converte em S-adenosilhomocisteína (SAH) (Miller, 2008; Kalhan e Marczewski, 2012). Quando ocorre alteração da razão SAM/SAH, pode ocorrer alteração na metilação do DNA, com incorporação de uracila, desencadeando mutações, quebras cromossômicas e formação de micronúcleos (Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009;

Benammar, Sermondade *et al.*, 2012), podendo interferir no desenvolvimento fetal (Benammar, Sermondade *et al.*, 2012).

A SAM é particularmente relevante para a metilação do DNA, pois fornece o grupo metil usado na metilação da citosina (Parle-Mcdermott e Ozaki, 2011). Altas concentrações de tHcy podem sugerir acúmulo intracelular de SAH, consequentemente diminuindo a razão SAM/SAH, resultando em menor metilação do DNA, em alterações no crescimento celular e em proliferação de outras funções celulares, impactando no desenvolvimento e no crescimento embrionário e fetal em longo prazo ou permanente (Kalhan e Marczewski, 2012).

As concentrações plasmáticas de tHcy devem ser inferiores a 15,0 $\mu\text{mol/L}$. Elevadas concentrações foram associadas às seguintes complicações obstétricas: metabolismo alterado do óxido nítrico (diretamente relacionado à maioria das etapas da reprodução, como ovulação, clivagem da implantação embrionária, regulação da pressão arterial, amadurecimento cervical e contrações); endometriose; diabetes gestacional; embriopatia fetal (Forges, Monnier-Barbarino *et al.*, 2007); aumento da possibilidade de má formação congênita, descolamento prematuro da placenta, abortos espontâneos e pré-eclâmpsia (Forges, Monnier-Barbarino *et al.*, 2007; Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010). Além disso, a tHcy pode ser tóxica ao embrião, pela geração de lesões oxidativas (Benammar, Sermondade *et al.*, 2012), e pode aumentar o potencial trombogênico (Durand, Lussier-Cacan *et al.*, 1997; Benammar, Sermondade *et al.*, 2012).

Reduções nas concentrações plasmáticas de folato e Cbl, bem como alterações em genes de enzimas chaves do metabolismo destas vitaminas e da

tHcy, têm importantes implicações nas concentrações plasmáticas de tHcy (Brouns, Ursem *et al.*, 2008; Park, Han *et al.*, 2011).

1.4 Suplementação vitamínica

Alguns estudos mostraram que a suplementação com micronutrientes (vitaminas hidrossolúveis, especialmente o folato) durante o período gestacional reduz anomalias fetais (Cetin, Berti *et al.*, 2010; Berti, Biesalski *et al.*, 2011). A suplementação age no metabolismo materno e fetal, envolvendo a atividade de enzimas, os sinais de transdução, as vias de transcrição, as funções biológicas e a redução de estresse oxidativo (Berti, Biesalski *et al.*, 2011; Ly, Lee *et al.*, 2011).

Visando reduzir problemas gestacionais relacionados à carência de folato, é recomendada a suplementação com AF antes e no início da gestação, sendo a dose preconizada para gestantes de 400µg/dia (Solomons, 2007).

Com o intuito de diminuir a incidência de DFTN, foi preconizada nos EUA a fortificação de alimentos com AF a partir de 1998 (140µg/100g de farinha) (Eichholzer, Tönz *et al.*, 2006; Hesecker, 2011).

No Brasil, o Ministério da Saúde tornou obrigatória, a partir de julho de 2004, a fortificação de farinhas de milho e trigo com AF (150µg/100g de farinha) (Brasil, 13 de dezembro de 2012). As concentrações de Cbl e folato em mulheres brasileiras não foram avaliadas antes da implantação deste programa (Barbosa, Stabler *et al.*, 2008).

Berry e colaboradores (1999) demonstraram que a suplementação periconcepcional com AF reduziu em 80% os casos de DFTN na região do norte da China (Berry, Li *et al.*, 1999). No Canadá, De Wals e colaboradores (2007)

encontraram redução de 46% na incidência de DFTN, após a fortificação de farinhas (De Wals, Tairou *et al.*, 2007). Isto evidencia que a fortificação de farinhas é importante para reduzir incidências de DFTN.

1.5 Alterações genéticas envolvidas no metabolismo do folato

As concentrações de folato e tHcy podem ser afetadas por polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo e à absorção de folato (MTHFR, RFC1, GCP2 e MTHFD1) (Shi, Caprau *et al.*, 2003; Tamura e Picciano, 2006).

1.5.1 Polimorfismos no gene da metilenotetraidrofolato redutase c.677C>T e c.1298A>C

A metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima chave no metabolismo do folato (Molloy, Brody *et al.*, 2009). A sua atividade envolve a redução de 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF, que é responsável pela remetilação de homocisteína em metionina (Callejón, Mayor-Olea *et al.*, 2007; Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008; Molloy, Brody *et al.*, 2009; Wilcken, 2012). Desse modo, há doação de grupamento metil para a síntese de purina e pirimidina e fornecimento de grupo metil para SAM (mediada pela reação de metilação). Uma particularidade desta enzima é ser termolábil (Molloy, Brody *et al.*, 2009; Wilcken, 2012). (Figura 2)

O gene MTHFR está localizado no cromossomo 1 (p 36.3) (Fabris, Toniutto *et al.*, 2009; Wilcken, 2012). O polimorfismo *MTHFR* c.677C>T (rs 1801133), localizado no éxon 4 (Naushad e Devi, 2010), resulta na substituição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 677, que acarreta como consequência a troca de uma alanina por uma valina na posição 222 da proteína (MTHFR p.A222V). Estudos demonstraram que a presença do polimorfismo

MTHFR c.677C>T acarreta deficiência na atividade da enzima MTHFR. Essa deficiência de função da MTHFR está associada com o aumento na concentração plasmática de tHcy (Frosst, Blom *et al.*, 1995; Van Der Put, Steegers-Theunissen *et al.*, 1995; Wilcken, 2012). De fato, alguns estudos mostraram que o genótipo 677TT foi associado ao maior risco para doença cardiovascular (Brattström e Wilcken, 2000; Ueland, Refsum *et al.*, 2000), câncer (Chen, Giovannucci *et al.*, 1999), demência (Nishiyama, Kato *et al.*, 2000; Yoo, Choi *et al.*, 2000), fetos com DFTN (Van Der Put, Steegers-Theunissen *et al.*, 1995; Van Der Put, Eskes *et al.*, 1997), esquizofrenia (Vares, Saetre *et al.*, 2010) e sintomas de depressão durante a gravidez (Devlin, Brain *et al.*, 2010).

Já o polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C (rs 1801121) está localizado no cromossomo 1 (p 37.5), éxon 7 (Weisberg, Tran *et al.*, 1998). Ele resultada substituição de uma adenina por uma citosina no nucleotídeo 1298 (Zetterberg, Regland *et al.*, 2002; Candito, Rivet *et al.*, 2008; Ghodke, Chopra *et al.*, 2011). Esta alteração implica na substituição de um glutamato por uma alanina na posição 429 da enzima (MTHFR p.E429A). Indivíduos homozigotos para o alelo 1298C têm atividade enzimática reduzida, porém sem alteração nas concentrações de tHcy (Van Der Put, Gabreëls *et al.*, 1998; Zetterberg, Regland *et al.*, 2002; Yaliwal e Desai, 2012). O polimorfismo pode ter efeitos clinicamente importantes se houver baixa ingestão de folato ou quando há necessidade aumentada desta vitamina, como no caso de gravidez e embriogênese (Zetterberg, Regland *et al.*, 2002).

Indivíduos homozigotos 677TT, em combinação com homozigotos 1298AA, têm atividade enzimática reduzida e aumento nas concentrações de

tHcy, com redução nas concentrações plasmáticas de folato (Kim, Park *et al.*, 2011; Yaliwal e Desai, 2012).

Estudo realizado com 140 casais com história de aborto e 140 casais com dois ou mais fetos viáveis indicou que o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T materno não pode ser considerado um fator de risco para o AER, embora tenha havido maior frequência do alelo 677T paterno nesse grupo (Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009). Além disso, o genótipo *MTHFR* 677TT não foi associado ao aumento da concentração de tHcy plasmática ao AER (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008).

Estudo realizado em Heraklion (Ilhas de Creta), com 80 amostras de tecido fetal de aborto espontâneo, mostrou que a combinação 677TT/1298AA e 677CT/1298AC foi associada ao maior risco de se ter aborto espontâneo (Zetterberg, Regland *et al.*, 2002).

Em outro estudo, os genótipos *MTHFR* 677TT e *MTHFR* 1298AC foram associados com maior risco de se ter AER, independentemente de outros fatores de risco, como uso de tabaco e ocupação (Rodríguez-Guillén, Torres-Sánchez *et al.*, 2009).

1.5.2 Polimorfismo no transportador de folato reduzido c.80G>A

O transportador de folato reduzido 1 (RFC1) participa no processo de influxo de 5-metilTHF na célula (Galbiatti, Ruiz *et al.*, 2011), sendo uma variante de SLC19A1 (Zampieri, Biselli *et al.*, 2012). (Figura 2)

O gene RFC1 está localizado no cromossomo 21 (q22.3). O polimorfismo *RFC1* c.80G>A (rs1051266), localizado no éxon 2, é responsável pela substituição de uma guanina por uma adenina na posição 80 do gene (Pei, Liu *et al.*, 2009; Galbiatti, Ruiz *et al.*, 2011). A variante do gene SLC19A1 (rs

61510559) muitas vezes é referida como *RFC1*c.80A>G. Esta mutação acarreta a substituição do aminoácido histidina por uma arginina na posição 27 da proteína (*RFC1* p.R27H) (Yates e Lucock, 2005; Ananth, Peltier *et al.*, 2008). O genótipo 80GG foi associado a baixas concentrações de folato. Em gestantes, foram observadas baixas concentrações de folato e altas concentrações de tHcy, levando ao aumento do risco de filhos com DFTN (Ananth, Peltier *et al.*, 2008; Stanisławska-Sachadyn, Mitchell *et al.*, 2009). O polimorfismo também foi associado a anomalias fetais, toxicidade ao metotrexato em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Zhao, Matherly *et al.*, 2009) e síndrome de Down (Biselli, Goloni-Bertollo *et al.*, 2008), além de alteração na metilação do DNA, na capacidade de reparo do DNA e aumento da suscetibilidade ao câncer (Galbiatti, Ruiz *et al.*, 2011).

O genótipo *RFC1* 80AA foi associado ao risco 2,7 vezes maior de se ter deslocamento da placenta quando a mulher apresentava concomitantemente baixa quantidade de folato sérico (Ananth, Peltier *et al.*, 2008).

Em estudo realizado com mães e neonatos no Brasil, o alelo *RFC1* 80G foi associado com aumento das concentrações de tHcy neonatal (Lopreato, Stabler *et al.*, 2008).

1.5.3 Polimorfismo no gene da glutamato carboxipeptidase 2 c.1561C>T

O gene glutamato carboxipeptidase 2 (GCP2) expressa a enzima folil-poliglutamato carboxipeptidase, que está ancorada na borda da membrana do intestino e tem o papel de hidrolisar o 5-metilTHF, quebrando a cauda de poliglutamato em monoglutamato, o que permite a absorção do folato dietético (Devlin, Ling *et al.*, 2000; Zhao, Matherly *et al.*, 2009). (Figura 2)

O gene GCP2 encontra-se no cromossomo 11 (p11.2) (Devlin, Ling *et al.*, 2000; Xie, Guo *et al.*, 2012). O polimorfismo GCP2 c.1561C>T (rs61886492), localizado no éxon 2, está associado à substituição de uma citosina por uma timina na posição 1561 do gene (Lopreato, Stabler *et al.*, 2008). Esta mutação acarreta a substituição do aminoácido histidina por uma tirosina na posição 475 da proteína (GCP2 p.H475Y) (Devlin, Ling *et al.*, 2000). Este polimorfismo foi relacionado à redução na atividade da enzima (Devlin, Ling *et al.*, 2000) e, também, às baixas concentrações de folato, às altas concentrações de tHcy (Devlin, Ling *et al.*, 2000; Halsted, Wong *et al.*, 2007), a sintomas de depressão e à esquizofrenia (Ye, Lai *et al.*, 2011).

Em estudo realizado com mães e neonatos no Brasil, foi demonstrado que o alelo T (genótipo CT+TT) estava associado a baixas concentrações de tHcy em mães, podendo conferir risco para os neonatos (Lopreato, Stabler *et al.*, 2008).

1.5.4 Polimorfismo no gene da metilenotetraidrofolato desidrogenase 1 c.1958G>A

A enzima metilenotetraidrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1) é NADP-dependente e trifuncional, atuando como 5,10-metilenoTHF desidrogenase, 5,10-metenilTHF cicloidrolase e 10-formilTHF sintase. Fornece três carbonos derivados de THF, que são substratos para biossíntese de timidilato, purinas e metionina (Kruszyna, Lianeri *et al.*, 2010; Neagos, Cretu *et al.*, 2010). (Figura 2)

O gene MTHFD1 encontra-se no cromossomo 14 (14q24) (Wang, Ke *et al.*, 2007). O polimorfismo MTHFD1 c.1958G>A (rs 2236225) é caracterizado pela troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 1958, o que resulta

na troca do aminoácido arginina por glutamato na posição 653 na proteína (MTHFD1 p.R653Q) (Carroll, Pangilinan *et al.*, 2009; Neagos, Cretu *et al.*, 2010). Existe a hipótese de que esta variante genética reduza a produção de 5,10-metilenoTHF e 10-formilTHF, diminuindo a disponibilidade de 5-metilTHF, o que prejudica a remetilação da homocisteína em metionina e também pode influenciar a fonte de unidades de grupamentos metil (Ivanov, Nash-Barboza *et al.*, 2009). O polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A foi associado com maior risco para diversos tipos de câncer (Wang, Ke *et al.*, 2007), DFTN, perdas fetais, desordem psiquiátrica e enxaquecas (Krajinovic, 2008), insuficiência cardíaca congestiva (Neagos, Cretu *et al.*, 2010) e descolamento pré-maturo da placenta (Parle-Mcdermott, Mills *et al.*, 2005).

O genótipo *MTHFD1* 1958AA foi associado ao maior risco de se ter aborto durante o segundo trimestre de gestação (Parle-Mcdermott, Pangilinan *et al.*, 2005).

Estudo caso-controle com 131 mulheres com AER e 131 mulheres saudáveis não mostrou associação do polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A ao AER (Crişan, Trifa *et al.*, 2011).

Em outro estudo, o polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A foi associado ao aumento de quase três vezes do risco de descolamento prematuro da placenta (Parle-Mcdermott, Mills *et al.*, 2005).

O polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A também foi associado com o risco de restrição de crescimento intrauterino em um estudo realizado com 74 mulheres na cidade de Adelaide (Austrália) (Furness, Fenech *et al.*, 2008).

Uma vez que não é conhecida a influência dos polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTHFD1* c.1958G>A, *RFC1* c.80G>A e *GCP2* c.1561C>T no risco de se ter AER e, também, não é conhecido o efeito dos mesmos nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína, em mulheres com história de AER, faz-se necessário o monitoramento genético desse grupo, devido à relevância dessas enzimas nas etapas do metabolismo do folato, tão crucial para o desenvolvimento fetal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo do folato (*RFC1*, *GCP2*, *MTHFR* e *MTHFD1*) e o risco de se ter AER, bem como avaliar a associação entre estes polimorfismos e as alterações nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Determinar o risco de se ter aborto espontâneo recorrente, segundo os genótipos dos polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *MTHFD1* c.1958G>A, *RFC1* c.80A>G e *GCP2* c.1561C>T no grupo estudo (aborto primário e aborto secundário).
- 2- Avaliar se existe influência dos polimorfismos nas concentrações de folato, cobalamina e homocisteína total em mulheres do grupo estudo (abortos primário e secundário) e do grupo controle, segundo os genótipos para os diversos polimorfismos;
- 3- Avaliar os fatores de risco de se ter aborto primário ou secundário em modelos multivariados de regressão logística que incluem variáveis sociodemográficas, bioquímicas e genéticas.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Casuística

Este estudo caso-controle realizado no período compreendido entre novembro de 2008 e setembro de 2011, na cidade de São Paulo.

Foram selecionadas 257 mulheres não grávidas com história de AER, que foram atendidas no Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (grupo estudo).

Para compor o grupo controle, foram selecionadas 264 mulheres não grávidas, que tiveram no mínimo duas gestações de termo e que não tinham história de aborto (grupo controle). Estas mulheres foram provenientes do Centro de Saúde Escola Butantã, Centro de Saúde do Rio Pequeno, funcionárias da Universidade de São Paulo e da comunidade (amigas de mulheres com história de AER).

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e da Comissão de Ética para Análise de Projetos do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPpesq), além da Secretaria de Saúde do Município de São Paulo (**ANEXOS 1, 2 e 3**).

Todas as mulheres foram informadas sobre os objetivos do estudo e consultadas sobre a vontade de participar. Sendo favoráveis, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXOS 4 e 5**). Em seguida, foi aplicado um questionário para cada mulher, para se obter as seguintes informações: idade, antecedentes obstétricos, uso de medicamentos, e ou de vitaminas (no momento da coleta ou no período gestacional), consumo de

bebidas alcoólicas, fumo, peso e estatura (**ANEXO 6**). Neste estudo, não foi realizada avaliação do consumo alimentar. Alguns dados foram retirados do prontuário das pacientes com AER: ultrassonografia transvaginal, histerossalpingografia e cariótipo do casal.

Os genótipos para os polimorfismos no gene da protrombina (*F2* c. 20210G>A) e do Fator V de Leiden (*F5* c. 1691G>A) foram obtidos em outro estudo (de nosso grupo de pesquisa) do Laboratório de Hematologia Clínica da FCF-USP.

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

3.1.1.1 Grupo estudo

Foram incluídas mulheres não grávidas com três ou mais AER e com idades entre 18 e 45 anos. Estas mulheres foram classificadas em dois grupos, de acordo com o histórico obstétrico:

- AER primário - compreendido por 117 mulheres com aborto primário (nenhum feto viável).
- AER secundário - compreendido por 139 mulheres com aborto secundário (a mulher teve pelo menos um feto viável).

3.1.1.2 Grupo controle

Foram incluídas mulheres não grávidas, com idades entre 18 e 45 anos, com história de duas ou mais gestações de termo, sem histórico de aborto, natimorto, episódios tromboembólicos e problemas obstétricos durante a gravidez. Mulheres que apresentavam hipertensão, diabetes, neoplasias e problemas tireoidianos não foram incluídas neste grupo.

3.2 Avaliação antropométrica

As mulheres foram pesadas em balanças da marca Filizola®, com precisão de 100g. A estatura foi medida em estadiômetro. O índice de massa corporal (IMC) foi obtido pela razão do peso (kg) pela altura (m) ao quadrado (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de IMC classificados segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)

IMC	CLASSIFICAÇÃO
<19,0	Subnutridas
19,0-24,9	Peso saudável
25,0-30,9	Sobrepeso
31,0-36,9	Obesidade grau I
≥37,0	Obesidade grau II (grave)

3.3 Amostras biológicas

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

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

3.4 Metodologia laboratorial

3.4.1 Determinações bioquímicas

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

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

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

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

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

3.4.2 Determinação de fator antinúcleo (FAN)

A presença de autoanticorpos circulantes (FAN) foi determinada pelo método de imunofluorescência indireta, utilizando as células de linhagem HEp-2 (células de carcinoma Laringe; BION®, Illinois, EUA). As amostras dos ensaios reagentes na diluição 1:80 foram diluídas novamente em títulos 1:160.

3.4.3 Extração e avaliação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos totais de sangue periférico, utilizando 1 mL das amostras de sangue total, submetendo-o à lise celular com 900 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0), contendo Triton X-100 a 2,5%, seguida de centrifugação por 5 minutos a 5.000 RPM. A partir desta amostra, o DNA genômico foi extraído utilizando *QIAAMP DNA BLOOD MINI kit*, de acordo com o protocolo do fabricante (PreAnalytix/Qiagen, Germany).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada através de separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0) e em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). Foram aplicados 4 µL de DNA e 1 µL de tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%) (Sambrook e Russel, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V e 60 mA, por 30 minutos, utilizando fonte EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), utilizando como referência um marcador de

tamanho molecular de DNA de 100 pb (Sambrook e Russel, 2001). A revelação do gel foi feita pelo sistema de imagem MiniBis Pro Bio-Imaging Systems (Jerusalém, Israel). As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Nanodrop Technologies, Inc – EUA) a 260 nm, enquanto a pureza das amostras do DNA foi determinada pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (Sambrook e Russel, 2001); posteriormente, foram diluídas na concentração final de 20ng/ μ L.

3.4.3.1 Avaliação dos polimorfismos *MTHFR* c.677C> T, *RFC1* c.80G> A e *GCP2* c.1561C> T

Para a determinação destes polimorfismos, foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia Polimerase-Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP). Os ensaios de PCR foram realizados com volume final de 50 μ L, contendo 200 μ M de cada primer, 1 U de Taq Polimerase e tampão 10X (contendo 2mM de $MgCl_2$). Para o polimorfismo *GCP2* c.1561C>T foram acrescentados 2 μ L de solução de $MgCl_2$ (25 mM).

A amplificação da região de interesse foi feita em termociclador (*Eppendorf*, MastercyclerGradient, Hamburgo, Alemanha). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE de 0,5 X [Tris-HCl 45 mM, HBO_3 45 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)]. A separação eletroforética foi realizada durante 30 minutos, a 100V, 60 mA em cuba de eletroforese submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA), empregando fontes EPS 301 (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). As bandas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5mg/mL), utilizando como referência um marcador de

tamanho molecular de DNA de 100 pb (Amershan-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) (Sambrook e Russel, 2001).

Como controle de qualidade, a leitura dos genótipos de cada polimorfismo foi realizada por dois observadores diferentes. Dez por cento das amostras foram repetidas e dez amostras de cada polimorfismo foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

3.4.3.2 Polimorfismo *MTHFR* c.677C>T

A genotipagem foi feita utilizando iniciadores de reação propostos por Frosst, Blom *et al.*(1995).

As condições para a PCR foram: 35 ciclos de desnaturação inicial a 96°C, por 3 minutos, desnaturação a 95°C, por um minuto, hibridização a 65°C, durante um minuto, extensão a 72°C, por um minuto, e extensão final a 72°C, por 7 minutos. O tamanho do fragmento gerado foi de 198 pb, submerso em tampão TBE 0,5X (Tris-EDTA-Borato).

O amplicon foi digerido pela enzima *Hinf* I e incubado a 37°C, por 3 horas. A identificação foi feita em gel de agarose a 2% em tampão TBE de 0,5 X (Tris-HCl a 45mM, H₃BO₃ 45 mM, EDTA a 1 mM pH 8,0), por 30 minutos, a 100V, 60mA, utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb (Amershan-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O genótipo ancestral CC apresentou um único fragmento de 198 pb; o heterozigoto CT apresentou fragmentos com 198pb, 176pb e 22 pb e o genótipo homozigoto mutado TT apresentou os fragmentos com 176pb e 22pb (Figura 3).

Figura 3. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição *Hinf I* para o polimorfismo *MTHFR* c. 677C>T após coloração com brometo de etídeo

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

3.4.3.3 Polimorfismo *RFC1* c.80G>A

Para detecção dos genótipos, foram utilizados iniciadores propostos por (Födinger, Dierkes *et al.*, 2003).

As condições para a PCR foram: 32 ou 38 ciclos de desnaturação inicial a 96°C, por 3 minutos, desnaturação a 95°C, por um minuto, hibridização a 55,1°C, durante um minuto, extensão a 72°C, por um minuto, e extensão final a 72°C, por 10 minutos. O amplicon de 230 pb foi digerido pela enzima *Hha I* e incubado a 37°C, por 3 horas. A identificação foi feita em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE de 1 X (Tris-HCl a 45 mM, H₂BO₃ 45 mM, EDTA a 1 mM pH 8,0), por 4 horas, a 120V, 15mA, utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 50 pb (Amershan-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). O genótipo ancestral AA apresentou fragmentos de 162 pb e 68 pb; o genótipo heterozigoto AG apresentou fragmentos com 162 pb, 125pb, 68pb e 37pb e o

genótipo homozigoto mutado GG apresentou os fragmentos com 125pb, 68pb e 37 pb (Figura 4).

Figura 4. Eletroforese, em gel de poliacrilamida a 8%, dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição *HhaI* para o polimorfismo *RFC1* c.80G>A. Genótipos: 1= AG; 2= AG; 3= AG; 4= AG; 5= AG; 6= AG; 7= marcador de tamanho de DNA de 50 pares de base; 8= AG ; 9= AA; 10= AG; 11= AG; 12= AG; 13= GG; 14= AG; 15= AG; 16= AG; 17= GG; 18= GG; 19= AA; 20= AA

3.4.3.4 Polimorfismo *GCP2* c.1561C>T

Para a detecção dos genótipos, foram utilizados iniciadores propostos por (Devlin, Ling *et al.*, 2000).

As condições para a PCR foram: 36 ciclos de desnaturação inicial a 96°C, por 3 minutos, desnaturação a 95°C, por um minuto, hibridização a 60° C, durante um minuto, extensão a 72°C, por um minuto, e extensão final a 72°C, por 7 minutos. O amplicon gerado(244 pb) foi digerido pela enzima *AccI* e incubado a 37°C por 4 horas. A identificação foi feita em gel de agarosea 2% em

tampão TBE de 0,5 X (Tris-HCl a 45mM, HBO_3 45 mM, EDTA a 1 mM pH 8,0), por 30 minutos, a 100V, 60mA). O genótipo selvagem CC apresentou um único fragmento de 244 pb; o heterozigoto CT apresentou fragmentos com 103pb, 141pb e 244 pb e o genótipo homozigoto mutado TT apresentou os fragmentos com 103pb e 141pb (Figura 5).

Figura 5. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, dos produtos da PCR digeridos pela enzima de restrição *AccI* para o polimorfismo *GCP2* c.1561C>T após coloração com brometo de etídeo

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

3.4.3.5 Análise dos polimorfismos *MTHFR* c.1298A>C e *MTHFD1* c.1598G>A

A genotipagem dos polimorfismos *MTHFR* c.1298A>C e *MTHFD1* c.1598G>A foi feita pela técnica de PCR em tempo real, utilizando ensaios específicos da Applied Biosystem (Applied Biosystems, Foster City, USA). A descrição dos polimorfismos e o número dos ensaios utilizados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos polimorfismos estudados. Genotipagem feita pela técnica de PCR em tempo real (*MTHFR* c.1298A>C e *MTHFD1* c.198G>A)

Identificação do gene	Polimorfismo	Referência do SNP	Nº do ensaio
4522	<i>MTHFD1</i> c.1958G>A	rs2236225	C_1376137_10
4524	<i>MTHFR</i> c.1298A>C	Rs1801131	C_850486_20

Como controle de qualidade de cada polimorfismo, duas amostras de cada genótipo (homozigoto ancestral, heterozigoto e homozigoto mutado) foram sequenciadas no Serviço de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP.

3.5 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

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

O teste *t* de *Student* ou teste Exato de Fisher foi utilizado para comparar as médias, enquanto a comparação das frequências foi feita através dos testes Qui-quadrado ou *Likelihood ratio*.

As médias das concentrações de cobalamina, folato sérico e tHcy foram comparadas pela análise de variância unidirecional (ANOVA). Quando este teste foi significativo, realizou-se o teste *post hoc* de Tukey.

A razão de risco foi analisada por regressão logística univariada para os genótipos dos polimorfismos estudados.

O risco de aborto foi analisado por regressão logística multivariada, utilizando-se dois modelos: 1- a variável dependente é ter aborto primário; 2- a variável foi aborto secundário. As variáveis independentes incluídas nos dois modelos foram: idade, fumo, uso de contraceptivos orais, frequência de uso de bebidas alcoólicas, IMC; concentrações de folato sérico (nmol/L), de Cbl (pmol/L), de tHcy ($\mu\text{mol/L}$) e de hormônio T4; genótipos para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T (CC vs CT +TT), presença de FAN reagente (título 1:160), genótipos para o polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C (AA vs AC + CC), genótipos para o polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A (GG vs GA + AA), genótipos para o polimorfismo *RFC1* c.80G>A (GG vs GA + AA) e genótipos para o polimorfismo *GCP2* c.1561C>T (CC vs CT + TT).

O nível de significância adotado foi de 5% ou $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características gerais

Foram incluídas 257 mulheres no grupo estudo, sendo que 117 tiveram abortos primários e 139 abortos secundários.

Foram também incluídas 264 mulheres no grupo controle.

Os dados sócio demográficos (idade, IMC, uso de: contraceptivos orais, bebidas alcoólicas e fumo) e as frequências de mulheres, segundo o período em que ocorreram as perdas, estão descritos na Tabela 1.

Houve diferença significativa entre as idades das mulheres AER primário e secundário. As idades das mulheres do grupo controle foram semelhantes às idades das mulheres dos AER primário e secundário. Não houve diferença significativa quanto ao IMC, ao uso de contraceptivo oral e ao tabagismo nos três grupos.

Quanto ao uso de bebidas alcoólicas, as mulheres AER primário apresentaram maior consumo do que as mulheres do grupo controle.

As mulheres do AER primário e secundário foram semelhantes quanto ao número de perdas fetais consecutivas e ao período em que ocorreram as perdas (Tabela 3).

Tabela 3. Características das mulheres dos grupos estudo (abortos primário e secundário) e controle, quanto a: idade, IMC, uso de contraceptivo oral, tabagista e uso de bebidas alcoólicas, número consecutivos de perdas e período das perdas

	AER primário N= 117	AER secundário N= 139	Controle N= 264	P valor
Idade (anos completos)	32,3 (31,1 – 33,4) ^a	34,2 (33,2 – 35,2) ^b	33,4 (32,7 – 34,1) ^{a,b}	0,028
Grupos segundo o intervalo de idade (%)				
18 – 20 anos	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0,306
20 – 24 anos	10 (8,5)	6 (4,3)	17 (6,4)	
25 – 29 anos	27 (23,1)	25 (18,0)	38 (14,4)	
30 – 34 anos	38 (32,5)	39 (28,1)	93 (35,2)	
35 – 39 anos	25 (21,4)	43 (30,9)	67 (25,4)	
40 – 45 anos	16 (13,7)	26 (18,7)	46 (17,4)	
Grupos segundo o IMC (%)				
IMC <19	4 (3,4)	5 (3,6)	13 (4,9)	0,687
IMC 19,0 a 24,9	58 (50,0)	59 (42,8)	132 (50,0)	
IMC 25,0 a 30,9	41 (35,3)	52 (37,7)	94 (35,6)	
IMC 31,0 a 36,9	9 (7,8)	17 (12,3)	20 (7,6)	
IMC ≥ 37,0	4(3,4)	5 (3,6)	5 (1,9)	
Uso de Contraceptivo oral (%)				
Sim	33 (28,0)	37 (26,6)	79(29,9)	0,777***
Tabagista ^b				
Sim	18 (15,4)	31 (22,3)	40 (15,2)	0.183***
Número de cigarros	11,0 (6,1 – 15,9)	10,7 (7,5 – 14,0)	10,0 (7,9 – 12,1)	0,886***
Uso de bebidas alcoólicas(%)				
Sim	55(47,0)	58 (41,7)	95 (36,0)	0,043**
Frequência do uso de álcool				
Menos que uma vez na semana	31 (56,4)	37 (63,8)	42 (44,2)	
Uma ou duas vezes na semana	19 (34,5)	18 (31,0)	51 (53,7)	
Três ou quatro vezes na semana	3 (5,5)	1 (1,7)	1 (1,1)	
Cinco ou seis vezes na semana	1 (1,8)	2 (3,4)	1 (1,1)	
Diariamente	1 (1,8)	0	0	

(continuação tabela 3)

Números consecutivos de perdas(%)

3	64 (54,7)	73 (52,5)	0,429**
4	22 (18,8)	38 (27,3)	
5	19 (16,2)	18 (12,9)	
6	5 (4,2)	3 (2,2)	
7	3 (2,6)	3 (2,2)	
8	2 (1,7)	1 (0,7)	
9	1 (0,9)	1 (0,7)	
10	0	2 (1,4)	
13	1 (0,9)	0	

Período das Perdas^b

Precoce (<13 semanas)	79 (67,5)	80 (57,6)	0,101
Tardio (≥13 semanas)	38 (32,5)	59 (42,4)	

IMC: Índice de massa corpórea. N: número de amostras.

As variáveis contínuas foram expressas em média (IC 95%), teste t Student.

Os dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). * Teste Exato de Fisher,

** *LikelihoodRatio*. ***Qui-quadrado

Letras diferentes significam que as médias são diferentes entre as combinações de genótipos

Comparação entre:

Fumo: Grupo de aborto primário e grupo controle P=0,824; Grupo de aborto secundário e grupo controle P= 0,052

Uso e contraceptivo: Grupo de aborto primário e grupo controle P=0,698; Grupo de aborto secundário e grupo controle P= 0,486

As variáveis: número de abortos consecutivos e período das perdas foram comparadas do AER primário e secundário.

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

4.2 Dosagens bioquímicas, vitamínicas e tireoidianas

Houve maior frequência de mulheres que estavam fazendo uso de ácido fólico no momento da coleta do sangue no AER primário (8,5%) e secundário (6,5%), quando comparadas às mulheres do grupo controle (0,4%) (Tabela 4).

Tabela 4. Uso de ácido fólico pelas mulheres do AER primário, secundário e grupo controle

Uso Ácido Fólico	AER primário	AER secundário	Controle	P valor
Não tomou	26 (22,2)	21 (15,2)	115 (43,6)	< 0,001*
Usa atualmente	10 (8,5)	9 (6,5)	1 (0,4)	
Durante a gestação	72 (61,6)	108 (78,3)	147(55,6)	
Sem estar grávida	9 (7,7)	0 (0)	0 (0)	
TOTAL	117 (100,0)	138 (100,0)	264 (100,0)	

Os dados correspondem ao número de mulheres (porcentagem) *Qui-quadrado.

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

As concentrações de folato sérico, cobalamina, creatinina sérica, glicemia, T3e T4 foram diferentes entre os três grupos.

As mulheres do AER primário apresentaram maior concentração de ácido fólico do que as mulheres do AER secundário e estas, por sua vez, apresentaram maiores concentrações desta vitamina do que as mulheres do grupo controle (Tabela 5 e Figura 7).

As concentrações de cobalamina sérica das mulheres do AER primário e secundário foram maiores do que a concentração do grupo controle (Tabela 5 e Figura 6).

As concentrações de creatinina foram diferentes entre o AER primário e o grupo controle, enquanto que as concentrações de creatinina das mulheres do AER secundário foram semelhantes às mulheres AER primário e grupo controle.

As mulheres do AER primário apresentaram maiores concentrações de T4 quando comparada às mulheres do AER secundário e grupo controle.

As mulheres do AER secundário apresentaram menores concentrações de glicemia e de T3, quando comparadas às mulheres do AER primário e grupo controle.

Não houve diferença significativa nas concentrações de tHcy entre os três grupos (Tabela 5 e Figura 8).

As concentrações de AST, ALT e TSH foram semelhantes nos três grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Dados bioquímicos das mulheres do AER primário, secundário e grupo controle

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

Os valores correspondem as médias e os desvios padrão (entre parênteses). * Testes t Student.

Letras diferentes significam que as médias são diferentes

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

AST: Aspartato amino transferase; ALT: Alanina amino transferase; TSH: hormônio estimulante da tireóide; T3: tiiodotironina; T4: tiroxina.

Três mulheres do grupo controle apresentaram concentrações de cobalamina acima de 2.000 pmol/L, sendo excluídas da análise.

Figura 6. Distribuição da concentração de cobalamina nos três grupos estudados.

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Três mulheres do grupo controle apresentaram concentrações de cobalamina acima de 2.000 pmol/L, sendo excluídas da análise

Figura 7. Distribuição da concentração de folato sérico nos três grupos estudados.

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Figura 8. Distribuição dos valores de homocisteína total nos três grupos estudados

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

4.3 Análise da frequência de polimorfismos genéticos

A frequência dos genótipos, alelos e haplótipos, para os polimorfismos

MTHFR c.677C>T e c.1298A>C, foi semelhante nos três grupos (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência dos genótipos, alelos e haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, c.1298A>C do AER primário, secundário e grupo controle

Genótipos dos polimorfismos	AER primário N= 117	AER secundário N= 139	Controle N= 264	P valor
<i>MTHFR c. 677C>T</i>				
CC	60 (51,3)	70 (50.4)	127 (48,1)	0,454*
CT	45 (38,5)	62 (44.6)	111 (42,0)	
TT	12 (10,2)	7 (5.0)	26 (9,9)	
Frequência alélica				
Alelo C	60,5 %	72.7 %	69,1 %	0,579*
Alelo T	29,5 %	27.3 %	30,9 %	
HWE	p> 0,05	P >0.05	p> 0,05	
<i>MTHFR c. 1298A>C</i>				
AA	69 (59,0)	79 (56.8)	152(57,6)	0,906 *
AC	41 (35,0)	50 (36.0)	99(37,5)	
CC	7 (6,0)	10 (7.2)	13 (4,9)	
Frequência alélica				
Alelo A	76,5 %	74.8 %	76,3 %	0,872*
Alelo C	23,5 %	25.2 %	23,7 %	
HWE	P>0,05	P >0.05	p>0,05	
Haplótipos para MTHFR (677C>T e 1298 A>C)				
CC/AA	24 (20,5)	36 (25,9)	54 (20,5)	0,362**
CC/AC	29 (24,8)	24 (17,3)	60 (22,7)	
CC/CC	7 (6,0)	10 (7,2)	12 (4,9)	
CT/AA	33 (28,2)	36 (25,9)	75 (28,4)	
CT/AC	12 (10,3)	26 (18,7)	36 (13,6)	
TT/AA	12 (10,3)	7 (5,0)	24 (9,1)	
TT/AC	0 (0)	0 (0)	2 (0,8)	

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

*Qui-Quadrado, ** Likelihoodratio, HWE: Equilíbrio Hardy Weinberg

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Considerando que outros fatores foram associados ao aborto recorrente (polimorfismos no gene da protrombina (*F2* c. 20210G>A) e ao Fator V de Leiden (*F5* c. 1691G>A), alteração nos cariótipos das mulheres, anomalias uterinas, hipotireoidismo e doenças autoimunes), decidimos excluir as mulheres que apresentavam estas causas. Os resultados obtidos foram os mesmos observados anteriormente, não havendo diferença nas frequências de genótipos, alelos e haplótipos entre os grupos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, c.1298A>C (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência dos genótipos, alelos e haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, c.1298A>C do AER primário, secundário e grupo controle, após excluir causas conhecidas de abortos

Genótipos dos polimorfismos	AER primário N = 70	AER secundário N = 78	Controle N = 227	P valor
<i>MTHFR c. 677C>T</i>				
CC	34 (48,6)	41 (48,6)	108 (47,6)	0,709*
CT	30 (42,8)	33 (42,3)	96 (42,3)	
TT	6 (8,6)	4 (5,1)	23 (10,1)	
Frequência alélica				
Alelo C	70,0 %	73,7 %	68,7 %	0,502*
Alelo T	30,0 %	26,3 %	31,3 %	
HWE	p> 0,05	p>0,05	p> 0,05	
<i>MTHFR c. 1298A>C</i>				
AA	37 (52,9)	44 (56,4)	134(59,0)	0,784*
AC	27 (38,6)	30 (38,5)	82(36,1)	
CC	6 (8,6)	4 (5,1)	11 (4,8)	
Frequência alélica				
Alelo A	72,1 %	75,6 %	77,1 %	0,487*
Alelo C	27,9 %	24,4 %	22,9 %	
HWE	P>0,05	P> 0,05	p>0,05	

Continuação tabela 7

Haplótipos para MTHFR**(677C>T e 1298 A>C)**

CC/AA	10 (14,3)	21 (26,9)	49 (21,6)	0,668*
CC/AC	18 (25,7)	16 (20,5)	48 (21,1)	
CC/CC	6 (8,6)	4 (5,1)	11 (4,8)	
CT/AA	21 (30,0)	19 (24,4)	65 (28,6)	
CT/AC	9 (12,9)	14 (17,9)	31 (13,7)	
TT/AA	6 (8,6)	4 (5,1)	21 (9,3)	
TT/AC	0 (0)	0 (0)	2 (0,9)	

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

*Qui-Quadrado, HWE: Equilíbrio Hardy Weinberg

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T e c.1298A>C não foram associados ao maior risco de se ter aborto primário (Modelo 1) ou secundário (Modelo 2) (Tabela 8).

Tabela 8. Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou aborto secundário (Modelo 2)

Genótipos	Modelo 1		Modelo 2	
	OR (IC 95%)	P valor	OR (IC 95%)	P valor
CC versus CT + TT <i>MTHFR</i> 677C>T	0,94 (0,67 – 1,31)	0,706	0,84 (0,60 – 1,17)	0,290
AA versus AC + CC <i>MTHFR</i> 1298A>C	0,99 (0,69 – 1,43)	0,959	1,09 (0,77 – 1,52)	0,634

Modelo 1: mulheres de aborto primário e mulheres do grupo controle.

Modelo 2: mulheres de aborto secundário e mulheres do grupo controle.

OR: Odds ratio (IC 95%)

A frequência dos genótipos, alelos e haplótipos para os polimorfismos *RFC1* c.80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A foi semelhante nos três grupos (Tabela 9).

Tabela 9. Frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos *RFC1* c.80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A do AER primário, secundário e grupo controle

Genótipos dos polimorfismos	AER primário N= 117	AER secundário N= 139	Controle N= 264	P valor
<i>RFC1 c. 80G>A</i>				
GG	30 (25,6)	42 (30,2)	57 (21,6)	0,213*
GA	59 (50,5)	68 (48,9)	153 (58,0)	
AA	28 (23,9)	29 (20,9)	54 (20,4)	
Frequência alélica				
Alelo G	50,9 %	54,7 %	50,6 %	0,516*
Alelo A	49,1 %	45,3 %	49,4 %	
HWE	P> 0,05	P> 0,05	P<0,05	
<i>GCP2 c.1561C>T</i>				
CC	109 (93,2)	127 (91,4)	250 (94,7)	0,302*
CT	8 (6,8)	10 (7,2)	14 (5,3)	
TT	0 (0)	2 (1,4)	0 (0)	
Frequência alélica				
Alelo C	96,6 %	95,0 %	97,3 %	0,212*
Alelo T	3,4 %	5,0 %	2,7 %	
HWE	p> 0,05	P> 0,05	p> 0,05	
<i>MTHFD1 c.1958G>A</i>				
GG	50 (42,7)	46 (33,1)	88 (33,3)	0,217*
GA	50 (42,7)	77 (55,4)	133 (50,4)	
AA	17 (14,6)	16 (11,5)	43 (16,3)	
Frequência alélica				
Alelo G	64,1 %	60,8 %	58,5 %	0.344*
Alelo A	35,9 %	39,2 %	41,5 %	
HWE	p> 0,05	P> 0,05	p> 0,05	

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

*Qui-Quadrado, HWE: Equilíbrio Hardy Weinberg

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Não houve diferença entre as frequências de genótipos e alelos nos três grupos estudados (Tabela 10).

Os polimorfismos *RFC1* c.80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A não foram associados ao risco de se ter AER, mesmo após a exclusão das outras causas (polimorfismos no gene da protrombina (*F2* c.20210G>A) e do Fator V de Leiden (*F5* c. 1691G>A), alteração nos cariótipos das mulheres, anomalias uterinas, hipotireoidismo e doenças autoimunes), Tabela 10.

Tabela 10. Frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos *RFC1* c.80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A do AER primário, secundário e grupo controle, após excluir causas conhecidas de abortos

Genótipos dos polimorfismos	AER primário N = 70	AER secundário N = 78	Controle N = 227	P valor
<i>RFC1 c. 80G>A</i>				
GG	15 (21,4)	23 (29,5)	43 (18,9)	0,213*
GA	36 (51,4)	38 (48,7)	138 (60,8)	
AA	19 (27,1)	17 (21,8)	46 (20,3)	
Frequência alélica				
Alelo G	47,0 %	53,8 %	49,3 %	0,483*
Alelo A	52,9 %	46,2 %	50,7 %	
HWE	P> 0,05	P> 0,05	P<0,05	
<i>GCP2 c.1561C>T</i>				
CC	66 (94,3)	70 (89,7)	216 (95,2)	0,302*
CT	4 (5,7)	7 (9,0)	11 (4,8)	
TT	0 (0)	1 (1,3)	0 (0)	
Frequência alélica				
Alelo C	97,1 %	94,2 %	97,6 %	0,119*
Alelo T	2,9 %	5,8 %	2,4 %	
HWE	p> 0,05	p> 0,05	p> 0,05	

Continuação tabela 10***MTHFD1 c.1958G>A***

GG	33 (47,1)	27 (34,6)	79 (34,8)	0,217*
GA	24 (34,3)	46 (59,0)	109 (48,0)	
AA	13 (18,6)	5 (6,4)	39 (17,2)	
Frequência alélica				
Alelo G	64,3 %	64,1 %	58,8 %	0,337*
Alelo A	35,7 %	35,9 %	41,2 %	
HWE	p> 0,05	p> 0,05	p> 0,05	

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

*Qui-Quadrado, HWE: Equilíbrio Hardy Weinberg

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Após realizar a comparação entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes estudados (MTHFR, GCP2, RFC1 e MTHFD1), tanto com o conjunto de mulheres que têm causas conhecidas quanto com o conjunto de mulheres sem causas conhecidas de aborto (Tabelas 7 e 10), decidiu-se manter todas as mulheres nas análises seguintes, pois não houve diferença significativa nesta comparação.

Tabela 11. Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2)

Genótipo	Modelo 1		Modelo 2	
	OR (IC 95%)	P valor	OR (IC 95%)	P valor
GG versus GA + AA <i>RFC1 c.80A>G</i>	0,99 (0,71 – 1,37)	0,938	0,83 (0,61 – 1,13)	0,243
CC versus CT + TT <i>GCP2 c.1561C>T</i>	0,76 (0,31 – 1,88)	0,555	—	—
GG versus GA + AA <i>MTHFD1 c.1958G>A</i>	0,79 (0,57 – 1,09)	0,147	0,90 (0,66 – 1,23)	0,516

Modelo 1: mulheres de aborto primário e mulheres do grupo controle.

Modelo 2: mulheres de aborto secundário e mulheres do grupo controle.- Não houve mulheres com genótipo TT.

OR: Odds ratio (IC 95%)

Nas tabelas 12, 13, 14 e 15 estão apresentadas as frequências de mulheres segundo a combinação de genótipos para os polimorfismos estudados.

Tabela 12. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos *MTHFR c.677C>T*, *MTHFR c.1298A>C*, *MTHFD1 c.1958G>A*, *GCP2 c.1561 C>T* e *RFC1 c.80G>A* do AER primário, secundário e grupo controle

	AER primário			AER secundário			Controle		
	MTHFR c.677C>T			MTHFR c.677C>T			MTHFR c.677C>T		
MTHFR c.1298A>C	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
AA	24 (40,0)	33 (73,3)	12 (100,0)	36 (51,4)	36 (58,1)	7 (100,0)	53 (41,7)	75 (67,6)	24 (92,3)
AC	29 (48,3)	12 (26,7)	0 (0)	24 (34,3)	26 (41,9)	0 (0)	61 (48,0)	36 (32,4)	2 (7,7)
CC	7 (11,7)	0 (0)	0 (0)	10 (14,3)	0 (0)	0 (0)	13 (10,2)	0 (0)	0 (0)
P valor	< 0,001*			< 0,001*			< 0,001*		
MTHFD1 c.1958G>A									
GG	28 (46,7)	17 (37,8)	5 (41,7)	25 (35,7)	19 (30,6)	2 (28,6)	42 (33,1)	34 (30,6)	12 (46,2)
GA	26 (43,3)	17 (37,8)	7 (58,3)	36 (51,4)	36 (58,1)	5 (71,4)	61 (48,0)	60 (54,1)	12 (46,2)
AA	6 (10,0)	11 (24,4)	0 (0)	9 (12,9)	7 (11,3)	0 (0)	24 (18,9)	17 (15,3)	2 (7,7)
P valor	0,080*			0,626*			0,411*		
GCP2 c.1561 C>T									
CC	55 (91,7)	42 (93,3)	12 (100,0)	64 (91,4)	57 (91,9)	6 (85,7)	120 (94,5)	104 (93,7)	26 (100,0)
CT	5 (8,3)	3 (6,7)	0 (0)	5 (7,1)	4 (6,5)	1 (14,3)	7 (5,5)	7 (6,3)	0 (0)
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,4)	1 (1,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
P valor	0,387*			0,955*			0,217*		
RFC1 c.80G>A									
GG	12 (20,0)	15 (33,3)	3 (25,0)	29 (41,4)	11 (17,7)	2 (28,6)	26 (20,5)	28 (25,2)	3 (11,5)
GA	30 (50,0)	22 (48,9)	7 (58,3)	29 (41,4)	35 (56,5)	4 (57,1)	74 (58,3)	62 (55,9)	17 (65,4)
AA	18 (30,0)	8 (17,8)	2 (16,7)	12 (17,1)	16 (25,8)	1 (14,3)	27 (21,3)	21 (18,9)	6 (23,1)
P valor	0,426*			0,053*			0,598*		

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

Frequência absoluta e relativa entre parênteses. *Likelihood Ratio **Qui-quadrado

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Tabela 13. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos *RFC1 c.80G>A*, *MTHFR c.1298A>C*, *MTHFD1 c.1958G>A*, *GCP2 c.1561 C>T* e do AER primário, secundário e grupo controle

	AER primário <i>RFC1 c.80G>A</i>			AER secundário <i>RFC1 c.80G>A</i>			Controle <i>RFC1 c.80G>A</i>		
<i>MTHFR c.1298A>C</i>	GG	GA	AA	GG	GA	AA	GG	GA	AA
AA	16 (53,3)	40 (67,8)	13 (46,4)	19 (45,2)	37 (54,4)	23 (79,3)	32 (56,1)	95 (62,1)	25 (46,3)
AC	11 (36,7)	17 (28,8)	13 (46,4)	17 (40,5)	27 (39,7)	6 (20,7)	22 (38,6)	52 (34,0)	25 (46,3)
CC	3 (10,0)	2 (3,4)	2 (7,1)	6 (14,3)	4 (5,9)	0 (0)	3 (5,3)	6 (3,9)	4 (7,4)
P valor		0,299*			0,012*			0,362*	
<i>MTHFD1 c.1958G>A</i>									
GG	8 (26,7)	27 (45,8)	15 (53,6)	13 (31,0)	27 (39,7)	6 (20,7)	15 (26,3)	54 (35,3)	19 (35,2)
GA	17 (56,7)	24 (40,7)	9 (32,1)	25 (59,5)	33 (48,5)	19 (65,5)	33 (57,9)	74 (48,4)	26 (48,1)
AA	5 (16,7)	8 (13,6)	4 (14,3)	4 (9,5)	8 (11,8)	4 (13,8)	9 (15,8)	25 (16,3)	9 (16,7)
P valor		0,287**			0,430**			0,754**	
<i>GCP2 c.1561 C>T</i>									
CC	28 (93,3)	55 (93,2)	26 (92,9)	39 (92,9)	62 (91,2)	26 (89,7)	55 (96,5)	143 (93,5)	52 (96,3)
CT	2 (6,7)	4 (6,8)	2 (7,1)	3 (7,1)	4 (5,9)	3 (10,3)	2 (3,5)	10 (6,5)	2 (3,7)
TT	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
P valor		0,997*			0,492*			0,562*	

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

Frequência absoluta e relativa entre parênteses. *Likelihood Ratio **Qui-quadrado

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Tabela 14. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos *GCP2 c.1561 C>T*, *MTHFR c.1298A>C* e *MTHFD1 c.1958G>A* do AER primário, secundário e grupo controle

	AER primário <i>GCP2 c.1561 C>T</i>			AER secundário <i>GCP2 c.1561 C>T</i>			Controle <i>GCP2 c.1561 C>T</i>		
<i>MTHFR c.1298A>C</i>	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
AA	64 (58,7)	5 (62,5)	0 (0)	72 (56,7)	7 (70,0)	0 (0)	141 (56,4)	11 (78,6)	0 (0)
AC	38 (34,9)	3 (37,5)	0 (0)	45 (35,4)	3 (30,0)	2 (100,0)	96 (38,4)	3 (21,4)	0 (0)
CC	7 (6,4)	0 (0)	0 (0)	10 (7,9)	0 (0)	0 (0)	13 (5,2)	0 (0)	0 (0)
P valor		0,599*			0,199*			0,162*	
<i>MTHFD1 c.1958G>A</i>									
GG	46 (42,2)	4 (50,0)	0 (0)	43 (33,9)	3 (30,0)	0 (0)	86 (34,4)	2 (14,3)	0 (0)
GA	48 (44,0)	2 (25,0)	0 (0)	71 (55,9)	5 (50,0)	1 (50,0)	123 (49,2)	10 (71,4)	0 (0)
AA	15 (13,8)	2 (25,0)	0 (0)	13 (10,2)	2 (20,0)	1 (50,0)	41 (16,4)	2 (14,3)	0 (0)
P valor		0,502*			0,471*			0,199*	

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

Frequência absoluta e relativa entre parênteses. *Likelihood Ratio **Qui-quadrado

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Tabela 15. Frequência de combinação de genótipos para os polimorfismos *MTHFR c.1298A>C* e *MTHFD1 c.1958G>A* do AER primário, secundário e grupo controle

	Aborto Primário N = 117			Aborto Secundário N = 139			Controle n= 264		
	<i>MTHFR c.1298A>C</i>			<i>MTHFR c.1298A>C</i>			<i>MTHFR c.1298A>C</i>		
<i>MTHFD1 c.1958G>A</i>	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
GG	27 (39,1)	21 (51,2)	2 (28,6)	24 (30,4)	20 (40,0)	2 (20,0)	55 (36,2)	29 (29,3)	4 (30,8)
GA	29 (42,0)	17 (41,5)	4 (57,1)	46 (58,2)	24 (48,0)	7 (70,0)	82 (53,9)	47 (47,5)	4 (30,8)
AA	13 (18,8)	3 (7,3)	1 (14,3)	9 (11,4)	6 (12,0)	1 (10,0)	15 (9,9)	23 (23,2)	5 (38,5)
P valor	0,414**			0,656**			0,011**		

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

Frequência absoluta e relativa entre parênteses. *Likelihood Ratio **Qui-quadrado

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

As mulheres portadoras de genótipo TT para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T apresentaram maiores concentrações de tHcy, quando comparadas com as portadoras de genótipos CC e CT nos três grupos. No grupo controle, as portadoras do genótipo TT para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T apresentaram maiores concentrações de folato, quando comparado com as portadoras de genótipos CC e CT.

As mulheres portadoras de genótipo CT para o polimorfismo *GCP2* c.1561C>T apresentaram maiores concentrações de tHcy, quando comparadas com as portadoras de genótipo CC no AER secundário.

As mulheres portadoras de genótipo GA para o polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A apresentaram maiores concentrações de tHcy, quando comparadas com as portadoras do genótipo GG no AER primário.

Não houve diferença significativa entre as concentrações de cobalamina Cbl, folato sérico e tHcy, segundo os genótipos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, c.1298A>C, *RFC1* c. 80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A (Tabela 16).

Tabela 16. Concentrações de folato sérico, cobalamina e homocisteína total das mulheres do AER primário, secundário e grupo controle, segundo os genótipos para os polimorfismos *MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *RFC1* c. 80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A

Polimorfismo	AER primário			AER secundário			Controle		
	Cbl (pmol/L)	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μmol/L)	Cbl (pmol/L)	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μmol/L)	Cbl (pmol/L)	Folato sérico (nmol/L)	tHcy (μmol/L)
<i>MTHFR</i> c.677C>T									
CC	468 (426 - 509) N= 60	61,9 (40,6 - 83,1) N= 60	8,9 (8,4 - 9,3) ^a N= 60	451 (407 - 495) N= 70	40,4 (36,2 - 44,6) N= 70	9,1 (8,6 - 9,6) ^a N=70	399 (367 - 431) N= 127	32,3 (30,1 - 34,5) ^a N= 127	9,2 (8,8 - 9,6) ^a N= 127
CT	439 (386– 492) N= 45	43,0 (35,7 - 50,4) N= 45	9,3 (8,7 - 10,0) ^a N= 45	434 (376 - 493) N= 62	37,1 (32,3 - 42,0) N= 62	10,4 (8,2 - 12,6) ^a N= 60	396 (361 - 430) N= 108	32,9 (30,5 - 35,3) ^a N= 111	9,8 (9,1 - 10,5) ^a N= 111
TT	463 (318 -608) N= 12	35,9 (20,6 - 51,2) N= 12	10,9 (9,4 - 12,4) ^b N=12	388 (239 - 538) N= 7	23,2 (9,4 - 37,1) N= 7	22,1 (5,7 - 38,5) ^b N= 7	358 (293 - 422) N= 26	24,8 (19,9 - 29,7) ^b N= 26	12,9 (8,8 - 17,0) ^b N= 26
ANOVA (p valor)	0,705	0,196	0,005	0,709	0,055	<0,001	0,557	0,011	<0,001
<i>MTHFR</i> c.1298A>C									
AA	437 (397 - 478) N= 69	46,6 (34,7 - 58,6) N= 69	9,6 (9,1 - 10,1) N= 69	463 (414 - 512) N= 79	38,6 (34,3 - 42,9) N= 79	10,8 (8,7 - 13,0) N= 79	397 (368 - 426) N= 150	31,6 (29,6 - 33,6) N= 152	10,0 (9,2 - 10,9) N= 152
AC	488 (429 - 548) N= 41	62,3 (36,4 - 88,2) N= 41	8,8 (8,2 - 9,4) N= 41	399 (349 - 450) N= 50	36,6 (31,8 - 41,3) N= 50	9,9 (9,1 - 10,6) N= 50	389 (353 - 425) N= 98	31,5 (28,9 - 34,2) N= 99	9,5 (9,0 - 10,0) N= 99
CC	456 (334 - 579) N= 7	44,0 (32,1 - 55,9) N= 7	8,5 (7,5 - 9,4) N= 7	464 (329 - 600) N= 10	41,5 (24,6 - 58,4) N= 10	8,8 (6,4 - 11,2) N= 10	384 (280 - 489) N= 13	36,1 (28,9 - 43,3) N= 13	9,7 (8,3 - 11,1) N= 13
ANOVA (P valor)	0,337	0,419	0,098	0,211	0,694	0,622	0,921	0,468	0,608
<i>RFC1</i> c. 80G>A									
GG	450 (386 - 514) N= 30	42,5 (35,4 –49,5) N= 30	9,1 (8,3 – 10,0) N= 30	414 (352 -477) N= 42	34,6 (29,4 – 39,8) N=42	11,6 (8,2 –14,9) N= 42	410 (366 - 454) N=55	31,2 (27,6 –34,8) N= 57	9,8 (8,6 –11,0) N= 57
GA	468 (422 -515) N= 59	49,3 (35,5 –63,1) N= 59	9,2 (8,7 - 9,7) N= 59	429 (388 -470) N= 68	38,3 (34,0 -42,6) N= 68	10,0 (8,4 –11,5) N= 68	385 (356 - 414) N= 152	31,4 (29,4 - 33,4) N= 153	9,8 (9,1 –10,6) N= 153
AA	438 (371 -504) N= 28	67,7 (29,4 – 105,9) N= 28	9,4 (8,5 - 10,3) N= 28	506 (405 -607) N=29	42,6 (34,1 –51,1) N= 29	9,3 (8,4 –10,3) N= 29	402 (348 - 455) N= 54	33,6 (30,2 –36,9) N= 54	9,7 (8,8 –10,7) N= 54
ANOVA (P valor)	0,731	0,273	0,891	0,143	0,201	0,410	0,627	0,527	0,987
<i>GCP2</i> c.1561C>T									
CC	460 (427 - 492) N=109	52,6 (40,4 – 64,7) N=109	9,2 (8,8 – 9,6) N= 109	442 (405 - 478) N= 127	38,2 (34,9 - 41,4) N= 127	9,9 (8,9 - 10,8) ^a N= 127	394 (371 - 416) N= 247	31,6 (30,0 – 33,1) N= 250	9,9 (9,3 – 10,4) N= 250
CT	411 (245 - 576) N= 8	43,6 (27,2 – 60,0) N= 8	9,3 (8,3 – 10,4) N= 8	444 (308 - 581) N= 10	32,3 (21,1- 43,4) N= 10	16,5 (2,0 – 30,9) ^b N= 10	395 (279 - 511) N= 14	36,5 (29,0 – 44,1) N= 14	8,9 (7,7 – 10,0) N=14
TT	N= 0	N= 0	N= 0	368 (-776 - 1512) N= 2	60 (-266,5 – 386,5) N= 2	8,4 (-20,1 – 36,8) ^{a,b} N= 2	N=0	N= 0	N=0
ANOVA (P valor)	0,445	0,694	0,895	0,880	0,151	0,025	0,970	0,155	0,416

Contiuação tabela 16 MTHFD1 c.1958G>A									
GG	429 (380 - 477) N= 50	53,5 (32,3 – 74,7) N= 50	8,7 (8,2 - 9,2) ^a N= 50	422 (365 - 479) N= 46	38,8 (33,6 – 44,1) N= 46	10,3 (8,1 – 12,5) N= 46	409 (370 - 447) N= 87	31,4 (28,6 - 34,1) N= 88	9,7 (9,0 - 10,4) N= 88
GA	498 (444 - 551) N= 50	53,5 (36,9 -70,2) N= 50	9,6 (9,0 - 10,3) ^b N= 50	447 (396 - 497) N= 77	37,8 (33,5 – 42,2) N=77	10,7 (8,8 – 12,5) N= 77	384 (355 - 413) N=132	31,1 (29,1 - 33,2) N= 133	9,7 (8,8 - 10,5) N= 133
AA	416 (355 - 476) N= 17	42,9 (36,7 – 49,0) N= 17	9,8 (8,9 – 10,7) ^{a,b} N= 17	464 (392 - 536) N= 16	37,0 (26,8 – 47,1) N= 16	8,6 (7,6 – 9,7) N= 16	392 (328 - 456) N= 42	34,8 (30,2 – 39,4) N= 43	10,5 (8,9 – 12,0) N= 43
ANOVA (P valor)	0,082	0,810	0,027	0,723	0,930	0,612	0,615	0,240	0,565

Os dados são médias e desvio padrão (IC 95%). O p valor das diferenças entre as concentrações são fornecidas em letras sobrescritas (teste ANOVA)

Cbl: cobalamina, tHcy: homocisteína total.

AER primário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes e nenhum feto viável.

AER secundário: mulheres que tiveram três ou mais abortos espontâneos recorrentes com pelo menos um feto viável.

Controle: mulheres que tiveram no mínimo duas gestações sem histórico de aborto espontâneo.

Três mulheres do grupo controle apresentaram concentrações de cobalamina acima de 2.000 pmol/L, sendo excluídas da análise.

4.4 Análise de regressão logística multivariada

Na Tabela 15, estão apresentados dois modelos de regressão logística multivariada.

No modelo 1, a variável dependente é ter aborto primário, enquanto que no modelo 2 a variável dependente é ter aborto secundário.

No modelo 1, o aumento das concentrações de folato, de cobalamina e T4 foram associados ao maior risco de se ter aborto primário, enquanto ter genótipo GG para o polimorfismo *MTHFD1* c.1958 G>A foi associado à proteção contra AER primário (Tabela 17).

No modelo 2 multivariado, ter maior IMC, fumar, ter aumento nas concentrações de folato, cobalamina e tHcy foram associados ao maior risco de aborto secundário, enquanto ter genótipo GG para o polimorfismo *RFC1* c.80G>A foi associado à proteção contra o AER secundário (Tabela 17).

Tabela 17. Regressão logística multivariada para a variável dependente ter aborto

Modelo	Grupos incluídos	Variáveis independentes	OR (95% IC)	P valor
1	1 e 3	Folato sérico	1,05 (1,03 – 1,07)	< 0,001
		Cobalamina (pmol/L)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,016
		tHcy	1,03 (0,97 – 1,11)	0,326
		Genótipo CC versus CT + TT para <i>MTHFR</i> c.677C>T	0,87 (0,51 – 1,50)	0,612
		Genótipo AA versus AC + CC para <i>MTHFR</i> c.1298A>C	0,79 (0,46 – 1,38)	0,407
		Genótipo GG versus GA + AA para <i>MTHFD1</i> c.1958G>A	0,49 (0,29 – 0,84)	0,009
		Genótipo GG versus GA + AA para <i>RFC1</i> c.80G>A	0,82 (0,45 – 1,50)	0,528
		Genótipo CC versus CT + TT para <i>GCP2</i> c.1561C>T	1,38 (0,48 – 3,92)	0,556
		Idade (intervalo)	0,96 (0,92 – 1,00)	0,065
		Fumo	1,96 (0,94 – 4,10)	0,075
		Uso de anticoncepcional	0,76 (0,42 – 1,40)	0,386
		Frequência de bebidas alcoólicas	0,93 (0,83 – 1,04)	0,199
		IMC (intervalo)	1,34 (0,97 – 1,85)	0,074
		T4 (nmol/L)	1,02 (1,00 – 1,03)	0,006

Continuação tabela 17

2	2 e 3	Folato sérico	1,04 (1,02 – 1,05)	< 0,001
		Cobalamina (pmol/L)	1,00 (1,00 – 1,00)	0,019
		tHcy	1,05 (1,00 – 1,09)	0,039
		Genótipo CC versus CT + TT para <i>MTHFR</i> c.677C>T	0,88 (0,55 – 1,40)	0,592
		Genótipo AA versus AC + CC para <i>MTHFR</i> c.1298A>C	1,13 (0,71 – 1,81)	0,611
		Genótipo GG versus GA + AA para <i>MTHFD1</i> c.1958G>A	0,91 (0,57 – 1,47)	0,705
		Genótipo GG versus GA + AA para <i>RFC1</i> c.80G>A	0,56 (0,34 – 0,94)	0,027
		Genótipo CC versus CT + TT para <i>GCP2</i> c.1561C>T	1,83 (0,76 – 4,42)	0,177
		Idade (intervalo)	1,02 (0,98 – 1,06)	0,306
		Fumo	2,54 (1,41 – 4,60)	0,002
		Uso de anticoncepcional	0,97 (0,57 – 1,65)	0,917
		Frequência de bebidas alcoólicas	0,94 (0,85 – 1,04)	0,228
		IMC (intervalo)	1,42 (1,07 – 1,88)	0,015
		T4 (nmol/L)	1,00 (0,99 – 1,02)	0,411

Modelo 1: mulheres de aborto primário e mulheres do grupo controle.

Modelo 2: mulheres de aborto secundário e mulheres do grupo controle.

OR: Odds ratio (IC 95%).

5. DISCUSSÃO

O AER é uma condição multifatorial, porém aproximadamente 40% dos casos não têm a etiologia elucidada (Amorim-Filho, *et al*, 2010). Sabe-se, no entanto, que diversas vitaminas em concentrações ideais são necessárias para a viabilidade do feto, principalmente a Cbl e o AF.

A recomendação clínica de suplementação de ácido fólico perinatal é que o nível de folato sérico seja em torno de 45,3 nmol/L (Dary, 2009) e a dose diária sugerida é de 400µg/dia (Solomons, 2007); todavia, as mulheres do AER primário e secundário do presente estudo estavam sendo suplementadas com 5 mg de AF por dia, a fim de se evitar casos de DFTN.

Polimorfismos em genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo e à absorção de folato (*MTHFR*, *RFC1*, *GCP2* e *MTHFD1*) podem levar a baixas concentrações de AF e a altas concentrações de tHcy (Tamura e Picciano, 2006). Deste modo, o presente estudo avaliou a influência dos polimorfismos nesses genes no AER (*MTHFR* c.677C>T, *MTHFR* c.1298A>C, *RFC1* c.80G>A, *GCP2* c.1561C>T e *MTHFD1* c.1958G>A).

Embora haja estudos que associaram os polimorfismos *MTHFR* c. 677C>T, c.1298A>C (Rodríguez-Guillén, Torres-Sánchez *et al.*, 2009) e *MTHFD1* c.1958G>A (Parle-Mcdermott, Pangilinan *et al.*, 2005) ao maior risco de se ter AER, há resultados controversos, nos quais estas associações não foram encontradas (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008; Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009; Crişan, Trifa *et al.*, 2011).

Portadores do genótipo TT para o polimorfismo *MTHFR* c.677C>T apresentam atividade enzimática diminuída (Frosst, Blom *et al.*, 1995; Jamison,

Shihet *et al.*, 2009). Essa diminuição está associada com aumento nas concentrações plasmáticas de tHcy (Wilcken, 2012), uma vez que menor atividade da enzima resulta em diminuição da conversão tHcy em metionina.

A frequência do alelo 677T encontrada em nosso estudo foi de 29,5% e 27,3% (AER primário e secundário, respectivamente), frequência semelhante às encontradas na Coreia, 35,4% (Kim, Park *et al.*, 2011), nos Estados Unidos, 34,8% (Huang, Tucker *et al.*, 2011), e na Colômbia, 36,0% (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008) ($P > 0,05$).

O presente estudo mostrou que portadores do genótipo 677TT apresentaram aumento na concentração de tHcy, condizente com os dados da literatura (Ray e Laskin, 1999; De Bree, Verschuren *et al.*, 2003); todavia, esse aumento não foi encontrado em outros estudos (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008; Huang, Tucker *et al.*, 2011; Park, Han *et al.*, 2011).

Ao analisar o grupo controle, foi encontrada menor concentração de folato nos portadores do genótipo 677TT, quando comparado com os genótipos 677CT e 677CC. Esse efeito é condizente com a literatura, pois, nessas mulheres, a concentração de folato sérico estava diminuída, culminando com o aumento da tHcy (Ray e Laskin, 1999; Amouzou, Chabi *et al.*, 2004; Pereira, Schettert *et al.*, 2004). As mulheres do grupo estudo não tiveram diminuição das concentrações de folato, pois estavam sendo suplementadas com AF, porém apresentaram valores elevados de tHcy.

Rodríguez-Guillén e colaboradores (2009) encontraram associação entre o genótipo 677TT e o risco de aborto espontâneo na população mexicana (Rodríguez-Guillén, Torres-Sánchez *et al.*, 2009). Porém, nas populações indiana (Govindaiah, Naushad *et al.*, 2009) e colombiana (Cardona, Cardona-Maya *et al.*, 2008), este

polimorfismo não foi associado ao risco de aborto espontâneo. Nossos resultados confirmam estes dois últimos estudos, pois não encontramos associação entre *MTHFR* c.677C>T e o risco de se ter AER.

Outro polimorfismo avaliado no gene *MTHFR* é o c.1298A>C. Indivíduos 1298CC têm atividade enzimática reduzida, sem alteração nas concentrações plasmáticas de tHcy (Zetterberg, Regland *et al.*, 2002; Yaliwal e Desai, 2012).

No presente estudo, a frequência do alelo 1298C foi de 23,5% e 25,2% (AER primário e secundário, respectivamente); tais frequências foram iguais às dos Estados Unidos, 25,8% (Huang, Tucker *et al.*, 2011), da França, 23,4% (Candito, Rivet *et al.*, 2008), e da Coreia, 31,2% (Kim, Park *et al.*, 2011) ($P>0,05$).

Em nosso estudo não foi encontrada diferença significativa nas concentrações de folato, Cbl e tHcy, segundo os genótipos para o polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C. Nosso achado é diferente daquele obtido por Huang e colaboradores (2011), que encontraram maiores concentrações de tHcy em portadores do genótipo CC (Huang, Tucker *et al.*, 2011). Porém, a maioria dos estudos não encontrou diferença significativa entre as concentrações de folato e tHcy, segundo os genótipos para o polimorfismo *MTHFR* c.1298A>C (Weisberg, Tran *et al.*, 1998; Bailey, Duhaney *et al.*, 2002).

Os genótipos 1298AA e 1298AC foram associados ao risco de se ter aborto em mulheres da população grega (Zetterberg, Regland *et al.*, 2002). Outro estudo relacionou a combinação dos genótipos 1298CC/AC com o risco de aborto com aneuploidias cromossômicas (Kim, Park *et al.*, 2011). Diferentemente, o presente estudo não encontrou associação deste polimorfismo com o maior risco de AER.

Alguns estudos mostraram que indivíduos com o haplótipo *MTHFR*677TT/1298CC têm atividade enzimática reduzida, aumento nas

concentrações plasmáticas de tHcy e redução nas concentrações plasmáticas de folato (Kim, Park *et al.*, 2011; Yaliwal e Desai, 2012). O haplótipo 677CC/1298AC foi relacionado com risco de se ter aborto espontâneo na população grega (Zetterberg, Regland *et al.*, 2002). Nosso estudo não encontrou associação entre AER e a combinação haplotípica desses polimorfismos.

Como dado inédito na literatura, este foi o primeiro estudo que avaliou o polimorfismo *RFC1* 80G>A em mulheres com histórico de AER. O *RFC1* participa no processo de influxo do AF, transportando a 5-metilTHF para o interior da célula (Zhao, Matherly *et al.*, 2009; Galbiatti, Ruiz *et al.*, 2011). O genótipo homozigoto 80AA foi associado com baixas concentrações de folato (Ananth, Peltier *et al.*, 2008), que, juntamente com altas concentrações de homocisteína em gestantes, levam ao risco de filhos com DFTN (Ananth, Peltier *et al.*, 2008; Pei, Liu *et al.*, 2009a; Stanisławska-Sachadyn, Mitchell *et al.*, 2009) e de outras anomalias fetais (Zhao, Matherly *et al.*, 2009).

A frequência do alelo 80A encontrada em nosso estudo foi de 49,1% e 45,3% (AER primário e secundário, respectivamente). Estas frequências são semelhantes às aquelas descritas na França, 47,9% (Chango, Fillon-Emery *et al.*, 2005), nos Estados Unidos, 47,7% (Ananth, Peltier *et al.*, 2008), e na China, 36,6% (Pei, Liu *et al.*, 2009b) ($P>0,05$).

O polimorfismo *RFC1* c.80G>A não foi associado às alterações nas concentrações de folato, Cbl e tHcy em nosso estudo. Nossos dados corroboram os estudos de Devlin e colaboradores (2006); Dhillon e colaboradores (2009); e Gara e colaboradores (2010) (Devlin, Clarke *et al.*, 2006; Dhillon, Thomas *et al.*, 2009; Gara, Ochi *et al.*, 2011), que não encontraram esta associação. No entanto, os nossos

dados são diferentes de outros estudos, que encontraram relação do alelo 80A (Zampieri, Biselli *et al.*, 2012) e menor concentração de tHcy (Sukla e Raman, 2012).

Não foram encontradas associações deste polimorfismo com o descolamento prematuro da placenta em um outro estudo (Ananth, Peltier *et al.*, 2008). No presente trabalho, o polimorfismo *RFC1* c.80G>A não foi associado ao maior risco de AER, quando o polimorfismo foi analisado isoladamente. Porém, quando feita a análise de regressão logística multivariada, incluindo as variáveis folato sérico, Cbl, tHcy, genótipo CC *versus* CT+TT para *MTHFR* c.677C>T, genótipo AA *versus* AC+CC para *MTHFR* c.1298A>C, genótipo GG *versus* GA+AA para *MTHFD1* c.1958G>A, genótipo GG *versus* GA+AA para *RFC1* c.80G>A, genótipo CC *versus* CT+TT para *GCP2* c.1561C>T, Idade (intervalo), fumo, uso de anticoncepcional, frequência de bebidas alcoólicas, IMC (intervalo), presença de FAN reagente (título 1:160), T4, e o *RFC1*, o genótipo 80GG foi associado à proteção contra o aborto secundário.

Este estudo foi o primeiro a avaliar o polimorfismo *GCP2* c.1561C>T em mulheres com AER. O gene *GCP2* codifica a enzima folil-poliglutamato carboxipeptidase, que tem a função de hidrolisar a 5-metilTHF, com quebra da cauda de poliglutamato em monoglutamato, permitindo a absorção do folato dietético (Devlin, Ling *et al.*, 2000; Zhao, Matherly *et al.*, 2009). O polimorfismo *GCP2* c.1561C>T foi associado à redução na atividade da enzima (Devlin, Ling *et al.*, 2000), à baixa concentração de folato e à alta concentração de homocisteína (Lopreato, Stabler *et al.*, 2008).

A frequência do alelo 1561T encontrada em nosso estudo foi de 3,4 e 5,0 (AER primário e secundário, respectivamente), igual a encontrada na Noruega, 4,5%

(Halsted, Wong *et al.*, 2007), nos Estados Unidos, 4,8% (Ye, Lai *et al.*, 2011), e na Holanda, 5,7% (Afman, Trijbels *et al.*, 2003) ($P>0,05$).

Em nosso estudo, portadores do genótipo 1561CT no AER secundário apresentaram maiores concentrações de tHcy. Nosso achado foi diferente do estudo de Melse-Boonstra e colaboradores (2004) e de Devlin e colaboradores (2006), que não encontraram diferença entre os genótipos e as concentrações de tHcy (Melse-Boonstra, Lievers *et al.*, 2004; Devlin, Clarke *et al.*, 2006). Além disso, Födingere e colaboradores (2003) e Lopreato e colaboradores (2008) associaram o genótipo CC com maior concentração de tHcy (Födingere, Dierkes *et al.*, 2003; Lopreato, Stabler *et al.*, 2008). É possível que nossos resultados não tenham demonstrado nenhuma associação entre este polimorfismo e o risco de AER devido à baixa frequência do alelo T nas mulheres estudadas.

A enzima MTHFD1 é NADP-dependente e trifuncional, atua como 5,10-metilenoTHF desidrogenase, 5,10-metenilTHF ciclohidrolase e 10-formilTHF sintase. O polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A reduz a produção do 5-metilTHF, o que prejudica a remetilação da tHcy em metionina e também pode influenciar na fonte de grupamentos metil (Ivanov, Nash-Barboza *et al.*, 2009). Este polimorfismo foi associado à DFTN, às perdas fetais (Krajinovic, 2008) e ao descolamento prematuro da placenta (Parle-Mcdermott, Mills *et al.*, 2005).

A frequência do alelo 1958A encontrada em nosso estudo foi de 35,9% e 39,2% (AER primário e secundário, respectivamente), semelhantes às descritas na Romênia, 44,2% (Neagos, Cretu *et al.*, 2010), e na Polônia, 42,3% (Mostowska, Myka *et al.*, 2011) ($P>0,05$).

No presente estudo, as mulheres do AER primário portadoras do genótipo *MTHFD1* 1958AA apresentaram maior concentração de tHcy, quando comparadas

às mulheres portadoras dos genótipos 1958GG e 1958GA. Este resultado foi diferente do encontrado por Furness e colaboradores (2008), que não demonstraram diferença significativa entre as concentrações de tHcy e os genótipos avaliados (Furness, Fenech *et al.*, 2008; Guerra-Shinohara, Pereira *et al.*, 2010).

O genótipo 1958AA foi associado com risco de se ter aborto na população irlandesa (Parle-Mcdermott, Pangilinan *et al.*, 2005); no entanto, outro estudo, realizado na população romena, não mostrou associação desse genótipo com o AER (Crişan, Trifa *et al.*, 2011). Este genótipo também foi relacionado à restrição de crescimento intrauterino (Furness, Fenech *et al.*, 2008) e a DFTN (Parle-Mcdermott, Kirke *et al.*, 2006).

No presente estudo não foi encontrada relação entre o polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A e o AER; contudo, quando foi realizada a análise de regressão logística multivariada, incluindo as variáveis folato sérico, Cbl, tHcy, genótipo CC *versus* CT+TT para *MTHFR* c.677C>T, genótipo AA *versus* AC+CC para *MTHFR* c.1298A>C, genótipo GG *versus* GA+AA para *MTHFD1* c.1958G>A, genótipo GG *versus* GA+AA para *RFC1* c.80G>A, genótipo CC *versus* CT+TT para *GCP2* c.1561C>T, Idade (intervalo), fumo, uso de anticoncepcional, frequência de bebidas alcoólicas, IMC (intervalo), T4, e o *MTHFD1*, o genótipo 1958GG foi associado como proteção ao AER.

Este trabalho não demonstrou associação dos polimorfismos estudados com a ocorrência de AER. No entanto, ao serem realizadas análises em modelos multivariados de regressão logística (variáveis sociodemográficas, bioquímicas e genéticas), foi encontrada associação entre as concentrações de folato, Cbl, tHcy e T4 com o maior risco de se ter aborto primário, enquanto o risco para o aborto secundário foi associado às variáveis idade, IMC, tabagismo, concentrações de

folato, Cbl e tHcy. Este estudo mostra que os fatores analisados podem interferir no aborto primário ou secundário quando associados.

6. Conclusão

- Os polimorfismos, quando considerados isoladamente, não foram associados ao maior risco de AER primário ou secundário.
- O polimorfismo *MTHFR* c.677C>T foi associado às maiores concentrações de tHcy nos três grupos estudados.
- As variáveis concentrações de folato, de cobalamina, de tHcy e de T4 foram associadas ao maior risco de se ter aborto primário. Além disso, o genótipo GG, para o polimorfismo *MTHFD1* c.1958G>A, foi associado à proteção contra o AER primário.
- Idade, IMC, tabagismo, concentrações de folato, cobalamina e tHcy foram associadas ao maior risco de aborto secundário. O genótipo GG, para o polimorfismo *RFC1* c.80G>A, foi associado à proteção contra o AER secundário.

7. REFERÊNCIAS

AFMAN, L. A.; TRIJBELS, F. J.; BLOM, H. J. The H475Y polymorphism in the glutamate carboxypeptidase II gene increases plasma folate without affecting the risk for neural tube defects in humans. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 75-7, Jan 2003.

AFMAN, L. A.; VAN DER PUT, N. M. J.; THOMAS, C. M. G.; TRIJBELS, F. J. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. **QJM**, v. 94, n. 3, p. 159-66, Mar 2001.

AMORIM-FILHO, A. G.; CARVALHO, M. H. B; ZUGAIB, M. **Tratado de Reprodução Assistida**. 1º. São Paulo: Segmento-Farma, 2010.

AMOUZOU, E. K.; CHABI, N. W.; ADJALLA, C. E.; RODRIGUES-GUÉANT, R. M.; FEILLET, F; VILLAUME, C; SANNI, A; J; GUÉANT, J. L. et al. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 4, p. 619-24, Apr 2004.

ANANTH, C. V.; PELTIER, M. R.; MOORE, D. F.; KINZLER, W. L.; LECLERC, D.; ROZEN, R. R. Reduced folate carrier 80A-->G polymorphism, plasma folate, and risk of placental abruption. **Hum Genet**, v. 124, n. 2, p. 137-45, Sep 2008.

ANDRÈS, E.; DALI-YOUCHEF, N.; VOGEL, T.; SERRAJ, K.; ZIMMER, J. Oral cobalamin (vitamin B(12)) treatment. An update. **Int J Lab Hematol**, v. 31, n. 1, p. 1-8, Feb 2009.

ANDRÈS, E.; LOUKILI, N. H.; NOEL, E.; KALTENBACH, G.; ABDELGHENI, M.B.; PERRIN, A. E.; NOBLET-DICK, M; MALOISEL, F.; SCHLIENGER, J-L., BLICKLÉ, J-F. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. **CMAJ**, v. 171, n. 3, p. 251-9, Aug 2004.

ANONYMOUS. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. **Lancet**, v. 338, n. 8760, p. 131-7, Jul 1991.

BAILEY, L. B.; DUHANEY, R. L.; MANEVAL, D. R.; KAUWELL, G. P.A.; QUINLIVAN, E. P.; DAVIS, S. R.; CUADRAS, A.; HUTSON A. D.; GREGORY, J. F. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. **J Nutr**, v. 132, n. 7, p. 1872-8, Jul 2002.

BARBOSA, P. R.; STABLER, S. P.; TRENTIN, R.; CARVALHO, F. R.; LUCHESSI, A. D.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; ALLEN, R. H.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Evaluation of nutritional and genetic determinants of total homocysteine, methylmalonic acid and S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine values in Brazilian childbearing-age women. **Clin Chim Acta**, v. 388, n. 1-2, p. 139-47, Feb 2008.

BATES, S. M. Consultative hematology: the pregnant patient pregnancy loss. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 166-72, 2010.

BENAMMAR, A.; SERMONDADE, N.; FAURE, C.; DUPONT, C.; CEDRIN-DURNERIN, I.; SIFER, C.; HERCBERG, S.; LEVY, R. [Nutrition and miscarriages: A literature review]. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 40, n. 3, p. 162-9, Mar 2012.

BERRY, R. J.; LI, Z.; ERICKSON, J. D.; LI, S.; MOORE, C. A.; WANG, H.; MULINARE, J.; ZHAO, P.; WONG, L.Y.; GINDLER, J.; HONG, S. X.; CORREA, A. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. **N Engl J Med**, v. 341, n. 20, p. 1485-90, Nov 1999.

BERTI, C.; BIESALSKI, H. K.; GÄRTNER, R.; LAPILLONNE, A.; PIETRZIK, K.; POSTON, L.; REDMAN, C.; KOLETZKO, B.; CETIN, I. Micronutrients in pregnancy: current knowledge and unresolved questions. **Clin Nutr**, v. 30, n. 6, p. 689-701, Dec 2011.

BISELLI, J. M.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; ZAMPIERI, B. L.; HADDAD, R.; EBERLIN M. N.; PAVARINO-BERTELLI, E.C. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2008.

BLACK, M. M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. **Food Nutr Bull**, v. 29, n. 2 Suppl, p. S126-31, Jun 2008.

BLOUNT, B. C.; MACK, M. M.; WEHR, C. M.; MACGREGOR, J. T.; HIATT, R. A.; WANG, G.; WICKRAMASINGHE, S. N.; EVERSON, R. B.; AMES, B. N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3290-5, Apr 1997.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil**. RDC No 344, de 13 de dezembro de 2002. <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public>.

BRATTSTRÖM, L.; WILCKEN, D. E. Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2, p. 315-23, Aug 2000.

BROUNS, R.; URSEM, N.; LINDEMANS, J.; HOP, W.; PLUIJM, S.; STEEGERS, E.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects. **Prenat Diagn**, v. 28, n. 6, p. 485-93, Jun 2008.

CALLEJÓN, G.; MAYOR-OLEA, A.; JIMÉNEZ, A. J.; GAITÁN, M. J.; PALOMARES, A. R.; MARTÍNEZ, F.; RUIZ, M.; REYES-ENGEL, A. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. **Hum Reprod**, v. 22, n. 12, p. 3249-54, Dec 2007.

CANDITO, M.; RIVET, R.; HERBETH, B.; BOISSON, C.; RUDIGOZ, R. C.; LUTON, D.; JOURNEL, H.; OURY, J. F.; ROUX, F.; SAURA, R.; VERNHET, I.;

GAUCHERAND, P.; MULLER, F.; GUIDICELLI, B.; HECKENROTH, H.; POULAIN, P.; BLAYAU, M.; FRANCANNET, C.; ROSZYK, L.; BRUSTIÉ, C.; STACCINI, P.; GÉRARD, P.; FILLION-EMERY, N.; GUÉANT-RODRIGUEZ, R. M.; VAN OBERGHEN, E.; GUÉANT, J. L. Nutritional and genetic determinants of vitamin B and homocysteine metabolisms in neural tube defects: a multicenter case-control study. **Am J Med Genet A**, v. 146A, n. 9, p. 1128-33, May 2008.

CARDONA, H.; CARDONA-MAYA, W.; GÓMEZ, J. G.; CASTAÑEDA, S.; GÓMEZ, J. M.; BEDOYA, G.; ALVAREZ, L.; TORRES, J. D.; TOBÓN, L. I.; CADAVID, A. [Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and homocysteine levels in women with recurrent pregnancy loss: a nutrigenetic perspective]. **Nutr Hosp**, v. 23, n. 3, p. 277-82, 2008 May-Jun 2008.

CARMEL, R.; GREEN, R.; ROSENBLATT, D. S.; WATKINS, D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 62-81, 2003.

CARO, J. Folate, Cobalamin, and Megaloblastic Anemias: Overview. In: LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E., *et al* (Ed.). **Williams Hematology**. Seventh. New York: McGraw-Hill, Inc., 2007. cap. 39,

CARP, H. J. Intravenous immunoglobulin: effect on infertility and recurrent pregnancy loss. **Isr Med Assoc J**, v. 9, n. 12, p. 877-80, Dec 2007.

CARP, H. J. Recurrent miscarriage: genetic factors and assessment of the embryo. **Isr Med Assoc J**, v. 10, n. 3, p. 229-31, Mar 2008.

CARROLL, N.; PANGILINAN, F.; MOLLOY, A. M.; TROENDLE, J.; MILLS, J. L.; KIRKE, P. N.; BRODY, L. C.; SCOTT, J. M.; PARLE-MCDERMOTT, A. Analysis of the MTHFD1 promoter and risk of neural tube defects. **Hum Genet**, v. 125, n. 3, p. 247-56, Apr 2009.

CASAS, J. P.; BAUTISTA, L. E.; SMEETH, L.; SHARMA, P.; HINGORANI, A. D. Homocysteine and stroke: evidence on a causal link from mendelian randomisation. **Lancet**, v. 365, n. 9455, p. 224-32, 2005 Jan 15-21 2005.

CETIN, I.; BERTI, C.; CALABRESE, S. Role of micronutrients in the periconceptional period. **Hum Reprod Update**, v. 16, n. 1, p. 80-95, 2010 Jan-Feb 2010.

CHANARIN, I. Megaloblastic anaemia, cobalamin, and folate. **J Clin Pathol**, v. 40, n. 9, p. 978-84, Sep 1987.

CHANGO, A.; FILLON-EMERY, N.; MIRCHER, C.; BLÉHAUT, H.; LAMBERT D.; HERBETH, B.; JAMES, S. J.; RÉTHORÉ, M. O.; NICOLAS, J. P. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. **Br J Nutr**, v. 94, n. 2, p. 166-9, Aug 2005.

CHEN, J.; GIOVANNUCCI, E. L.; HUNTER, D. J. MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among U.S. men and

women: an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. **J Nutr**, v. 129, n. 2S Suppl, p. 560S-564S, Feb 1999.

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

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

CLARKE, R.; REFSUM, H.; BIRKS, J.; EVANS, J. G.; JOHNSTON, C.; SHERLIKER, P.; UELAND, P. M.; SCHNEEDE, J.; MCPARTLIN, J.; NEXO, E.; SCOTT, J. M. Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 5, p. 1241-7, May 2003.

CRİŞAN, T. O.; FARCAŞ, M.; MILITARU, M.; NETEA, M.; POP, I.; POPP, R. The MTHFD1 c.1958 G>A polymorphism and recurrent spontaneous abortions. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 24, n. 1, p. 189-92, Jan 2011.

CZEIZEL, A. E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **N Engl J Med**, v. 327, n. 26, p. 1832-5, Dec 1992.

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

DE BREE, A.; VERSCHUREN, W. M.; BJØRKE-MONSEN, A. L.; VAN DER PUT, N. M.; HEIL, S. G.; TRIJBELS, F. J.; BLOM, H. J. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 3, p. 687-93, Mar 2003.

DE WALS, P.; TAIROU, F.; VAN ALLEN, M. I.; UH, S. H.; LOWRY, R. B.; SIBBALD, B.; EVANS, J. A.; VAN DEN HOF, M. C.; ZIMMER, P.; CROWLEY, M.; FERNANDEZ, B.; LEE, N. S.; NIYONSENGA, T. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. **N Engl J Med**, v. 357, n. 2, p. 135-42, Jul 2007.

DEVLIN, A. M.; BRAIN, U.; AUSTIN, J.; OBERLANDER, T. F. Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12201, 2010.

DEVLIN, A. M.; CLARKE, R.; BIRKS, J.; EVANS, J. G.; HALSTED, C. H. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 3, p. 708-13, Mar 2006.

DEVLIN, A. M.; LING, E. H.; PEERSON, J. M.; FERNANDO, S.; CLARKE, R.; SMITH, A. D.; HALSTED, C. H. Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 19, p. 2837-44, Nov 2000.

DHILLON, V.; THOMAS, P.; FENECH, M. Effect of common polymorphisms in folate uptake and metabolism genes on frequency of micronucleated lymphocytes in a South Australian cohort. **Mutat Res**, v. 665, n. 1-2, p. 1-6, Jun 2009.

DURAND, P.; LUSSIER-CACAN, S.; BLACHE, D. Acute methionine load-induced hyperhomocysteinemia enhances platelet aggregation, thromboxane biosynthesis, and macrophage-derived tissue factor activity in rats. **FASEB J**, v. 11, n. 13, p. 1157-68, Nov 1997.

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

FABRIS, C.; TONIUTTO, P.; FALLETI, E.; FONTANINI, E.; CUSSIGH, A.; BITETTO, D.; FORNASIERE, E.; FUMOLO, E.; AVELLINI, C.; MINISINI, R.; PIRISI, M. MTHFR C677T polymorphism and risk of HCC in patients with liver cirrhosis: role of male gender and alcohol consumption. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, n. 1, p. 102-7, Jan 2009.

FAIRBANKS, V. F.; KLEE, G. G. Aspectos bioquímicos da hematologia. In: A., G. K. S. (Ed.). **Tietz: fundamentos de química clínica**. 4. Rio de Janeiro: Burtis, C. A. Ashwood, E. R., 1998. cap. 36, p.699-703.

FORGES, T.; MONNIER-BARBARINO, P.; ALBERTO, J. M.; GUÉANT-RODRIGUEZ, R. M.; DAVAL, J. L.; GUÉANT, J. L. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. **Hum Reprod Update**, v. 13, n. 3, p. 225-38, 2007 May-Jun 2007.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G.; BOERS, G.J.H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L. A. J.; VAN DEN HEUVE, L.P.; ROZEN R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, v. 10, n. 1, p. 111-3, May 1995.

FURNESS, D. L.; FENECH, M. F.; KHONG, Y. T.; ROMERO, R.; DEKKER, G. A. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, n. 3, p. 276.e1-8, Sep 2008.

FÖDINGER, M.; DIERKES, J.; SKOUPY, S.; RÖHRER, C.; HAGEN, W.; PUTTINGER, H.; HAUSER, A. C.; VYCHYTIL, A.; SUNDER-PLASSMANN, G. Effect of glutamate carboxypeptidase II and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 5, p. 1314-9, May 2003.

GALBIATTI, A. L.; RUIZ, M. T.; REZENDE PINTO, D.; RAPOSO, L. S.; MANÍGLIA, J. V.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; GOLONI-BERTOLLO, E. M. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) gene and head and neck squamous cell carcinoma etiology in Brazilian population. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 2, p. 1071-8, Feb 2011.

GARA, S.; OCHI, H.; CHANGO, A.; NAJJAR, L.; FEKI, M.; B'CHIR, F.; KAABACHI, N.; BEN BECHER, S.; BOUKTHIR, S.; ABDENNEBI, M. C677t polymorphism of MTHFR and G80A polymorphism of RFC genes and their relation with homocysteine levels in obese Tunisian children. **Tunis Med**, v. 89, n. 6, p. 565-8, Jun 2011.

GHODKE, Y.; CHOPRA, A.; SHINTRE, P.; PURANIK, A.; JOSHI, K.; PATWARDHAN, B. Profiling single nucleotide polymorphisms (SNPs) across intracellular folate metabolic pathway in healthy Indians. **Indian J Med Res**, v. 133, p. 274-9, Mar 2011.

GOVINDAIAH, V.; NAUSHAD, S. M.; PRABHAKARA, K.; KRISHNA, P. C.; RADHA RAMA DEVI, A. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. **Clin Biochem**, v. 42, n. 4-5, p. 380-6, Mar 2009.

GREEN, R. Folate, cobalamin, and megaloblastic anemias. In: (Ed.), 2010.

GROUP, E. C. W. Genetic aspects of female reproduction. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 4, p. 293-307, 2008 Jul-Aug 2008.

GUERRA-SHINOHARA, E. M.; PAIVA, A. A.; RONDO, P. H.; YAMASAKI, K.; TERZI, C. A.; D'ALMEIDA, V. 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.

GUERRA-SHINOHARA, E. M.; PEREIRA, P. M.; KUBOTA, A. M.; SILVA, T. A.; REIS, J. L.; MIYASHITA, G. S.; D'ALMEIDA, V.; ALLEN, R. H.; STABLER, S. P. Increased MMA concentration and body mass index are associated with spontaneous abortion in Brazilian women: a pilot study. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 5-6, p. 423-7, Mar 2010.

HALSTED, C. H.; WONG, D. H.; PEERSON, J. M.; WARDEN, C. H.; REFSUM, H.; SMITH, A. D.; NYGÅRD, O. K.; UELAND, P. M.; VOLLSET, S. E.; TELL, G. S. Relations of glutamate carboxypeptidase II (GCPII) polymorphisms to folate and homocysteine concentrations and to scores of cognition, anxiety, and depression in a homogeneous Norwegian population: the Hordaland Homocysteine Study. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 2, p. 514-21, Aug 2007.

HARGER, J. H.; ARCHER, D. F.; MARCHESE, S. G.; MURACCA-CLEMENS, M.; GARVER, K. L. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstet Gynecol**, v. 62, n. 5, p. 574-81, Nov 1983.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 2. São Paulo: Manole Ltda, 1999.

HERRMANN, W.; SCHORR, H.; OBEID, R.; GEISEL, J. Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. **Am J Clin Nutr**, v. 78, n. 1, p. 131-6, Jul 2003.

HESEKER, H. Folic acid and other potential measures in the prevention of neural tube defects. **Ann Nutr Metab**, v. 59, n. 1, p. 41-5, 2011.

HUANG, T.; TUCKER, K. L.; LEE, Y. C.; CROTT, J. W.; PARNELL, L. D.; SHEN, J.; SMITH, C. E.; ORDOVAS, J. M.; LI, D.; LAI, C. Q. Methylenetetrahydrofolate reductase variants associated with hypertension and cardiovascular disease interact with dietary polyunsaturated fatty acids to modulate plasma homocysteine in puertorican adults. **J Nutr**, v. 141, n. 4, p. 654-9, Apr 2011.

IVANOV, A.; NASH-BARBOZA, S.; HINKIS, S.; CAUDILL, M. A. Genetic variants in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase and methylenetetrahydrofolate dehydrogenase influence biomarkers of choline metabolism when folate intake is restricted. **J Am Diet Assoc**, v. 109, n. 2, p. 313-8, Feb 2009.

JAMISON, R. L.; SHIH, M. C.; HUMPHRIES, D. E.; GUARINO, P. D.; KAUFMAN, J. S.; GOLDFARB, D. S.; WARREN, S. R.; GAZIANO, J. M.; LAVORI, P. Effect of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms on survival in patients with advanced CKD and ESRD: a prospective study. **Am J Kidney Dis**, v. 53, n. 5, p. 779-89, May 2009.

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

JAUNIAUX, E.; FARQUHARSON, R. G.; CHRISTIANSEN, O. B.; EXALTO, N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, v. 21, n. 9, p. 2216-22, Sep 2006.

KALHAN, S. C.; MARCZEWSKI, S. E. Methionine, homocysteine, one carbon metabolism and fetal growth. **Rev Endocr Metab Disord**, Mar 2012.

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

KELLEHER, B. P.; WALSHE, K. G.; SCOTT, J. M.; O'BROIN, S. D. Microbiological assay for vitamin B12 with use of a colistin-sulfate-resistant organism. **Clin Chem**, v. 33, n. 1, p. 52-4, Jan 1987.

KELLY, D.; O'DOWD, T.; REULBACH, U. Use of folic acid supplements and risk of cleft lip and palate in infants: a population-based cohort study. **Br J Gen Pract**, v. 62, n. 600, p. 466-72, Jul 2012.

KIM, S. Y.; PARK, S. Y.; CHOI, J. W.; KIM, D. O. J.; LEE, S. Y.; LIM, J. H.; HAN, J. Y.; RYU, H. M.; KIM, M. H. Association between MTHFR 1298A>C polymorphism and spontaneous abortion with fetal chromosomal aneuploidy. **Am J Reprod Immunol**, v. 66, n. 4, p. 252-8, Oct 2011.

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

KLEE, G. G. Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. **Clin Chem**, v. 46, n. 8 Pt 2, p. 1277-83, Aug 2000.

KOZ, S. T.; GOUWY, N. T.; DEMIR, N.; NEDZVETSKY, V. S.; ETEM, E.; BAYDAS, G. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 28, n. 4, p. 325-9, Jun 2010.

KRAJINOVIC, M. MTHFD1 gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 7, p. 829-32, Jul 2008.

KRUSZYNA, Ł.; LIANERI, M.; RYDZANICZ, M.; GAJECKA, M.; SZYFTER, K.; JAGODZIŃSKI, P.P. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. **Mol Biol Rep**, v. 37, n. 1, p. 241-7, Jan 2010.

KWAK-KIM, J.; YANG, K. M.; GILMAN-SACHS, A. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 35, n. 4, p. 609-22, Aug 2009.

LAANPERE, M.; ALTMÄE, S.; STAVREUS-EVERS, A.; NILSSON, T. K.; YNGVE, A.; SALUMETS, A. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability. **Nutr Rev**, v. 68, n. 2, p. 99-113, Feb 2010.

LEJEUNE, V. [Early recurrent spontaneous abortion: How to take care in 2006?]. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 34, n. 10, p. 927-37, Oct 2006.

LOPREATO, F. R.; STABLER, S.P.; CARVALHO, F. R.; HIRATA, R. D.; HIRATA, M. H.; ROBI, D. L.; SAMPAIO-NETO, L. F.; ALLEN, R. H.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Relationships between gene polymorphisms of folate-related proteins and vitamins and metabolites in pregnant women and neonates. **Clin Chim Acta**, v. 398, n. 1-2, p. 134-9, Dec 2008.

LY, A.; LEE, H.; CHEN, J.; SIE, K. K.; RENLUND, R.; MEDLINE, A.; SOHN, K. J.; CROXFORD, R.; THOMPSON, L. U.; KIM, Y. I. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. **Cancer Res**, v. 71, n. 3, p. 988-97, Feb 2011.

MELSE-BOONSTRA, A.; LIEVERS, K. J.; BLOM, H. J.; VERHOEF, P. Bioavailability of polyglutamyl folic acid relative to that of monoglutamyl folic acid in subjects with different genotypes of the glutamate carboxypeptidase II gene. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 3, p. 700-4, Sep 2004.

MILLER, A. L. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. **Altern Med Rev**, v. 13, n. 3, p. 216-26, Sep 2008.

MISLANOVA, C.; MARTSENYUK, O.; HUPPERTZ, B.; OBOLENSKAYA, M. Placental markers of folate-related metabolism in preeclampsia. **Reproduction**, v. 142, n. 3, p. 467-76, Sep 2011.

MOESTRUP, S. K. New insights into carrier binding and epithelial uptake of the erythropoietic nutrients cobalamin and folate. **Curr Opin Hematol**, v. 13, n. 3, p. 119-23, May 2006.

MOLLOY, A. M.; BRODY, L. C.; MILLS, J. L.; SCOTT, J. M.; KIRKE PN. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 85, n. 4, p. 285-94, Apr 2009.

MOLLOY, A. M.; MILLS, J. L.; COX, C.; DALY, S. F.; CONLEY, M.; BRODY, L. C.; KIRKE, P. N.; SCOTT, J. M.; UELAND, P. M. Choline and homocysteine interrelations in umbilical cord and maternal plasma at delivery. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 4, p. 836-42, Oct 2005.

MORRIS, M. S.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; SELHUB, J. Elevated serum methylmalonic acid concentrations are common among elderly Americans. **J Nutr**, v. 132, n. 9, p. 2799-803, Sep 2002.

MOSTOWSKA, A.; MYKA, M.; LIANERI, M.; ROSZAK, A.; JAGODZIŃSKI, P. P. Folate and choline metabolism gene variants and development of uterine cervical carcinoma. **Clin Biochem**, v. 44, n. 8-9, p. 596-600, Jun 2011.

NAUSHAD, S. M.; DEVI, A. R. Role of parental folate pathway single nucleotide polymorphisms in altering the susceptibility to neural tube defects in South India. **J Perinat Med**, v. 38, n. 1, p. 63-9, 2010.

NEAGOS, D.; CRETU, R.; TUTULAN-CUNITA, A.; STOIAN, V.; BOHILTEA, L. C. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) enzyme polymorphism as a maternal risk factor for trisomy 21: a clinical study. **J Med Life**, v. 3, n. 4, p. 454-7, 2010 Oct-Dec 2010.

NISHIYAMA, M.; KATO, Y.; HASHIMOTO, M.; YUKAWA, S.; OMORI, K. Apolipoprotein E, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutation and the risk of senile dementia--an epidemiological study using the polymerase chain reaction (PCR) method. **J Epidemiol**, v. 10, n. 3, p. 163-72, May 2000.

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

OBEID, R.; KUHLMANN, M.; KIRSCH, C. M.; HERRMANN, W. Cellular uptake of vitamin B12 in patients with chronic renal failure. **Nephron Clin Pract**, v. 99, n. 2, p. c42-8, 2005.

PARK, C. W.; HAN, A. R.; KWAK-KIM, J.; PARK, S. Y.; HAN, J. Y.; KOONG, M. K.; SONG, I. O.; YANG, K. M. The role of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on the peripheral blood natural killer cell proportion in women with unexplained recurrent miscarriages. **Clin Exp Reprod Med**, v. 38, n. 3, p. 168-73, Sep 2011.

PARLE-MCDERMOTT, A.; KIRKE, P. N.; MILLS, J. L.; MOLLOY, A. M.; COX, C.; O'LEARY, V. B.; PANGILINAN, F.; CONLEY, M.; CLEARY, L.; BRODY, L. C.; SCOTT, J. M. Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. **Eur J Hum Genet**, v. 14, n. 6, p. 768-72, Jun 2006.

PARLE-MCDERMOTT, A.; MILLS, J. L.; KIRKE, P. N.; COX, C.; SIGNORE, C. C.; KIRKE, S.; MOLLOY, A. M.; O'LEARY, V. B.; PANGILINAN, F. J.; O'HERLIHY, C.; BRODY, L. C.; SCOTT, J. M. MTHFD1 R653Q polymorphism is a maternal genetic risk factor for severe abruptio placentae. **Am J Med Genet A**, v. 132, n. 4, p. 365-8, Feb 2005.

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

PARLE-MCDERMOTT, A.; PANGILINAN, F.; MILLS, J. L.; SIGNORE, C. C.; MOLLOY, A. M.; COTTER, A.; CONLEY, M.; COX, C.; KIRKE, P. N.; SCOTT, J. M.; BRODY, L. C. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. **Mol Hum Reprod**, v. 11, n. 7, p. 477-80, Jul 2005.

PEI, L.; LIU, J.; ZHANG, Y.; ZHU, H.; REN, A. Association of reduced folate carrier gene polymorphism and maternal folic acid use with neural tube defects. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 150B, n. 6, p. 874-8, Sep 2009a.

PEREIRA, A. C.; SCHETTERT, I. T.; MORANDINI FILHO, A. A.; GUERRA-SHINOHARA, E. M.; KRIEGER, J. E. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c677t gene variant modulates the homocysteine folate correlation in a mild folate-deficient population. **Clin Chim Acta**, v. 340, n. 1-2, p. 99-105, Feb 2004.

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. **Clin Chem**, v. 45, n. 2, p. 290-2, Feb 1999.

PIETRZIK, K.; BAILEY, L.; SHANE, B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clin Pharmacokinet**, v. 49, n. 8, p. 535-48, Aug 2010.

RAI, R.; REGAN, L. Recurrent miscarriage. **Lancet**, v. 368, n. 9535, p. 601-11, Aug 2006.

RAY, J. G.; LASKIN, C. A. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: A systematic review. **Placenta**, v. 20, n. 7, p. 519-29, Sep 1999.

REICHMAN, D. E.; LAUFER, M. R. Congenital uterine anomalies affecting reproduction. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 24, n. 2, p. 193-208, Apr 2010.

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

ROY, A.; EVERS, S. E.; CAMPBELL, M. K. Dietary supplement use and iron, zinc and folate intake in pregnant women in London, Ontario. **Chronic Dis Inj Can**, v. 32, n. 2, p. 76-83, Mar 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANS-SABRAFEN. **Hematologia Clinica**. 2^a. Doyma: 1988.

SARAVELOS, S. H.; COCKSEGE, K. A.; LI, T. C. Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. **Hum Reprod Update**, v. 14, n. 5, p. 415-29, 2008 Sep-Oct 2008.

SESHADRI, S.; BEISER, A.; SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; ROSENBERG, I. H.; D'AGOSTINO, R. B.; WILSON, P. W.; WOLF, P. A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. **N Engl J Med**, v. 346, n. 7, p. 476-83, Feb 2002.

SHETTY, S.; GHOSH, K. Anti-phospholipid antibodies and other immunological causes of recurrent foetal loss--a review of literature of various therapeutic protocols. **Am J Reprod Immunol**, v. 62, n. 1, p. 9-24, Jul 2009.

SHI, M.; CAPRAU, D.; ROMITTI, P.; CHRISTENSEN, K.; MURRAY, J. C. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes MTHFR, MTHFD, MTRR, RFC1, and GCP2. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 67, n. 8, p. 545-9, Aug 2003.

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

STANISŁAWSKA-SACHADYN, A.; MITCHELL, L. E.; WOODSIDE, J. V.; BUCKLEY, P. T.; KEALEY, C.; YOUNG, I. S.; SCOTT, J. M.; MURRAY, L.; BOREHAM, C. A.; MCNULTY, H.; STRAIN, J. J.; WHITEHEAD, A. S. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G>A polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. **Ann Hum Genet**, v. 73, n. Pt 5, p. 484-91, Sep 2009.

STEPHENSON, M.; KUTTEH, W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. **Clin Obstet Gynecol**, v. 50, n. 1, p. 132-45, Mar 2007.

SUKLA, K. K.; RAMAN, R. Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. **Eur J Clin Nutr**, v. 66, n. 1, p. 111-8, Jan 2012.

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

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

THANGARATINAM, S.; TAN, A.; KNOX, E.; KILBY, M. D.; FRANKLYN, J.; COOMARASAMY, A. Association between thyroid autoantibodies and miscarriage and preterm birth: meta-analysis of evidence. **BMJ**, v. 342, p. d2616, 2011.

TOTH, B.; JESCHKE, U.; ROGENHOFER, N.; SCHOLZ, C.; WÜRFEL, W.; THALER, C. J.; MAKRIGIANNAKIS, A. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. **J Reprod Immunol**, v. 85, n. 1, p. 25-32, May 2010.

TRKOVÁ, M.; KAPRAS, J.; BOBKOVÁ, K.; STANKOVÁ, J.; MEJSNAROVÁ, B. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. **Reprod Toxicol**, v. 14, n. 4, p. 331-5, 2000 Jul-Aug 2000.

UELAND, P. M.; REFSUM, H.; BERESFORD, S. A.; VOLLSET, S. E. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2, p. 324-32, Aug 2000.

VAN DER PUT, N. M.; ESKES, T. K.; BLOM, H. J. Is the common 677C-->T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. **QJM**, v. 90, n. 2, p. 111-5, Feb 1997.

VAN DER PUT, N. M.; GABREËLS, F.; STEVENS, E. M.; SMEITINK, J. A.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; BLOM, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet**, v. 62, n. 5, p. 1044-51, May 1998.

VAN DER PUT, N.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; MARIMAN, E. C.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H. J. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, v. 346, n. 8982, p. 1070-1, Oct 1995.

VARES, M.; SAETRE, P.; DENG, H.; CAI, G.; LIU, X.; HANSEN, T.; RASMUSSEN, H. B.; WERGE, T.; MELLE, I.; DJUROVIC, S.; ANDREASSEN, O. A.; AGARTZ, I.; HALL, H.; TERENIUS, L.; JÖNSSON, E. G. Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and age of onset in schizophrenia. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**, v. 153B, n. 2, p. 610-8, Mar 2010.

VENÂNCIO, L. S.; BURINI, R. C.; YOSHIDA, W. B. Hiper-homocisteinemia na doença arterial periférica. **J Vas Bras**, v. 3, n. 1, p. 31-37, 2004.

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

WANG, L.; KE, Q.; CHEN, W.; WANG, J.; TAN, Y.; ZHOU, Y.; HUA, Z.; DING, W.; NIU, J.; SHEN, J.; ZHANG, Z.; WANG, X.; XU, Y.; SHEN, H. Polymorphisms of

MTHFD, plasma homocysteine levels, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 8, p. 2526-32, Apr 2007.

WATANABE, F. Vitamin B12 sources and bioavailability. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 10, p. 1266-74, Nov 2007.

WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; SIBANI, S.; ROZEN, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab**, v. 64, n. 3, p. 169-72, Jul 1998.

WILCKEN, B. Leukoencephalopathies associated with disorders of cobalamin and folate metabolism. **Semin Neurol**, v. 32, n. 1, p. 68-74, Feb 2012.

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

XIE, H.; GUO, J.; WANG, J.; WANG, F.; ZHAO, H.; LIU, C.; WANG, L.; LU, X.; WU, L.; BAO, Y.; ZOU, J.; ZHANG, T.; NIU, B. Glutamate carboxypeptidase II gene polymorphisms and neural tube defects in a high-risk Chinese population. **Metab Brain Dis**, v. 27, n. 1, p. 59-65, Mar 2012.

YAJNIK, C. S.; DESHMUKH, U. S. Fetal programming: Maternal nutrition and role of one-carbon metabolism. **Rev Endocr Metab Disord**, Mar 2012.

YALIWAL, L. V.; DESAI, R. M. Methylenetetrahydrofolate reductase mutations, a genetic cause for familial recurrent neural tube defects. **Indian J Hum Genet**, v. 18, n. 1, p. 122-124, 1 2012.

YATES, Z.; LUCOCK, M. G80A reduced folate carrier SNP modulates cellular uptake of folate and affords protection against thrombosis via a non homocysteine related mechanism. **Life Sci**, v. 77, n. 22, p. 2735-42, Oct 2005.

YE, X.; LAI, C. Q.; CROTT, J. W.; TROEN, A. M.; ORDOVAS, J. M.; TUCKER, K. L. The folate hydrolase 1561C>T polymorphism is associated with depressive symptoms in Puerto Rican adults. **Psychosom Med**, v. 73, n. 5, p. 385-92, Jun 2011.

YOO, J. H.; CHOI, G. D.; KANG, S. S. Pathogenicity of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase for vascular dementia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 8, p. 1921-5, Aug 2000.

ZAGO, M. A.; MALVEZZI, M. Deficiência de vitamina B12 e de folatos: anemias megaloblásticas. In: ATHENEU (Ed.). **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Falcão, R. P. Pasquini, R., 2001. cap. 21, p.195-210.

ZAMPIERI, B. L.; BISELLI, J. M.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; VANNUCCHI, H.; CARVALHO, V. M.; CORDEIRO, J. A.; PAVARINO, E. C. Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. **Dis Markers**, v. 32, n. 2, p. 73-81, 2012.

ZETTERBERG, H.; REGLAND, B.; PALMÉR, M.; RICKSTEN, A.; PALMQVIST, L.; RYMO, L.; ARVANITIS, D. A.; SPANDIDOS, D. A.; BLENNOW, K. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. **Eur J Hum Genet**, v. 10, n. 2, p. 113-8, Feb 2002.

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

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

8. ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPOfício CEP nº 08/2008

São Paulo, 12 de fevereiro de 2008.

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

Prezado(a) Senhor(a),

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

Atenciosamente,

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

ANEXO 2 **APROVAÇÃO**

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

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

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

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

CAPPesq, 11 de Fevereiro de 2008

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

ANEXO 3

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

1

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

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

I - IDENTIFICAÇÃO

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

II - Sumário Geral do Protocolo

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

> Os objetivos do presente estudo são:

- Determinar o risco de ter abortos espontâneos recorrentes segundo os genótipos para os polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *TC2* C776G e A76G, *RFC1* A80G e *GCP2* (C1561T) e também nas combinações de genótipos para os polimorfismos estudados;
- Avaliar se existe diferença entre as médias das concentrações de tHcy, ácido metilmalônico, cobalamina e folato em mulheres com história de abortos recorrentes e no grupo controle;
- Avaliar se existe a associação entre polimorfismos *MTHFR* (C677T e A1298C), *MTR* (A2756G), *MTRR* (A66G), *TC2* (C776G e A76G), *RCF1* (A80G) e *GCP2* (C1561T) com alterações nas concentrações das vitaminas (B6, cobalamina (B12) e folato e dos metabólitos tHcy e MMA;
- avaliar quais são os fatores genéticos e bioquímicos para o aborto recorrente na população estudada;
- determinar a taxa de metilação do DNA nas amostras de dois grupos de mulheres.

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

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

2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

➤ **Serão critérios de exclusão:**

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

III - Considerações

Não é projeto multicêntrico.

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

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

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

3

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

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

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

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

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

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

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

III. Parecer do CEP: Projeto APROVADO

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

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

Salientamos os seguintes aspectos a serem considerados pelo pesquisador:

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

Atenciosamente,

Prof. Dra. Iara Coelho Zito Guerriero

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

ANEXO 4

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

Para estudar seu DNA, serão realizados alguns testes que avaliarão alteração (metilação do DNA) e as diferenças nas sequências do DNA (polimorfismo) de cada indivíduo em diversos genes (MTHFR, MTR, MTRR, TC2, RFC1, GCP2, MTHFD1, CBS, THBM, TFPI, SERPINC1, PROC, TAFI, PAI1, FV, FII e FI), cujos produtos (proteínas ou enzimas) estão relacionados com o aumento das quantidades de homocisteína no

sangue e maior chance de formar coágulos (trombose). A sua amostra de DNA será armazenada no Laboratório de Hematologia da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantida em banco de materiais biológicos sem a identificação de seu nome, pois será utilizado código para a identificação. A amostra poderá ser utilizada para pesquisa futura sobre a causa de abortos recorrentes, se isso ocorrer, o novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e então, você será consultada a respeito.

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

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

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

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

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

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

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? ☐ SIM ☐ NÃO

Você quer saber os resultados dos testes genéticos? ☐ SIM ☐ NÃO

São Paulo, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepfcf@usp.br ou o **Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde**, Rua General Jardim, 36 2º andar, fone 3218-4043, e-mail: smscep@prefeitura.sp.gov.br

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

ANEXO 5

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, que tenham tido pelo menos duas gestações normais e que tenham até 45 anos (chamado de grupo controle). Para avaliar as possíveis causas de abortos, serão realizados testes genéticos (DNA) e testes de laboratório para verificar a presença de alterações no DNA e no seu sangue.

Se você aceitar participar do estudo, precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue que serão coletadas no Ambulatório de Obstetrícia, 5º andar (Bloco 3) do prédio dos Ambulatórios do HC ou em nosso laboratório na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Cidade Universitária). Será feita uma única coleta de 30 mL de sangue, por profissional experiente e utilizando material estéril e descartável, para a realização de exames que poderão, possivelmente, esclarecer as causas de abortos recorrentes. Com esses exames serão avaliadas: a função dos rins, do fígado, a quantidade de algumas vitaminas (ácido fólico, cobalamina e vitamina B6) e outras substâncias que são encontradas no sangue (homocisteína, TNF alfa, IFN gama, IL1, IL2, IL4, IL6, IL10 e proteína C-reativa), que estão relacionadas à inflamação no seu organismo, podendo ser consideradas fatores que podem complicar a gestação. O risco desse projeto é mínimo. A coleta de sangue poderá formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha.

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

de Ética em Pesquisa (CEP) e então, você será consultada a respeito. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação, portanto a sua participação neste estudo é voluntária. Os resultados dos seus exames serão enviados para sua residência ou outro endereço de seu interesse.

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

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

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

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

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

Você autoriza o armazenamento do DNA para pesquisas futuras? (____)SIM (____)NÃO

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

São Paulo, _____ de _____ de 200____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 – Cidade Universitária – CEP: 05508-900 – São Paulo – SP - Telefones: 3091-3677 - E-mail: cepcf@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 6

QUESTIONÁRIO

Data entrevista: __/__/

Nº. Registro no HC-USP: _____

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

1. Data de nascimento: ____/____/____
2. Idade (anos): _____
3. **Raça declarada pela mulher:** (0) branca (1) negra(2) parda(3) amarela/oriental(4) índia

4. Estado civil: (0) solteira (1) casada (2) viúva (3) união estável (4) separada
5. Ocupação: (0) dona-de-casa (1) desempregada (2) outra _____
7. Escolaridade (anos estudados) : _____

Dados sócio-econômicos da família

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

Dados obstétricos

13. História reprodutiva (coloque a sequência):

Primeiro evento (1) aborto (0) parto

13. Número de gestações: _____
14. Número de partos anteriores: _____
15. Idade gestacional dos partos em semanas

1º _____; 2º _____; 3º _____ 4º _____; 5º _____; 6º _____

16. Número de abortos: _____
17. Idade gestacional dos abortos:
 1º _____; 2º _____; 3º _____; 4º _____; 5º _____; 6º _____

18. Natimortos: (0) não (1) sim
19. Gestação de gêmeos: (0) não (1) sim
20. Número de filhos nascidos-vivos: _____
21. Peso estimado de nascimento dos filhos anteriores
 1º Filho _____
 2º Filho _____
 3º Filho _____
 4º Filho _____

22. Data do último parto ou aborto (meses): _____
23. peso atual (Kg): _____
24. altura: _____

25. Você teve hemorragia? (0) não (1) sim.
26. Época: (1) menstruação (2) aborto (3) aborto e menstruação (4) no parto (5) antes de engravidar

História de anemia

26. Apresentou anemia anteriormente:

(0) não (1) sim, durante outras gestações (2) sim, sem estar gestante (3) não sabe (4) decorrente ao aborto

27. Você fuma? (0) não (1) sim _____

28. Nº de cigarros por dia _____

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

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

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

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

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

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

(6) outrascopos por dia, _____ vezes por semana _____

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

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

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

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

34. Uso de ferro (sulfato ferroso) e/ou outras vitaminas?

(Marca, quantidade(dose) e tempo de uso, desde quando).

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

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

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

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