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

Polimorfismos genéticos relacionados à hemostasia e a sua
relação com abortos espontâneos recorrentes

Juliano Felix Bertinato

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2013

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

Polimorfismos genéticos relacionados à hemostasia e a sua
relação com abortos espontâneos recorrentes

Juliano Felix Bertinato

Versão corrigida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra-Shinohara

São Paulo

2013

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

Bertinato, Juliano Felix
B544p Polimorfismos genéticos relacionados à hemostasia e a sua
relação com abortos espontâneos recorrentes / Juliano Felix
Bertinato. -- São Paulo, 2013.
118p.

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

Orientador: Guerra-Shinohara, Elvira Maria

1. Hemostasia : Distúrbio : Medicina 2. Aborto 3. Polimorfismo
I. T. II. Guerra-Shinohara, Elvira Maria, orientador.

616.157 CDD

Juliano Felix Bertinato

Polimorfismos genéticos relacionados à hemostasia e a sua
relação com abortos espontâneos recorrentes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e as minhas irmãs que nunca
deixaram de acreditar no meu sonho.

AGRADECIMENTO

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

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

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

À querida Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara, pela oportunidade de execução desse projeto, orientação, aprendizado e acima de tudo pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

A toda a equipe do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em especial Dr. Mario Henrique Burlachini de Carvalho e Dr. Antonio Gomes de Amorim Filho, pela colaboração na seleção das pacientes de estudo e pelos ensinamentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pela bolsa de mestrado concedida.

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

As professoras Vânia Maris Morelli, Rosario Dominguez Crespo Hirata e Maria Stella Figueiredo pelas sugestões na minha banca de qualificação

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

Aos meus colegas e principalmente amigos do Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos amigos João Paulo Assis Gobo, José Roberto Santin, Isabel Daufenback Machado, Robson José Lázaro e Clóvis Paniz pela amizade sincera.

A toda a minha família e amigos que sempre me deram apoio.

“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são as nossas dúvidas e hesitações de hoje.”

- Franklin Roosevelt -

RESUMO

BERTINATO, J.F. **Polimorfismos genéticos relacionados à hemostasia e a sua relação com abortos espontâneos recorrentes.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Aborto espontâneo recorrente (AER) é definido pela presença de três ou mais abortos espontâneos e consecutivos que ocorreram até a 20ª semana de gestação. O AER possui origem multifatorial. Dentre os diversos fatores associados ao AER, alterações na hemostasia podem comprometer o fluxo sanguíneo na placenta e com isso pode aumentar o risco de complicações obstétricas, como o aborto. O objetivo geral deste estudo foi investigar se existe associação entre polimorfismos genéticos (no gene do fibrinogênio (*FGB* -455G>A e -148C>T), da trombomodulina (*THBD* 1418C>T), do fator V (*F5* 1691G>A), da protrombina (*F2* 20210 G>A), do PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G) e do TAFI (*CPB2* c.505G>A)) e os abortos espontâneos recorrentes (primários e secundários). Os objetivos específicos desse estudo foram: 1- avaliar se existe associação entre os sete polimorfismos e o período em que ocorreram as perdas fetais (precoce ou tardia) e o número de abortos recorrentes; 2- determinar se os haplótipos dos polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T estão ou não associados aos abortos primários e secundários. Foram incluídas 256 mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes, provenientes do Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e 264 mulheres saudáveis, sem história de aborto espontâneo e que tiveram pelo menos duas gestações normais (grupo controle), pareadas segundo as idades. Amostras de sangue foram obtidas para realização das genotipagens dos polimorfismos por meio de PCR em tempo real (*FGB* -148C>T, *FGB* -455G>A, *THBD* 1418C>T e *CBP2* c.505G>A), e PCR-RFLP (*SERPINE1*4G/5G, *F5* 1691G>A e *F2* 20210 G>A). As frequências dos genótipos e de alelos para os sete polimorfismos foram semelhantes entre os grupos aborto primário, aborto secundário e grupo controle. Entretanto, quando foi realizada um modelo de regressão logística multivariada saturada, que incluiu as variáveis independentes: *F5* 1691G>A (referência GG vs GA), *F2* 20210G>A (referência GG vs GA), *CBP2* c.505G>A

(referência GG + GA vs AA), *THBD* 1418C>T (referência CC + CT vs TT), *SERPINE1* 4G/5G (referência 5G/5G vs 4G/4G + 4G/5G) *FGB* -455G>A (referência GG vs GA vs AA) e *FGB* -148C>T (referência CC vs CT vs TT), apenas o polimorfismo *FGB* -148C>T foi associado ao maior risco de ter aborto primário (OR: 2,91, IC 95% 1,02 – 8,29, p=0,045). Quando os haplótipos para os polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* 148C>T foram considerados, foi observada maior frequência de haplótipo 455G/148T em mulheres com AER primário (3,4%) do que no grupo controle (1,1%), (p=0,030); porém esse efeito não foi observado no AER secundário. Em relação ao número de abortos consecutivos, houve uma tendência (p=0,060) a maior frequência de genótipo TT para o polimorfismo *FGB* -148C>T no grupo de aborto primário com até três perdas quando comparado com as mulheres do mesmo grupo, porém com número maior de perdas (>3). Em conclusão, os sete polimorfismos quando analisados separadamente, não foram associados ao AER; no entanto, em modelo multivariado de regressão logística, o genótipo TT do polimorfismo *FGB* 148C>T foi associado com o aumento do risco de ter AER primário. Além disso, foi encontrado maior frequência do haplótipo 455G/148T para os polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T em mulheres com aborto primário.

Palavras-chaves: Aborto espontâneo recorrente, alteração na hemostasia, polimorfismos genéticos, fibrinogênio, haplótipos.

ABSTRACT

BERTINATO, J. F. **Genetic polymorphism associated with hemostasis and its relationship with recurrent pregnancy losses.** Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, 2013.

Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined by the presence of three or more consecutive losses prior to 20 weeks of gestation. The RPL has multifactorial origin. Among several factors associated with RPL, changes in hemostasis may impair the blood flow in the placenta and thus may increase the risk of obstetric complications, such as pregnancy loss. The general aim of this study was to investigate the association between genetic polymorphisms (in the genes of fibrinogen (*FGB* -455G>A and -148C>T), thrombomodulin (*THBD* 1418C>T), factor V (*F5* 1691G>A), prothrombin (*F2* 20210 G>A), PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G) and TAFI (*CPB2* c.505G>A)) and recurrent pregnant losses (primary and secondary). The specific aims of this study were: 1 - to evaluate the association between the seven polymorphisms and the period in which the fetal losses occurred (early or late) and the number of recurrent losses; 2 - to determine if the haplotypes of polymorphisms *FGB* -455G>A and *FGB* -148C>T present association with primary and secondary pregnant losses. We included 256 women with a RPL history, from the Ambulatory of Obstetrics from Clinical Hospital of the Medical School of USP and 264 healthy women without losses history that have had at least two normal pregnancies (control group), matched according to age. Blood samples were obtained to perform the genotyping of polymorphisms by real-time PCR (*FGB* -148C>T, *FGB* -455G>A, *THBD* 1418C>T and *CBP2* c.505G>A), and PCR-RFLP (*SERPINE1* 4G/5G, *F5* 1691G>A and *F2* 20210G>A). The frequencies of genotypes and alleles for the seven genetic polymorphisms were similar in 3 groups. However, when it was performed a model of multivariate logistic regression, which included the independent variables: *F5* 1691G>A (GG vs GA reference), *F2* 20210G>A (GG vs GA reference), *CBP2* c.505G>A (GG + GA reference vs AA), *THBD* 1418C>T (reference CC + CT vs TT), *SERPINE1* 4G/5G (reference 5G/5G + 4G/5G vs 4G/4G), *FGB* -455G>A (GG reference vs GA vs AA) and *FGB* -148C>T (reference CC vs CT vs TT), only the polymorphism *FGB* 148C>T polymorphism was associated with a higher risk of having primary losses (OR:

2.91, 95% CI 1.02 to 8.29, $p = 0.045$). When the haplotypes for the polymorphisms *FGB* -455G>A and *FGB* -148C>T were considered, had a higher frequency of the haplotype 455G/148T in women with primary RPL (3.4%) than in the control group (1.1%) ($p = 0.030$); but this effect was not observed in secondary RPL. Regarding the number of successive pregnant losses, there was a trend ($p = 0.060$) to higher frequency of the TT genotype for *FGB* -148C>T polymorphism in the group with primary RPL up to three losses when compared with women of the same group, but with loss number higher than three. In conclusion, when the seven genetic polymorphisms were evaluated separately, they do not show association with RPL, however, in multivariate logistic regression analysis, the TT genotype of the *FGB* -148C>T polymorphism was associated with increased risk for primary RPL. Furthermore, it was found higher frequency of the haplotype 455G/148T for the *FGB* -455G>A and *FGB* -148 C>T polymorphisms in women with primary RPL.

Key-words: Recurrent pregnant loss, hemostasis impairment, genetic polymorphisms, fibrinogen, haplotypes.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Papel da plaqueta na hemostasia, dando ênfase no processo de adesão e agregação plaquetária. Adaptado de Badimon, Storey <i>et al.</i> , 2011....	5
Figura 2: Modelo da cascata de coagulação	8
Figura 3: Efeito biológico da presença do fator V de Leiden (FVL).	17
Figura 4: Estrutura e domínios da molécula de trombomodulina.	23
Figura 5: Estrutura do gene do PAI-1 e o sítio do polimorfismo 4G/5G na região promotora. Adaptado de Kohler e Grant, 2000.....	25
Figura 6: Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo <i>F5</i> 1691G>A.	34
Figura 7: Eletroforese em gel agarose 2% dos produtos de PCR digeridos pela enzima de restrição <i>MnII</i> do polimorfismo <i>F5</i> 1691G>A, utilizando GelRed como corante fluorescente de ácidos nucleicos.....	34
Figura 8: Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo 20210G>A no gene <i>F2</i>	36
Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, dos produtos de restrição enzimática (Enzima <i>HindIII</i>) para o polimorfismo <i>F2</i> 20210G>A, utilizando impregnação com nitrato de prata.....	36
Figura 10: Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo 4G/5G no gene <i>SERPINE1</i>	39
Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 9%, dos produtos de restrição enzimática (Enzima <i>BseLI</i>) para o polimorfismo <i>SERPINE1</i> 4G/5G, utilizando impregnação com nitrato de prata.....	39
Figura 12: Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados (<i>FGB</i> -455 G>A e <i>FGB</i> -148 C>T) em mulheres com AER primário e grupo controle 1A e mulheres com AER secundário e grupo controle 1B.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definições de complicações na gravidez segundo a idade gestacional que ocorrem.....	3
Tabela 2: Alterações fisiológicas na concentração de fatores da coagulação durante a gravidez.....	13
Tabela 3. Características dos polimorfismos estudados.....	18
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> e condições da PCR	33
Tabela 5. Características gerais das mulheres dos grupos aborto primário, aborto secundário e grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011.....	43
Tabela 6. História reprodutiva das mulheres com AER, 2008 – 2011.....	44
Tabela 7. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>FGB -455G>A</i> , <i>FGB -148C>T</i> , <i>F5 1691G>A</i> e <i>F2 20210G>A</i> , após exclusão de causas conhecidas, para perdas recorrentes em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e no grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011.....	45
Tabela 8. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>THBD 1418C>T</i> , <i>SERPINE1 4G/5G</i> e <i>CBP2 c.505G>A</i> , após exclusão de causas conhecidas, para perdas recorrentes em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e no grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011.....	46
Tabela 9. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>FGB -455G>A</i> , <i>FGB -148C>T</i> , <i>F5 1691G>A</i> e <i>F2 20210G>A</i> em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e grupo controle, São Paulo, 2008 - 2011.....	48
Tabela 10. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>THBD 1418C>T</i> , <i>SERPINE1 4G/5G</i> e <i>CBP2 c.505G>A</i> em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011.....	49

Tabela 11. Regressão logística univariada para a variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2) de acordo com a distribuição dos genótipos <i>FGB -455G>A</i> , <i>FGB -148C>T</i> , <i>F5 1691G>A</i> , <i>F2 20210G>A</i> , <i>THBD 1418C>T</i> , <i>SERPINE1 4G/5G</i> e <i>CPB2 c.505G>A</i> como variáveis independentes.....	51
Tabela 12. Frequências de genótipos e de alelos para <i>FGB -455G>A</i> , <i>FGB -148C>T</i> , <i>F5 1691G>A</i> e <i>F2 20210G>A</i> , segundo o período em que ocorreu a perda nos grupos de AER primário e secundário, São Paulo, 2008 - 2012.....	53
Tabela 13. Frequências de genótipos e de alelos para <i>THBD 1418C>T</i> , <i>SERPINE1 4G/5G</i> e <i>CBP2 c.505 G>A</i> , segundo o período em que ocorreu a perda nos grupos de AER primário e secundário, São Paulo, 2008 – 2012.....	54
Tabela 14. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos <i>FGB -455G>A</i> , <i>FGB -148C>T</i> , <i>F5 1691G>A</i> e <i>F2 20210G>A</i> segundo o número de perdas gestacionais, São Paulo, 2008 – 2011.....	56
Tabela 15. Frequências de genótipos e de alelos para <i>THBD 1418C>T</i> , <i>SERPINE1 4G/5G</i> e <i>CBP2 c.505 G>A</i> , segundo o número de perdas gestacionais, São Paulo, 2008 – 2011.....	57
Tabela 16. Frequências dos haplótipos para os polimorfismos 455G>A e -148C>T no gene <i>FGB</i> em mulheres do grupo controle e do grupo com AER. São Paulo, 2008 – 2011.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AER	Aborto espontâneo recorrente
Arg	Arginina
CBP2	Gene do TAFI
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxirribonucleotídeo trifosfato
EDHF	Fator hiperpolarizante dependente do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
F2	Gene do fator II
F5	Gene do fator V
FGB	Cadeia beta do fibrinogênio
FT	Fator tecidual
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
Ila	Trombina
IMC	Índice de massa corporal
LMWH	Heparina de baixo peso molecular
NO	Oxido nítrico
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
pb	Pares de bases
PCa	Proteína C ativada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
PDF	Produtos de degradação de fibrina

PGE2	Prostaglandina
PGI2	Prostaciclina
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm	Rotações por minuto
SERPINE1	Gene do PAI-1
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SSP	Serviço de saúde público
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina
TBE	Tris-ácido bórico- EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEP	Tromboembolismo pulmonar
TEV	Tromboembolismo venoso
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
THBD	Gene da trombomodulina
TM	Trombomodulina
t-PA	Ativador do plasminogênio tecidual
TVP	Trombose venosa profunda
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VIIa	Fator VII ativado
Xa	Fator X ativado
XIIIa	Fator XIII ativado

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hemostasia	3
Formação de coágulo.....	6
Papel da trombina	8
Regulação do processo de coagulação	9
Sistema fibrinolítico	10
1.2 Hemostasia durante a gestação.....	11
Polimorfismo no gene do fator V (<i>F5</i> 1691G>A).....	15
Polimorfismo no gene da protrombina (<i>F2</i> 20210G>A)	18
Polimorfismo no gene da cadeia β do fibrinogênio (<i>FGB</i> -455G>A e <i>FGB</i> -148C>T)	20
Polimorfismo no gene da trombomodulina (<i>THBD</i> 1418C>T)	22
Polimorfismo no gene do PAI-1 (<i>SERPINE1</i> 4G/5G)	23
Polimorfismo no gene TAFI (<i>CPB2</i> c.505 G>A)	25
1.3 Justificativa.....	27
2. OBJETIVO GERAL	28
2.1 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Casuística.....	29
3.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	29
3.3 Aspectos Éticos.....	30
3.4 Avaliação Antropométrica.....	30
3.5 Amostras Biológicas.....	30
3.6 Metodologia Laboratorial	31
3.6.1 Extração do DNA genômico	31
3.6.2 Análise dos polimorfismos.....	31
3.6.2.1 Análise do polimorfismo <i>F5</i> 1691G>A (rs6025).....	32
3.6.2.2 Análise do polimorfismo <i>F2</i> 20210G>A (rs1799963).....	35
3.6.2.3 Análise do polimorfismo <i>FGB</i> -148C>T (rs1800787) e <i>FGB</i> -455 G>A (rs1800790).....	37
3.6.2.4 Análise do polimorfismo <i>THBM</i> 1418C>T (rs1042579)	37
3.6.2.5 Análise do polimorfismo <i>SERPINE1</i> 4G/5G (rs1799889)	38
3.6.2.6 Análise do polimorfismo <i>CPB2</i> c.505 G>A (rs3742264)	40
3.7 Análises Estatísticas.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1 Características gerais das mulheres participantes do estudo	42

4.2 Avaliação entre os genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos após a exclusão de causas conhecidas	44
4.3 Frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos nos grupos aborto primário, aborto secundário e grupo controle.....	47
4.4 Avaliação do risco de ter AER conforme os genótipos e alelos	50
4.5 Distribuição de genótipos e de alelos nos grupos formados segundo o período em que ocorreu a perda gestacional em mulheres com aborto primário e secundário.....	52
4.6 Distribuição dos genótipos e alelos nos grupos formados segundo o número de perdas	55
4.7 Análise de haplótipos para os polimorfismos -455G>A e -148C>T no gene <i>FGB</i>	58
4.8 Análise de regressão logística multivariada	61
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

O aborto é definido como a interrupção da gestação até a 20ª semana ou quando o feto pesa menos do que 500g e ocorre em cerca de 10 a 15% das gestações clinicamente reconhecidas (Caetano *et al.*, 2006; Blohm, Fridén e Milsom, 2008; Zugaib, 2012).

O aborto espontâneo recorrente (AER) é caracterizado pela perda espontânea e consecutiva de três ou mais gestações até a 20ª semana de gravidez (Regan, 1998; Bansal, 2010), e acomete cerca de 1 a 2% das mulheres que estão na idade reprodutiva e pode chegar até 5% se levado em consideração as mulheres com duas perdas fetais consecutivas (Harger *et al.*, 1983; Carrington, Sacks e Regan, 2005; Brenner, 2010). No entanto, a medida que as mulheres apresentam o evento do aborto, o risco de que a próxima gestação não seja bem sucedida aumenta de forma gradativa quando o aborto se repete (Barini e Al, 2000). Quando a mulher teve um aborto prévio, o risco de abortar na gravidez subsequente aumenta para cerca de 16 a 20% (Regan, Braude e Trembath, 1989; Knudsen *et al.*, 1991; Van Oppenraaij *et al.*, 2009). Mulheres que já tiveram dois abortos sucessivos apresentam um percentual maior de ter o terceiro (17 a 35%), e para aquelas que já passaram por três ou mais abortos, a probabilidade de ocorrência do quarto varia entre 25 a 46% (Ren e Wang, 2006).

O AER pode ser primário quando as mulheres têm no mínimo três perdas consecutivas e nenhum feto viável; ou pode ser secundário quando a mulher teve três perdas consecutivas, e pelo menos um feto viável (Toth *et al.*, 2010). Ele também pode ser classificado conforme a idade gestacional em que ocorreram os abortos, sendo classificado como precoce quando a perda ocorre até a décima segunda semana, ou como tardio, quando a perda ocorre entre a 13ª e 20ª semana (Guimarães Filho *et al.*, 2006).

Vários fatores foram associados ao AER, tais como: problemas anatômicos do útero (incompetência istmo-cervical, septos uterinos, miomas e sinéquias); imunológicos (presença de alo-anticorpos e/ou auto-anticorpos, anticorpos antifosfolípidos, anticardiolipina, etc); causas infecciosas; fatores genéticos; alterações endócrinas (função ovariana anormal na fase luteínica, com produção inadequada de progesterona pelo corpo amarelo; alterações da

função tireoidiana e presença de diabetes melitus); alterações cromossômicas; distúrbios na hemostasia; e alterações no metabolismo do folato, cobalamina e homocisteína (Rai e Regan, 2006; Berger *et al.*, 2010; Branch, Gibson e Silver, 2010; Toth *et al.*, 2010). Sabe-se também que a obesidade, o uso ou exposição ao tabaco, o consumo de bebidas alcoólicas, a ingestão aumentada de cafeína, a idade materna e a história obstétrica estão relacionados ao AER (Stephenson e Kutteh, 2007; Weng, Odouli e Li, 2008; Branch, Gibson e Silver, 2010; Stefanidou *et al.*, 2011).

Apesar de todos os fatores citados acima estarem relacionadas aos AER, cerca de 40 a 50% dos casos permanecem sem explicação e são classificados como AER idiopático (Lin, 1993; 2003; Rai e Regan, 2006; Flood *et al.*, 2010; Musters *et al.*, 2011).

Além dos fatores mencionados é importante ressaltar que o período gestacional é marcado por uma grande quantidade de mudanças fisiológicas e anatômicas na mulher. Dentre estas mudanças, destacam-se as modificações no perfil de coagulação sanguínea. A gestação é considerada como um estado de hipercoagulação, uma vez que as concentrações de vários fatores de coagulação (I, II, VII, VIII e XII) e de inibidores do sistema fibrinolítico (Inibidor do ativador do plasminogênio 1 e 2 (PAI-1 e PAI-2) e Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina - TAFI) estão aumentadas e há redução da concentração de proteína S livre (Van Horn *et al.*, 2004; Battinelli e Bauer, 2011). Deste modo, na gestação pode haver um desequilíbrio entre o processo de coagulação e fibrinólise, sendo que a presença de distúrbios trombofílicos hereditários e adquiridos podem exacerbar esse estado resultando em complicações gestacionais. Essas complicações podem ocorrer devido à deposição de fibrina na microcirculação placentária, o que pode acarretar na incapacidade da placenta em prover oxigenação e nutrição adequada ao feto (Brenner, 2004; Rodger *et al.*, 2010).

Na **Tabela 1** estão apresentadas várias complicações na gravidez, classificadas segundo a idade gestacional em que ocorrem.

Tabela 1: Definições de complicações na gravidez segundo a idade gestacional que ocorrem

Perda da gravidez	Semanas de gestação
Perda embrionária	Entre 5 e 10
Perda fetal	Depois de 10
Aborto	Até 20
Morte fetal intra-útero (Natimorto)	Depois de 20
Perda no primeiro trimestre	Entre 5 e 12
Perda no segundo trimestre	Entre 13 e 24
Perda no terceiro trimestre	Depois de 24

Adaptado de: Brenner, 2004.

1.1 Hemostasia

Fisiologicamente o sistema de coagulação sanguínea encontra-se em equilíbrio funcional, sendo este o responsável por manter o sangue em seu estado fluido. Quando ocorre uma lesão vascular o sistema responde a esse evento, a fim interromper o sangramento através da formação de um trombo (agregado de plaquetas e/ou com formação de fibrina no local). A hemostasia é garantida através do equilíbrio entre mecanismos coagulantes e anticoagulantes, juntamente com um processo de fibrinólise (Adams e Bird, 2009).

A integridade do endotélio vascular é fundamental para permitir a fluidez do sangue. Em condições normais a superfície do endotélio provê uma interface anticoagulante entre o vaso sanguíneo e os componentes do sangue, por meio da inibição da coagulação, da inibição da adesão e da ativação plaquetária, do bloqueio da formação de trombina e da redução da deposição de fibrina. A inibição da coagulação é realizada por intermédio da dilatação vascular, com a formação de óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), adenosina e fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF). Para inibir a adesão e consequente ativação das plaquetas, o endotélio produz adenosina, NO,

PGI₂, prostaglandina (PGE₂). Além disso, heparan sulfatos presentes no endotélio são responsáveis pela repulsão elétrica, por estarem carregados negativamente. O bloqueio da formação de trombina é realizado através de mecanismos que envolvem o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a ativação da proteína C através da trombomodulina e a ativação da antitrombina. Por fim a redução da deposição de fibrina é realizada por meio da síntese e liberação do ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e pelo ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) (Becker *et al.*, 2000; Adams e Bird, 2009; Manly, Boles e Mackman, 2011; Van Hinsbergh, 2012).

Geralmente quando o endotélio encontra-se íntegro, as plaquetas não interagem com o mesmo, porém após lesão tecidual, as plaquetas por meio de seus receptores, rolam pelo vaso danificado e sequencialmente aderem-se ao mesmo, às custas da ligação das glicoproteínas (Badimon, Storey e Vilahur, 2011). Essa interação com o endotélio é impulsionada por meio da interação entre o vWF circulante e o colágeno exposto (tipo I, III e VI). Essa ligação, permite que o vWF se ligue ao complexo Ib/IX/V da plaqueta. Entretanto é somente quando o receptor GPVI da plaqueta se liga diretamente ao colágeno que ocorre adesão mais estável entre plaqueta e matriz subendotelial. Isso permite a ativação de outros receptores de adesão (GPIIb/IIIa e GPIa/IIa), os quais irão proporcionar uma adesão firme e irreversível entre plaqueta e endotélio vascular (Badimon, Storey e Vilahur, 2011).

Após a adesão das plaquetas ao endotélio, estas são ativadas e liberam o conteúdo dos seus grânulos, que, por sua vez, ativam e recrutam outras plaquetas, **Figura 1** (Broos *et al.*, 2011). Entretanto, as plaquetas também podem se aderir ao endotélio quando o mesmo encontra-se íntegro, porém ativado. O endotélio ativado pode apresentar propriedades as quais o torna capaz de fazer com que haja adesão plaquetária (Tsoumani *et al.*, 2012). Outra maneira das plaquetas interagirem com o endotélio íntegro, é quando ocorre a participação de micropartículas derivadas de plaquetas, as quais induzem através de diferentes mecanismos a adesão e agregação plaquetária (Reid e Webster, 2012)

O mecanismo da hemostasia pode ser didaticamente dividido em duas fases. Na fase inicial, denominada hemostasia primária, ocorre vasoconstrição logo após o rompimento do vaso e tem como função diminuir o fluxo sanguíneo

no local. Isso permite um maior contato entre as plaquetas que estão circulando com o local da lesão, desta maneira as plaquetas sofrem adesão mais facilmente ao endotélio lesado, sendo este contato fundamental para as plaquetas serem ativadas, assim dando origem há formação do tampão plaquetário (Harger *et al.*, 1983; Rumbaut e Thiagarajan, 2010; Broos *et al.*, 2011; Clemetson, 2012). Entretanto, a hemostasia primária é um processo dinâmico uma vez que ao mesmo tempo que há adesão e agregação plaquetária, há também exposição de fator tecidual, o qual consegue ativar o fator X (FX) e fator IX (FIX), sendo que o FX ativado consegue gerar pequenas quantidades de trombina (Butenas e Mann, 2002).

Na fase secundária, ocorre a ativação dos fatores plasmáticos de coagulação com geração de trombina, que é uma potente enzima proteolítica, que cliva o fibrinogênio (solúvel) em monômeros de fibrina (insolúvel) (Adams e Bird, 2009). Esses monômeros de fibrina gerados darão origem a um coágulo estável, uma vez que o fator XIIIa age nesses monômeros promovendo a formação de ligações covalentes entre as moléculas de fibrina, deste modo estabilizando o coágulo uma vez que aumenta a sua elasticidade e resistência à degradação sofrida pela plasmina (Ichinose, Asahina e Kobayashi, 2005; De La Red *et al.*, 2009)

Figura 1: Papel da plaqueta na hemostasia, dando ênfase no processo de adesão e agregação plaquetária. Adaptado de Badimon, Storey *et al.*, 2011

Formação de coágulo

A coagulação sanguínea é desencadeada pela lesão da parede do vaso que expõe a matriz subendotelial. Esta lesão irá desencadear uma sequência de eventos que inclui: espasmo vascular, formação do tampão de plaquetas, coagulação do sangue e crescimento de tecido fibroso na região que se formou o coágulo, para fechar o vaso sanguíneo de maneira permanente (Broos *et al.*, 2011). Parte destes eventos acontecem basicamente por meio de duas vias distintas da cascata de coagulação, que convergem para uma via comum. Este modelo da cascata foi previamente proposto em 1964 por Macfarlane, Davie e Ratnoff, **Figura 2**. Neste modelo, ocorre a ativação proteolítica sequencial de zimógenos por proteases plasmáticas. A ativação de um fator da coagulação leva a uma série sequencial de etapas de ativação de outros fatores da coagulação, que culminam na geração de trombina (Macfarlane, 1964).

Ao longo do tempo o modelo original da cascata foi modificado, porém, atualmente é considerado inadequado a separação da cascata em duas vias (intrínseca e extrínseca), uma vez que essa divisão não acontece *in vivo*, pois tanto o sistema intrínseco como extrínseco não poderiam ocorrer de forma independente, pois os fatores de coagulação estão interligados nas duas vias (Adams e Bird, 2009).

Atualmente o modelo mais aceito para a coagulação *in vivo*, destaca a importância central que o fator tecidual (FT) possui, sendo ele essencial para a rápida amplificação da trombina, e por possuir interdependência de fatores de coagulação e elementos celulares (Pérez-Gómez e Bover, 2007; Adams e Bird, 2009).

No velho modelo da cascata de coagulação a via extrínseca era iniciada após a exposição do FT, seja por ruptura do vaso sanguíneo ou pela ativação do endotélio, há ativação do fator VII em presença do FT, formando um complexo catalítico com o fator VIIa (Butenas e Mann, 2002; Mann *et al.*, 2006; Key, Geng e Bach, 2007). Este complexo fator VIIa/FT é responsável pela ativação do fator X à fator Xa, presente na via comum da cascata de coagulação e também pela ativação do fator IX. O fator Xa em associação com o cálcio e o co-fator V na superfície de fosfolipídio, gera fator IIa (trombina), mediante a clivagem da protrombina (Schoenmakers, Reitsma e Spek, 2005; Key, Geng e Bach, 2007; Warmuth, Mad e Wild, 2011). A trombina quando se

encontra na circulação, atua hidrolisando o fibrinogênio, e liberando fibrinopeptídeos para formar os monômeros de fibrina. Esses monômeros unem-se através de pontes de hidrogênio e dão origem a um polímero frouxo e insolúvel de fibrina, que é estabilizado pelo fator XIII (XIIIa). Ele também é ativado pela trombina, pelo cálcio e atua agregando fibrilas com a intenção de formar um coágulo estável (Schoenmakers, Reitsma e Spek, 2005; Lichtman, 2006; Warmuth, Mad e Wild, 2011).

Já a via intrínseca da cascata se inicia através do fator XII (fator de Hageman), que é ativado após o sangue entrar em contato com uma superfície que contenha cargas elétricas negativas. Esse processo, que também é conhecido como ativação por contato, necessita da presença de outros componentes do plasma como a pré-caliceína (uma serinoprotease) e o cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático) e envolve os fatores de coagulação XII, XI, IX e VIII (Franco, 2001). Após o fator XII ser ativado ele ativa o fator XI que irá ativar o IX (Adams e Bird, 2009). O fator IXa em presença do cofator VIIIa forma o complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa) que irá atuar ativando o fator X, iniciando a via comum da cascata onde tanto a via intrínseca como a extrínseca se encontram (Adams e Bird, 2009). A ativação do fator X através do complexo (FIXa/FVIIIa) é cerca de 50 à 100 vezes maior do que a produzida pelo complexo tenase extrínseco (FXa/FVIIa) (Butenas e Mann, 2002).

No novo modelo da cascata de coagulação proposto, os mecanismos acima, acontecem em três fases distintas: uma fase inicial, uma fase de amplificação e por último uma fase de propagação. Na fase de iniciação tem-se a exposição do FT para os fatores de coagulação, seja por lesão tecidual ou pela ativação do endotélio. Nesta fase ocorre a formação do complexo tenase extrínseco (FVIIa/FT) que gera pequenas quantidades de FIXa, FXa e trombina. Na segunda fase, conhecida como fase de amplificação, há a formação do complexo tenase intrínseco (FIXa/FVIIIa). Esse complexo é fundamental para que ocorra a amplificação do processo de coagulação, uma vez que o mesmo aumenta em mais de 50 vezes a produção de fator Xa, quando comparado a quantidade gerada pelo complexo FVIIa/TF. O aumento da produção de fator Xa é essencial para a cascata da coagulação, devido ao consequentemente aumento da geração de trombina (Butenas e Mann, 2002; Mann *et al.*, 2006).

Por fim a ultima fase conhecida como fase de propagação, ocorre a geração de grandes quantidades de trombina com deposição de fibrina (Pérez-Gómez e Bover, 2007; Adams e Bird, 2009).

Figura 2: Modelo da cascata de coagulação

Papel da trombina

A trombina é uma molécula gerada no organismo a partir da clivagem da protrombina. Essa clivagem realizada pelo complexo Xa/Va gera dois fragmentos, sendo o primeiro denominado fragmento 1+2 da protrombina, e o segundo recebendo o nome de trombina (Lichtman, 2006; Versteeg *et al.*, 2013).

A trombina possui vários papéis na hemostasia. No processo de coagulação atua: 1- removendo os fibrinopeptídeos A e B da molécula de fibrinogênio para formar os monômeros de fibrina, desta maneira formando o coágulo de fibrina; 2- ativando as plaquetas e 3- promovendo a

retroalimentação da ativação de outros fatores da coagulação (fatores XI, VIII e V) (Rezaie *et al.*, 1995; Ariëns *et al.*, 2002). Além desses papéis, a trombina também possui função anticoagulante, uma vez que se liga á trombosmodulina na ativação da proteína C (Morser, 2011), e atua na ativação do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) (Uszyński *et al.*, 2010).

Regulação do processo de coagulação

Para o controle das reações que ocorrem durante o processo de coagulação sanguínea é necessário que, em cada nível da cascata de coagulação, ocorra sua regulação por meio de diferentes mecanismos, sejam eles através de inibidores de fatores da coagulação, de inibição enzimática ou por modulação na atividade de cofatores, com o intuito de evitar a formação excessiva de fibrina e oclusão vascular (Adams e Bird, 2009).

O processo de coagulação ocorre inicialmente com a formação do complexo tenase extrínseco (VIIa/FT), que atua ativando os fatores IX e X da coagulação. O inibidor da via do fator tecidual (TFPI) é uma proteína de 42 kDa produzida pelas células endoteliais, que apresenta três domínios do tipo “Kunitz”. A maior parte do TFPI encontra-se na parede do vaso, e o restante encontra-se no plasma circulante (Skretting *et al.*, 2010; Altmäe *et al.*, 2011).

O TFPI atua neutralizando a atividade catalítica do FXa. Esta neutralização ocorre quando o segundo domínio do TFPI se liga e inibe o fator Xa formando o complexo FXa/TFPI; esse complexo, através do primeiro domínio do TFPI se liga ao complexo (VIIa/FT) inibindo-o e formando o complexo inibidor quaternário VIIa/FT-TFPI-Xa. Outra forma de ação do TFPI acontece quando o mesmo se liga ao complexo terciário VIIa/FT/Fxa. Esta ligação do TFPI ocorre logo após a ativação do fator X, pelo complexo VIIa/FT, quando o FXa ainda não se dissociou do complexo. Desta maneira, a ativação do fator X é regulada negativamente na presença de TFPI, limitando a produção de fator Xa e fator IXa (Skretting *et al.*, 2010). Estudos sugerem que o efeito fisiológico causado pelo TFPI seja predominantemente mediado através dessa segunda via (Broze, 2003; Skretting *et al.*, 2010).

A antitrombina é um inibidor primário da trombina, que também atua em várias outras serina proteases (IXa, Xa e XIa). A sua principal ação é limitar o processo de coagulação apenas ao local lesado, desta forma impedindo que o

coágulo se estenda a outras regiões que não sofreram lesão. Ela também possui ação sobre o complexo tenase extrínseco (VIIa/FT), fazendo com que o mesmo se dissocie mais rapidamente e também impedindo a sua reassociação (Pérez-Gómez e Bover, 2007; Adams e Bird, 2009). A atividade inibitória da antitrombina é acelerada por duas moléculas, uma fisiológica (heparan sulfato encontrado nas membranas das células endoteliais) e outra sintética (heparina que possui estrutura similar ao heparan sulfato) (Pike *et al.*, 2005).

Por sua vez, a trombomodulina é uma glicoproteína que regula a ativação da proteína C a proteína C ativada (PCa), através da formação do complexo trombina/trombomodulina (Esmon, 1989; Isermann *et al.*, 2003). No entanto, esta ativação é dependente da ligação da proteína C ao seu receptor no endotélio (EPCR) (Uszyński *et al.*, 2010). A PCa exerce a sua função através da inativação proteolítica dos fatores Va e VIIIa em superfícies que contenham fosfolípidos, atenuando a geração de trombina. Esse processo é potencializado pela proteína S, que age como um cofator não enzimático nas reações de inativação (Rezaie *et al.*, 1995; Isermann *et al.*, 2003; Uszyński *et al.*, 2010).

Sistema fibrinolítico

O sistema fibrinolítico é essencial para promover a dissolução do coágulo formado pela ativação dos mecanismos da hemostasia. Ele é composto por serino proteases e serpinas (inibidores de proteases séricas) (Franco, 2001; Chan e Paredes, 2013)

No processo de fibrinólise há a conversão do plasminogênio circulante em plasmina. Para que ocorra esse processo, o plasminogênio possui dois principais ativadores fisiológicos: o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA). A plasmina é o principal mediador da fibrinólise, uma vez que atua clivando a fibrina em resíduos específicos de lisina e arginina, desta forma produzindo o produto de degradação de fibrina (PDF) (Pérez-Gómez e Bover, 2007; Adams e Bird, 2009).

O controle da fibrinólise é realizado principalmente através de dois inibidores, o PAI-1 e a α_2 antiplasmina (Chan e Paredes, 2013).

O PAI-1 é um inibidor da fibrinólise de ação rápida, atuando na regulação da atividade da plasmina, através da formação de complexos que inativam o t-PA e o u-PA e, deste modo controlando a ativação do plasminogênio (Szymanski, Pate e Durstine, 1994; Kohler e Grant, 2000; Adams e Bird, 2009). Além do mecanismo citado, a α_2 antiplasmina, a qual é um inibidor específico da plasmina livre, se liga covalentemente a fibrina polimerizada, através do fator XIIIa (Lichtman, 2006).

Outro inibidor da fibrinólise é o TAFI (inibidor da fibrinólise ativado pela trombina). O TAFI é ativado por diferentes proteases, incluindo a plasmina e a trombina, e ele atua atenuando a fibrinólise pela remoção de resíduos de lisina carboxi-terminal a partir da fibrina parcialmente degradada (Boffa *et al.*, 2008; Schadinger *et al.*, 2010).

1.2 Hemostasia durante a gestação

Durante a gestação normal ocorrem várias alterações fisiológicas e anatômicas na mulher, entre as quais as alterações dos mecanismos hemostáticos. Durante a gravidez, ocorrem alterações no endotélio vascular, no fluxo sanguíneo e nas concentrações de fatores da coagulação, de modo que a gestante apresenta risco elevado de ter um evento tromboembólico. Foi descrito que no período pós-parto esse risco aumenta ainda mais, com maior frequência de trombose venosa profunda (TVP) (Walker, 2000; Lambrinoudaki *et al.*, 2010; Battinelli e Bauer, 2011).

Na gestante, o endotélio da placenta confere condições diferentes de coagulabilidade quando comparado a outros locais com endotélio distinto. As células do trofoblasto são semelhantes as células vasculares, porém as células do sinciciotrofoblasto expressam maiores concentrações de FT e menores concentrações dos inibidores da via do FT. Enquanto que nas células endoteliais da veia umbilical acontece o contrário, com menor concentração de FT e maior concentração de inibidores do FT (Brenner, 2006).

Além das alterações no endotélio, durante a gestação há o aumento da estase venosa e injúria vascular associada com o parto, além de outros aspectos da hemostasia serem afetados durante o período gestacional (Carbone e Rampersad, 2010). Nessa fase têm-se aumento dos fatores pró-coagulantes (fator VII, X e VIII, fibrinogênio e Von Willebrand) e diminuição dos

inibidores da coagulação (proteína S livre diminui e há aumento da resistência à proteína C ativa) (**Tabela 2**) (Brenner, 2004; James, 2008; Battinelli e Bauer, 2011). A partir do primeiro trimestre da gestação ocorre o aumento da resistência à PCa e o aumento das concentrações dos inibidores da fibrinólise: TAFI, PAI-1 e PAI-2 (Battinelli e Bauer, 2011). Esse mecanismo causa uma mudança fisiológica, levando a um estado de hipercoagulabilidade (estado pró-trombótico), que tem como função reduzir a hemorragia durante o parto e pós-parto (Brenner, 2004; Battinelli e Bauer, 2011). Além disso, durante a gravidez, as artérias espiraladas do útero são remodeladas em grandes vasos de baixa resistência que adquirem propriedades semelhantes às de veias. Desta forma fatores pró-trombóticos venosos tem sido estudados a fim de tentar explicar as perdas gestacionais espontâneas (Pasquier *et al.*, 2009).

Quando o estado de hipercoagulabilidade é manifestado no início da gravidez, o mesmo pode levar ao AER, e quando ele é manifestado mais tarde tem sido associado principalmente com pré-eclâmpsia, descolamento de placenta ou restrição de crescimento intrauterino (Preston *et al.*, 1996; Kovalevsky *et al.*, 2004; Lambrinoudaki *et al.*, 2010). Além disso, essa mudança fisiológica que ocorre na hemostasia da mulher durante a gestação pode levar ao desenvolvimento de algumas complicações na gestante, aumentando o risco de mortalidade materna, devido à doença isquêmica cardíaca, assim como a ocorrência de eventos tromboembólicos como a trombose venosa profunda (TVP) e a embolia pulmonar (EP) (Smith, Pell e Walsh, 2001; James, 2009; Battinelli e Bauer, 2011). A ocorrência tanto de TVP, como da EP aumenta, durante o período pós-parto, sendo que a TVP é a apresentação clínica mais frequente encontrada entre os eventos tromboembólicos (Battinelli e Bauer, 2011).

Tabela 2: Alterações fisiológicas na concentração de fatores da coagulação durante a gravidez.

Aumenta a concentração
Pró coagulação
Fator II, VII, VIII, XII, Trombina (IIa), fibrinogênio (I) e Von Willebrand
Anticoagulação
TFPI e Resistência à proteína C (2 ^a e 3 ^a trimestre)
Sistema fibrinolítico
TAFI, PAI-1 e PAI-2
Diminui a concentração
Anticoagulação
Proteína S livre

Adaptado de: James, 2008; Battinelli e Bauer, 2011.

O estado de hipercoagulabilidade da gravidez pode ser exacerbado pela presença de trombofilias hereditárias, que são um grupo de alterações genéticas da coagulação que elevam o risco de ter um evento trombótico (Blumenfeld e Brenner, 1999). O evento trombótico pode explicar as perdas fetais em mulheres que apresentam trombofilias, devido a excessiva trombose dos vasos da placenta, infarto placentário e insuficiência uteroplacentária (Rey *et al.*, 2003).

As trombofilias hereditárias incluem a deficiência de anticoagulantes naturais (proteína C e S, e antitrombina) e os polimorfismos no gene do fator V (*F5* 1691G>A), também conhecida como fator V de Leiden (FVL), e o polimorfismo no gene da protrombina (*F2* 20210G>A) (Battinelli e Bauer, 2011).

A associação entre a presença de trombofilias (polimorfismos genéticos tais como o FVL e protrombina) e complicações obstétricas de origem placentária tem sido descrita na literatura (Rodger *et al.*, 2010).

As trombofilias são encontradas com maior frequência em populações caucasianas, sendo raras em pessoas com descendência asiática e africana (Rees, Cox e Clegg, 1995; Rosendaal *et al.*, 1998). Estudos têm demonstrado que mães que apresentam polimorfismos relacionados à trombofilia hereditária, possuem maior risco de ter complicações obstétricas como abortamentos, principalmente em fases mais avançadas da gestação (Lambrinoudaki *et al.*,

2010). Têm sido demonstrado que as trombofilias podem aumentar o risco de insuficiência placentária, devido à trombose micro placentária (Isermann *et al.*, 2003), especialmente no lado fetal da placenta (Dizon-Townson *et al.*, 1997). Quando o feto é portador de alguma trombofilia hereditária, como o FVL, a taxa de aborto espontâneo é maior quando comparada com aqueles que não apresentam alteração genética que leva a um estado fetal trombofilico (Dizon-Townson *et al.*, 1997).

As mulheres que apresentam trombofilias podem vir a apresentar os sinais e sintomas do estado de hipercoagulabilidade produzida pela mesma, apenas durante o período gestacional ou no período de puerpério (que dura entre 6^a a 8^a semanas, após o parto) (Blumenfeld e Brenner, 1999; Brenner, 2004). Durante o puerpério ocorrem aproximadamente um terço das TVPs e metade dos tromboembolismos pulmonares (TEP). Já durante a gestação cerca de 80% dos eventos tromboembólicos venosos são TVPs e os 20% restantes são embolias pulmonares (James, 2008).

Além dos fatores genéticos que predis põem a eventos tromboembólicos e que estão associados a perdas fetais, outros fatores relacionados ao estilo de vida e características pessoais devem ser considerados, como: elevado Índice de Massa Corporal (IMC), tabagismo, idade materna superior a 35 anos e multiparidade (James, Brancazio e Ortel, 2005; Mcknight *et al.*, 2011; Bennett, Bagot e Arya, 2012).

Outro possível fator que pode estar associado aos AER nas mulheres gestantes é a compressão vascular causada pelo útero grávido. Essa compressão pode predispor a estase (De Almeida, 2010).

A associação entre os polimorfismos genéticos (FVL e protrombina) e os AER foi descrita, porém os resultados são controversos, uma vez que muitos não encontraram associação (Jivraj *et al.*, 2006; Karata *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2011; Dissanayake *et al.*, 2012). Pouco se conhece sobre o papel de polimorfismos em outros genes relacionados a fatores ou inibidores da hemostasia, tais como de fatores e/ou inibidores associados a geração de trombina e fibrinólise e seu papel na etiologia de AER (Jeddi-Tehrani *et al.*, 2011; Ticconi *et al.*, 2011; Guerra-Shinohara *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2013).

A seguir serão apresentados os principais polimorfismos genéticos que foram associados ao maior risco de ter tromboembolismo venoso (TVE).

Polimorfismo no gene do fator V (F5 1691G>A)

O fator V é uma glicoproteína presente no plasma e apresenta tamanho de 330 kD. Esse fator é convertido em fator V ativado (Va), pela ação da trombina, que gera uma cadeia pesada e uma cadeia leve, as quais são mantidas juntas pelos íons de cálcio. O fator Va é essencial para a cascata de coagulação, atuando como um cofator para a conversão da protrombina em trombina pelo fator Xa (Contran, 1999).

O polimorfismo genético que resulta na troca de um nucleotídeo G>A na posição 1691, no exon 10 do gene do fator V, também conhecido como fator V de Leiden (FVL), leva à substituição da arginina por uma glutamina na posição 506 do fator plasmático (R506Q) (Bertina *et al.*, 1994; Dahlbäck, 1994). Em condições normais a PCa inativa o fator V ativado através de uma sequência de três sítios específicos, sendo o primeiro sítio de clivagem a Arginina (Arg) na posição 506, seguido de Arg 306 e Arg 679 (Bertina *et al.*, 1994; Kalafatis *et al.*, 1995). A presença desse polimorfismo induz à resistência à PCa, na qual a clivagem e inativação do fator Va é feita de forma insatisfatória, o que leva ao seu acúmulo, desta forma resultando predisposição à trombose, **Figura 3** (Bertina *et al.*, 1994; Kalafatis *et al.*, 1995).

A frequência do FVL em caucasoides saudáveis varia entre 2 a 15% no mundo (Rees, Cox e Clegg, 1995; Caetano *et al.*, 2006; Ocak *et al.*, 2013). porém esse polimorfismo é pouco frequente em negros e asiáticos (0,0 a 1%) (Rees, Cox e Clegg, 1995; Kinoshita *et al.*, 2005; Hamasaki, Kuma e Tsuda, 2013). Na população norte americana, a frequência do FVL é de 5% dos indivíduos caucasianos, 2,2% em hispânicos, 1,2% em americanos afrodescentes, e 0,45% em americanos de origem asiática (Ridker *et al.*, 1997; Varga e Kujovich, 2012).

No Brasil, um estudo chamado BRATROS (*Brazilian Thrombosis Study*), que incluiu 434 pacientes com trombose venosa e 434 indivíduos brasileiros saudáveis, mostrou que as frequências de FVL eram 10,1% e 2,3%, respectivamente em pacientes e controles (Pieroni *et al.*, 2007).

O FVL é comumente encontrado em pacientes com TVE (20 a 30%) (Rosendaal, 1999; Gohil, Peck e Sharma, 2009; Gessoni *et al.*, 2010; Sveinsdottir *et al.*, 2012); e foi descrito que 44% das mulheres grávidas com TEV eram portadoras do FVL (Gerhardt *et al.*, 2000).

Alguns estudos encontraram a associação entre a presença do FVL e os abortamentos recorrentes (Biron-Andréani *et al.*, 2009; Lund *et al.*, 2010), e esta relação estaria associada à resistência à PCa, que poderia acarretar em trombose placentária, desta forma comprometendo o sucesso da gestação (Franchini, 2012).

Estudos mostram que o FVL foi associado tanto com aborto recorrente no início da gestação (Rey *et al.*, 2003), no final do primeiro trimestre (10-13 semanas de gestação) (Kurzawińska *et al.*, 2009), e na perda fetal tardia (após a vigésima segunda semana de gestação) (Gris *et al.*, 1999; Rey *et al.*, 2003; Biron-Andréani *et al.*, 2009). Também foi descrito que as mulheres que possuem FVL juntamente com o polimorfismo no gene da protrombina (*F2* 20210G>A), apresentam menor taxa de sucesso na gravidez, assim como o risco de ter perda fetal tardia aumentada em quase três vezes (Martinelli *et al.*, 2000; Lund *et al.*, 2010).

Em mulheres brasileiras com AER, a frequência encontrada desse polimorfismo foi de 7,1% (Souza *et al.*, 1999), porém esse dado deve ser considerado com cautela, uma vez que o número amostral de casos era muito baixo (n= 56).

Figura 3: Efeito biológico da presença do fator V de Leiden (FVL).

1. A trombina (IIa) se liga a trombomodulina (TM) localizada no endotélio vascular, o que faz com que a mesma ative a proteína C (PC) em presença de seu receptor (receptor endotelial da proteína C - EPCR).
2. A PC ativada (PCa) em presença da proteína S (PS) e de cálcio ionizado (Ca) atua inativando os fatores Va e VIIIa (neste esquema é demonstrado apenas o fator Va). Este processo atua limitando a formação do coágulo.
3. A presença do FVL faz com que o fator V fique resistente à clivagem exercida pela PCa, desta forma se tem uma menor limitação da formação do coágulo.

Adaptado de: (Bloomenthal *et al.*, 2002)

Na **Tabela 3** estão apresentadas as características dos polimorfismos estudados (*FGB* -455G>A e -148C>T, *THBD* 1418C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210 G>A, *SERPINE1* 4G/5G e *CPB2* c.505G>A).

Tabela 3. Características dos polimorfismos estudados.

Polimorfismo	Cromossomo	Posição do cromossomo	Nome do gene	rs	Frequência do alelo mutado (%) ^{#*}
<i>FGB</i> -455G>A	4	155483708	<i>FGB</i>	rs1800790	4,3-21,1 ^a
<i>FGB</i> -148C>T	4	155484015	<i>FGB</i>	rs1800787	7,0-21,0 ^b
<i>THBD</i> 1418C>T	20	23028724	<i>THBD</i>	rs1042579	17,3-23,5 ^c
<i>SERPINE1</i> 4G/5G	7	100769710:10 0769711	<i>SERPINE</i> 1	rs1799889	40,0 – 62,5 ^d
<i>F5</i> 1691G>A	1	169519049	<i>F5</i>	rs6025	0,45 – 7,0 ^e
<i>F2</i> 20210 G>A	11	46761055	<i>F2</i>	rs1799963	0,7 – 4,0 ^f
<i>CPB2</i> c.505G>A	13	46648094	<i>CPB2</i>	rs3742264	33,1- 49,0 ^g

Frequência do alelo mutado em populações saudáveis.*Fonte: a: (Cook *et al.*, 2001; Albert *et al.*, 2009); b:(Cook *et al.*, 2001); c: (Heit *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2008); d: (Ghosh, Shetty e Vora, 2009; De Paula Sabino *et al.*, 2011; Gonçalves-Filho *et al.*, 2011); e: (Rees, Cox e Clegg, 1995; Ridker *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2004); f: (Rosendaal *et al.*, 1998), g: (Martini *et al.*, 2006; Verdú *et al.*, 2008; Masini *et al.*, 2009).

Polimorfismo no gene da protrombina (*F2* 20210G>A)

A protrombina é uma proteína plasmática sintetizada no fígado, precursora da trombina, considerada o efetor final da cascata de coagulação que resulta na formação de fibrina a partir de fibrinogênio (Contran, 1999; Lichtman, 2006).

O polimorfismo *F2* 20210G>A está localizado na região 3' não codificante deste gene. Neste polimorfismo ocorre a substituição do nucleotídeo G por um nucleotídeo A, na posição 20210 (Eriksson *et al.*, 1995). De fato, foi demonstrado que indivíduos que são heterozigotos para esse

polimorfismo apresentam aumento de cerca de 30% nas concentrações plasmáticas de protrombina quando comparado com as concentrações de protrombina em indivíduos que não são portadores (Battinelli e Bauer, 2011). Já a presença desse polimorfismo em homozigose é responsável por um aumento de aproximadamente 70% na concentração plasmática dessa proteína (Segal *et al.*, 2009).

Este polimorfismo é mais comum em indivíduos caucasianos saudáveis apresentando uma prevalência de cerca de 2%, sendo extremamente raro em indivíduos com descendência africana (0,67%) e asiática (0,0%) (Rosendaal *et al.*, 1998; Fawaz *et al.*, 2004; Pandey *et al.*, 2012). Entretanto, a prevalência em indivíduos que tiveram evento trombótico aumenta, chegando a 6,2% (Mueller *et al.*, 2005). No Brasil, frequências de 0,7%, e 16,7%, para o polimorfismo F2 20210G>A foram encontradas, respectivamente, em indivíduos brasileiros saudáveis, e em indivíduos brasileiros com trombose venosa cerebral (TVC) (Rodrigues *et al.*, 2004). Em outro estudo realizado no Brasil, a prevalência desse polimorfismo em mulheres com AER foi de 3,6%, enquanto que no grupo controle foi de 1,0% (Souza *et al.*, 1999). No estudo BRATROS, a frequência desse polimorfismo em pacientes com TV foi de 6,6%, enquanto que em indivíduos saudáveis foi de 1,2% (Pieroni *et al.*, 2007).

Na gravidez, cerca de 17% das mulheres que apresentavam TEV eram heterozigotas para essa mutação (Middeldorp *et al.*, 2001). Também foi descrito que a presença desse polimorfismo aumenta em cerca de dez vezes o risco de ocorrência de trombose durante a gestação, além de aumentar em cerca de quatro vezes a chance de eventuais complicações obstétricas (Kupfermanc *et al.*, 1999; Sedano-Balbás *et al.*, 2011).

Embora alguns estudos tenham mostrado associação entre o polimorfismo F2 20210G>A e o AER, não há consenso sobre essa associação. Foi observado que a herança em heterozigose para o polimorfismo é mais frequente em mulheres com aborto no primeiro trimestre, em comparação com mulheres controles (sem história de aborto) (Pihusch *et al.*, 2001; Kovacheva *et al.*, 2007). No entanto, outro estudo não encontrou associação entre o polimorfismo F2 20210G>A e efeitos adversos na gravidez (aborto, pré-eclâmpsia e descolamento de placenta) (Silver *et al.*, 2010).

Polimorfismo no gene da cadeia β do fibrinogênio (*FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T)

O fibrinogênio é uma proteína plasmática com peso molecular de 340 kDa e é produzida nos hepatócitos. Esta proteína apresenta vida média de 3 a 5 dias e possui estrutura dimérica, sendo formada por três pares de cadeias não idênticas de polipeptídios, as quais são denominadas alfa (α), beta (β) e gama (γ), codificadas por três genes diferentes no braço longo do cromossomo 4 (Mosesson, 2005; Feinbloom e Bauer, 2006).

O fibrinogênio participa de diferentes mecanismos no processo de coagulação, sendo o precursor da fibrina, atuando na agregação plaquetária e, por último, é o principal determinante da viscosidade do plasma, interagindo com as células endoteliais para produzir a migração e proliferação celular (Ernst e Resch, 1993; Stec *et al.*, 2000; Reinhart, 2003). Além de ser uma proteína da coagulação, é também uma proteína de fase aguda e, portanto, sua concentração eleva-se em todas as situações que envolvem dano, infecção e inflamação tissular. Embora a gravidez não seja um estado patológico, a concentração de fibrinogênio encontra-se aumentada (Pickart, 1981).

Concentrações plasmáticas elevadas de fibrinogênio foram associadas a maior risco de eventos vasculares como: TVE, doença arterial coronariana e infarto cerebral (Martiskainen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Bozdemir *et al.*, 2010). Polimorfismos nos genes das cadeias α , β e γ foram associados com o aumento da concentração de fibrinogênio plasmático (De Maat *et al.*, 1998; De Maat, 2001; Manocha *et al.*, 2007; Jacquemin *et al.*, 2008; Siegerink, Rosendaal e Algra, 2009).

O polimorfismo *FGB* -148C>T envolve a substituição de C por T na região promotora do gene (Guo, Zhang e Zhang, 2009) e sua frequência em indivíduos brasileiros é de 3% em homozigose e 25% em heterozigose (Sampaio *et al.*, 2007). A presença desse polimorfismo foi associada ao infarto agudo do miocárdio (Sampaio *et al.*, 2007). Em indivíduos ingleses a frequência do alelo 148T foi de: 21% em brancos; 16% em imigrantes asiáticos do Sul da Ásia; e 7% em imigrantes africanos (Cook *et al.*, 2001).

O polimorfismo *FGB* -455 G>A envolve a transição do nucleotídeo G por A na posição promotora do gene e foi associado com o aumento em cerca de 7

a 10% das concentrações de fibrinogênio no plasma em ambos os sexos (Tybjaerg-Hansen *et al.*, 1997; Kerlin *et al.*, 2004; Guo, Zhang e Zhang, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Homens portadores do alelo *FGB* 455A apresentaram maiores concentrações de fibrinogênio quando comparados com portadores de genótipo GG (Ben Assayag *et al.*, 2006), sendo observado que portadores de genótipo AA apresentaram maior risco de eventos cardiovasculares (De Maat *et al.*, 1998; Bi *et al.*, 2004; Lynch *et al.*, 2009).

A frequência alélica do polimorfismo *FGB* -455G>A é variável segundo a descendência dos indivíduos, sendo descrito frequências de 21% em indivíduos brancos; 16% em imigrantes do sul da Ásia; e 4,5% em imigrantes africanos para o alelo 455A (Cook *et al.*, 2001). Já em americanos, a frequência do alelo mutado foi de: 21,1% em brancos; 17,6% em hispânicos; 6,6% em negros e 4,3% em asiáticos (Albert *et al.*, 2009).

Em estudo no qual foi analisada a possível relação entre diferenças étnicas (brancos, negros caribenhos e negros nascidos no oeste africano) com a frequência dos polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T, foi demonstrado que o alelo A foi menos prevalente em negros e que o mesmo não foi associado com concentrações elevadas de fibrinogênio (Cook *et al.*, 2001).

Estudo realizado recentemente foi verificado que mulheres italianas com genótipo AA para o polimorfismo 455 apresentaram risco aumentado de ter AER (Ticconi *et al.*, 2011).

Estudos revelam que esses dois polimorfismos (-455G>A e -148C>T) encontram-se em desequilíbrio de ligação (Pihusch *et al.*, 2001; Jacquemin *et al.*, 2008; Morozumi, Sharma e De Nardin, 2009; Theodoraki *et al.*, 2010). E esse desequilíbrio de ligação é responsável pelo aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, em indivíduos portadores do alelo mutado (A) do polimorfismo *FGB* -455G>A (Theodoraki *et al.*, 2010). Uma vez que estudos demonstraram que esse polimorfismo não é funcional e que a influência que ele exerce nas concentrações plasmáticas de fibrinogênio se deve ao fato do mesmo encontrar-se em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos funcionais localizados na região promotora do gene da cadeia beta do fibrinogênio, como o *FGB* -148C>T (Pihusch *et al.*, 2001; Jacquemin *et al.*, 2008; Morozumi, Sharma e De Nardin, 2009).

Polimorfismo no gene da trombomodulina (*THBD* 1418C>T)

A trombomodulina é um receptor de glicoproteína, composto por 559 resíduos de aminoácidos, expresso principalmente na superfície endotelial dos vasos sanguíneos e também no sinciciotrofoblasto placentário. Foi demonstrado que há o aumento da expressão e atividade funcional da trombomodulina no sinciciotrofoblasto com a progressão da idade gestacional (Maruyama, Bell e Majerus, 1985; Stortoni *et al.*, 2010).

A estrutura da molécula de trombomodulina é composta por diferentes domínios estruturais extra e intracelulares. O domínio amino-terminal apresenta 223 resíduos de aminoácidos, sendo que compreende cerca de metade da porção externa da trombomodulina (Esmon, 1989; Conway *et al.*, 1997). Já o segundo domínio apresenta 6 repetições de regiões semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF), possui 236 resíduos e apresentando diferentes funções, sendo a região composta pela EGF 5 e 6 o local onde a trombina irá se ligar. Já as repetições EGF 4, 5 e 6 são necessários para a ativação da proteína C, enquanto que a região formada pela EGF 3 a 6 é fundamental para a ativação do TAFI (Okamoto *et al.*, 2012). O terceiro domínio é um domínio rico em serinas e treoninas e apresenta 34 resíduos, seguido do domínio transmembrana, o qual têm 28 resíduos e por fim uma cauda citoplasmática composta por 38 resíduos (**Figura 4**) (Esmon, 1989; Okamoto *et al.*, 2012).

A trombomodulina é uma molécula chave na hemostasia não apenas por inibir a trombina mas também por acelerar a geração de PCa . Ela se liga à trombina formando o complexo trombina-trombomodulina. Essa ligação acelera em até 1.000 vezes a capacidade da trombina em ativar a proteína C (Nagashima *et al.*, 1993). A trombomodulina possui a capacidade de canalizar a atividade da trombina para a ativação da proteína C, que está presente no plasma e, tem como função inibir o fator Va e o fator VIIIa, deste modo, limitando a produção de trombina (Huang *et al.*, 2010).

O polimorfismo de nucleotídeo único *THBD* 1418C>T codifica a mudança do aminoácido alanina por uma valina na posição 455 da proteína, deste modo esse polimorfismo também é conhecido como a denominação Ala455Val (Van Der Velden *et al.*, 1991; Cole *et al.*, 2004). Essa troca de aminoácidos está localizada na região responsável pela alta afinidade de

ligação da trombina à trombomodulina (EGF-6) , fazendo com que a trombina fique em suspensão (acima da superfície do endotélio) (Esmon, 1995).

Em mulheres australianas grávidas da população em geral a presença desse polimorfismo foi de 3,4% em homozigose e 27,7% em heterozigose, totalizando 31,1% das mulheres portadoras do alelo mutado (Said *et al.*, 2008). Em outro estudo, realizado com mulheres australianas e neozelandesas com pré-eclâmpsia ou eclâmpsia, a frequência desse polimorfismo (CT+TT) foi de 33,1% (Borg *et al.*, 2002). Já a frequência do alelo mutado em pacientes americanos com TVE idiopático foi de 40,6% (Heit *et al.*, 2005).

Figura 4: Estrutura e domínios da molécula de trombomodulina.

Legenda: fator de crescimento epidérmico (EGF), inibidor da fibrinólise ativado pela trombina ativado (TAFIa), proteína C ativada (APC). Adaptado de: Okamoto et al., 2012.

Polimorfismo no gene do PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G)

O inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1) é uma cadeia simples glicoprotéica com peso molecular de 47 kD. Ele é um membro da superfamília dos inibidores de serina-protease ou serpinas, com origem endotelial, que também está presente em plaquetas e hepatócitos (Kohler e Grant, 2000; Cesari, Pahor e Incalzi, 2010).

O PAI-1 participa do processo fibrinolítico inibindo o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA), sendo assim o principal inibidor da fibrinólise. Esse mecanismo de inibição evita a ativação do plasminogênio, desta maneira a plasmina não é formada e a rede de fibrina não é destruída.

A concentração elevada de PAI-1 no plasma foi associada à função fibrinolítica deficiente, deste modo levando a uma hipofibrinólise que prolonga o tempo de permanência do coágulo de fibrina no organismo, podendo aumentar o risco de eventos aterotrombóticos. As concentrações elevadas de PAI-1 são encontradas no infarto agudo do miocárdio, síndrome coronariana aguda, TVP e na gravidez normal (Huber, 2001; Hidalgo *et al.*, 2010; Meltzer *et al.*, 2010).

O gene *SERPINE1*, o qual codifica o PAI-1 está localizado no cromossomo 7 e possui nove exons e oito introns (Kohler e Grant, 2000). O polimorfismo de inserção/exclusão de um nucleotídeo (guanina) na região promotora do gene *SERPINE1*, comumente conhecido como PAI-1 4G/5G, foi identificada na posição de 675 pares de bases antes do início da transcrição e está associada com o aumento da atividade de PAI-1 (Nauck, Wieland e März, 1999). Ambos os alelos (4G e 5G) estão ligados a um ativador de transcrição, sendo que no alelo 4G ocorre apenas a ligação do ativador transcricional. Enquanto que no alelo 5G além da ligação com o ativador transcricional, também ocorre a ligação de uma proteína transcricional repressora. Desta forma quando o indivíduo possui apenas o alelo 4G tem-se ausência do repressor ligado e o nível basal de transcrição de PAI-1 está aumentado (**Figura 5**) (Kohler e Grant, 2000; Hoekstra *et al.*, 2004; Solá *et al.*, 2008). Indivíduos com o genótipo 4G/4G possuem aumento das concentrações plasmáticas de PAI-1 em até 25%, em relação a indivíduos com o genótipo 5G/5G. Já os indivíduos heterozigotos (4G/5G) possuem concentrações intermediárias (Eriksson *et al.*, 1995; Rallidis *et al.*, 2010).

A prevalência desse polimorfismo na população brasileira é variável, o homozigoto 4G/4G é encontrado em cerca de 24,3 a 46,3% dos indivíduos saudáveis, sendo que a frequência do alelo 4G varia de 41,2 a 62,5% (De Paula Sabino *et al.*, 2011; Gonçalves-Filho *et al.*, 2011). Maior frequência do alelo mutado (53%) foi encontrada em holandeses, e o genótipo 4G/4G estava presente em 28% da população (Dijkstra *et al.*, 2011).

Recentemente, o genótipo 4G/4G foi associado ao aumento significativo no risco de câncer endometrial (SU et al, 2011). Bem como, o alelo 4G foi encontrado em maior frequência em indivíduos com TVP do que em controles, embora haja divergência na sobre esse dado na literatura (Sartori *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Coulam *et al.*, 2008; Akhter *et al.*, 2010).

Alguns estudos mostraram associação entre o polimorfismo *SERPINE1* 4G/5G com o aborto, entretanto os resultados descritos na literatura são divergentes (Guan *et al.*, 2005; Coulam *et al.*, 2008; Al Sallout e Sharif, 2010; Lambrinoudaki *et al.*, 2010). Mulheres indianas com perdas fetais apresentam maior frequência do alelo 4G (40,0%) e do genótipo homozigoto 4G/4G (20,1%) do que mulheres saudáveis (9 e 30%, respectivamente) (Ghosh, Shetty e Vora, 2009).

Figura 5: Estrutura do gene do PAI-1 e o sítio do polimorfismo 4G/5G na região promotora. Adaptado de Kohler e Grant, 2000.

Polimorfismo no gene TAFI (*CPB2* c.505 G>A)

O inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), também conhecido como carboxipeptidase U e carboxipeptidase B2, é uma glicoproteína sintetizada pelo fígado e pelos megacariócitos, a qual é convertida por meio de clivagem em sua forma ativa (TAFIa). A trombina sozinha ou na forma do complexo trombina/trombomodulina é o principal ativador fisiológico do TAFI (Leurs e Hendriks, 2005; Boffa e Koschinsky, 2007; Acosta-Tejeda *et al.*, 2011;

Heylen, Willemse e Hendriks, 2011; Legnani *et al.*, 2012). Outra protease que também apresenta a propriedade de ativar o TAFI é a plasmina (Vercauteren *et al.*, 2012). O TAFIa atua no sistema fibrinolítico atenuando a lise do coágulo de fibrina, uma vez que ele remove os resíduos de lisina nos coágulos de fibrina parcialmente digeridos, restringindo a ligação do t-PA e a ligação adicional do plasminogênio (Cagliani *et al.*, 2010). Como já dito anteriormente, para que haja a ativação do TAFI é importante que ocorra a formação do complexo trombina/trombomodulina, então observa-se que o TAFI de certa forma é um ponto de ligação entre o mecanismo de coagulação e o de fibrinólise (Bouma e Mosnier, 2003; Colucci e Semeraro, 2012).

No sangue o TAFI é encontrado em sua grande parte no plasma sanguíneo, enquanto que uma pequena parte (menos que 0,1%) é encontrado nos grânulos alfa das plaquetas, sendo o mesmo liberado após a ativação plaquetária (Mosnier *et al.*, 2003; Schadinger *et al.*, 2010)

Estudos recentes sugerem que o aumento da concentração de TAFI pode estar associado com o aumento do risco de TVE, bem como o aumento do risco de sua recorrência (Eichinger *et al.*, 2004; Boffa e Koschinsky, 2007). Em portadores do FVL, o aumento das concentrações de TAFI, juntamente com o aumento das concentrações de fator VIII são um fator de risco para TVE (Libourel *et al.*, 2002).

O gene que codifica o TAFI é conhecido pelo nome de *CPB2* e está localizado no cromossomo 13q14.11, apresentando 11 exons distribuídos por 48 Kb (Cagliani *et al.*, 2010). Vários polimorfismos neste gene foram identificados, sendo relatado que os mesmos estão associados com alterações nas concentrações plasmáticas de TAFI, podendo desta forma aumentar o risco de trombose venosa (Franco *et al.*, 2001; Boffa e Koschinsky, 2007; Colucci e Semeraro, 2012).

Acreditasse que a variabilidade interindividual das concentrações de TAFI antígeno são determinadas geneticamente, uma vez que características de estilo de vida parecem quase não influenciar nas concentrações plasmáticas de TAFI antígeno (Vanhoof *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 2001; Masini *et al.*, 2009).

O polimorfismo *CPB2* c.505 G>A consiste em uma substituição do nucleotídeo 505 na sequência de cDNA, o qual acarreta na substituição de uma

alanina por uma treonina no aminoácido 147. Este polimorfismo está localizado na região codificadora do gene (Henry *et al.*, 2001), estando o alelo G associado com baixas concentrações de TAFI antígeno (Lisman *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 2006).

A frequência alélica do polimorfismo *CPB2* c.505 G>A é variável, sendo o alelo mutado (A) encontrado em 33% dos holandeses saudáveis, 28,9% dos holandeses com TVP (Martini *et al.*, 2006), 19,4% em mulheres italiana com AER e em 35,4% das mulheres italianas sem história de AER (Masini *et al.*, 2009).

Esse polimorfismo não foi associado a pré-eclâmpsia (Acosta-Tejeda *et al.*, 2011), e também não foi associado ao risco de trombose em gestantes com síndrome antifosfolípide (Martinez-Zamora *et al.*, 2009).

1.3 Justificativa

Considerando a importância dos mecanismos hemostáticos na manutenção da gestação, e sabendo que grande número de AER não possui elucidação da causa, faz-se necessário a realização desse estudo, a fim de verificar se existe associação entre AER e diferentes polimorfismos relacionados a distúrbios na regulação da hemostasia (*FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *THBD* 1418C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *SERPINE1* 4G/5G e *CPB2* c.505G>A), uma vez que são escassos os estudos que avaliaram os outros polimorfismos genéticos além do FVL e polimorfismo no gene da protrombina.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar se existe associação entre os polimorfismos genéticos (no gene do fibrinogênio (*FGB* -455G>A e -148C>T), da trombomodulina (*THBD* 1418C>T), do fator V (*F5* 1691G>A), da protrombina (*F2* 20210 G>A), do PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G) e do TAFI (*CPB2* c.505G>A)) e os abortos espontâneo recorrentes.

2.1 Objetivos Específicos

- Determinar se os polimorfismos *FGB* -455G>A e -148C>T, *THBD* 1418C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *SERPINE1* 4G/5G e *CPB2* c.505G>A estão associados ao aborto primário e secundário;
- Verificar se existe relação entre os sete polimorfismos genéticos e o período em que ocorreram as perdas fetais em mulheres com aborto espontâneo recorrente primário e secundário;
- Analisar a possível relação entre os sete polimorfismos e o número de perdas gestacionais em mulheres com aborto primário e secundário;
- Elucidar a possível associação entre os haplótipos dos polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T em mulheres com aborto espontâneo recorrente primário e secundário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram incluídas 257 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 (grupo estudo). Essas mulheres foram classificadas em dois grupos: aborto primário e aborto secundário. Foram incluídas no grupo de aborto primário aquelas mulheres que tiveram 3 ou mais AER e nenhum feto viável; e no grupo de aborto secundário, as mulheres com 3 ou mais AER e pelo menos um feto viável. Essas mulheres foram avaliadas no Ambulatório de Obstetrícia da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina. Também foram estudadas 264 mulheres férteis saudáveis usuárias do serviço de saúde pública (Centro de Saúde Escola Butantã e Centro de Saúde do Rio Pequeno), funcionárias da (USP), e mulheres provenientes da comunidade (amigas de mulheres com história de AER) que tiveram pelo menos duas gestações normais (de termo), sem perdas gestacionais, história de trombose, diabetes, hipertensão, câncer e alterações autoimunes. É importante salientar que ambos os casos e controles foram coletados da mesma região metropolitana de São Paulo, sendo os controles recrutados no mesmo SSP onde os casos foram inicialmente vistos.

Foi aplicado um questionário para cada mulher contendo as seguintes informações: idade, cor da pele autodeclarada, antecedentes obstétricos, uso de medicamentos, uso de bebidas alcoólicas e fumo e presença de algumas patologias (hipertensão arterial, hiper ou hipotireoidismo e diabetes *mellitus*) (Anexo 1).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

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

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

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

3.3 Aspectos Éticos

Todas as mulheres foram informadas sobre os objetivos do projeto e consultadas sobre a vontade de participar da pesquisa. Sendo favoráveis, as mulheres assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que se encontra em **anexo 2**. Este projeto de pesquisa possui aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Secretaria Municipal de Saúde e do CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em **anexo 3**.

3.4 Avaliação Antropométrica

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

3.5 Amostras Biológicas

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue, uma única vez, de cada paciente por punção venosa em jejum. A coleta foi realizada por profissionais da saúde treinados e foram utilizados materiais descartáveis. Quatro tubos a vácuo BD Vacutainer System® com anticoagulante K₃EDTA (0,15mg/mL, Becton Dickison, USA) para a extração de DNA para análises dos polimorfismos.

3.6 Metodologia Laboratorial

3.6.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total utilizando o protocolo do *QIAamp® DNA BLOOD MINI* kit (PreAnaytix/Qiagen, Germany).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (ácido bórico 90mM, EDTA 2M, pH 8,0; Tris-HCL a 90mM) em cuba de eletroforese horizontal submersa (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA), aplicando-se 4µL de DNA, 1µL de tampão de amostra de DNA (glicerol a 30% e azul de bromofenol a 0,25%) e GelRed (Biotium Inc, Hayward, CA, USA) usado como corante fluorescente de ácidos nucleicos (Sambrook e Russel, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100V, 60mA por 30 min, utilizando fonte EPS 301 ou EPS 601 (Amersham-Pharmacia biotech, Uppsala, Suécia). A visualização das bandas eletroforéticas formadas foi realizada sob luz ultravioleta (UV), utilizando como referência um marcador de tamanho molecular de DNA de 100pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) (Sambrook e Russel, 2001). A foto documentação do gel foi realizada pelo sistema de captura de imagem GelCapture, parte integrante do sistema de digitalização de imagens MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Jerusalem, Israel).

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

3.6.2 Análise dos polimorfismos

A escolha dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foi feita a partir do banco de dados público dbSNP do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), o qual está disponível no endereço eletrônico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foi utilizado como critério de seleção polimorfismos que afetam genes relacionados à hemostasia e que previamente tenham sido associados a eventos trombóticos, além do fato desses polimorfismos apresentarem a frequência do alelo raro, maior que 10%. Vale ressaltar, que se fez a inclusão dos polimorfismos *F5* 1691G>A e *F2*

20210G>A, os quais apresentam uma frequência do alelo raro menor do que a citada acima, devido ao fato desses dois polimorfismos serem amplamente estudados em mulheres com história de AER.

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

Como controle de qualidade, a leitura dos genótipos de cada polimorfismo foi sempre realizada por dois observadores. Em cada eletroforese realizada e PCR – *Real Time* eram colocadas amostras com genótipo conhecido. Para os polimorfismos *F5* 1691G>A e *F2* 20210 G>A foram cedidas amostras controles (com genótipos conhecidos) pelo Hospital das Clínicas e pelo Laboratório de Hematologia da UNIFESP. Cerca de 15% de todas as genotipagens foram repetidas e algumas amostras foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

3.6.2.1 Análise do polimorfismo *F5* 1691G>A (rs6025)

A genotipagem do polimorfismo *F5* 1691G>A foi feita por PCR-RFLP, utilizando os iniciadores descritos por Andrade et al., 1998. O tamanho do fragmento amplificado foi de 220 pb (**Tabela 5**), utilizando para o ensaio da PCR com volume final de 50µL: 0,5 µL de cada iniciador, 5µL de tampão específico da enzima (New England BioLabs Inc.), 1µL de Taq Polimerase (New England BioLabs Inc.), 1µL de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 2µL de DNA na concentração de 20ng/µL em volume final de 50µL completado com água ultrapura autoclavada.

O programa de amplificação utilizado foi de desnaturação inicial à 96° por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 95° por 1 minuto (min), hibridação à 54,2° durante 1 min e extensão final à 72° por 1 min) e extensão final à 72° por 7 min.

O produto da PCR de 220 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando um marcador molecular de 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) como referência para confirmar o tamanho do fragmento. Após a confirmação da amplificação 10 µL do produto da PCR foram incubado a 37° com 2 µL de tampão, 0,2 µL de BSA (New England BioLabs Inc.), 0,5 µL da enzima de restrição enzimática MnlI (New

England BioLabs Inc.), e completado com água para volume final de 20 µL por 3 horas. Após a restrição enzimática os fragmentos digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba de eletroforese submersa em TBE 0,5x (Tris-HCL a 45mM, ácido bórico a 45mM e EDTA a 1mM), aplicando o produto de restrição enzimática juntamente com o tampão de amostra de DNA (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 0,30%) e GelRed (Biotium Inc, Hayward, CA, USA) utilizado como corante fluorescente de ácidos nucleicos. As condições para migração eletroforética foram as seguintes: 100V, 60mA por 1 hora, afim de confirmar o tamanho de cada fragmento, um marcador de tamanho molecular de 50 pb (Promega Corporation, Madison, EUA). Após a migração os fragmentos de DNA foram visualizados e fotodocumentados sob luz UV utilizando o aparelho MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Jerusalem, Israel).

O genótipo GG homozigoto ancestral (GG) apresenta fragmentos de 116 pb e 67 pb; o genótipo homozigoto mutado (AA) apresenta fragmento de 153 pb e 67 pb; por fim o genótipo heterozigoto (GA) apresenta fragmentos de 153 pb, 116 pb e 67 pb, conforme demonstrado nas **Figuras 6 e 7**.

Na **Tabela 4** estão apresentadas as sequências dos *primers* e as condições de PCR para os polimorfismos (*F5* 1691G>A, *F2* 20210 G>A e *SERPINE1* 4G/5G).

Tabela 4. Sequência dos *primers* e condições da PCR

SNP	Sequências	Tempo de hibridização	Tamanho	Enzima de restrição
<i>F5</i> (rs6025)	5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGAC CA-3' 5'- CTTGAAGGAAATGCCCCAT TA -3'	54,2 °C	220pb	<i>MnII</i>
<i>FII</i> (rs1799963)	5'-AAGGGAAACGAGGGGATGC CTGTGAAG-GTGACAGT-3' 5'-GAGCTGCCCATGAATACGA CTGG G AGC-ATTGAAGC-3'	67,5 °C	479pb	<i>HindIII</i>
<i>SERPINE1</i> (rs1799889)	5'-GCCCTCAGGGGCACAGAG AGAGTCTG-GCCA-3' 5'-AGGGCAATGCAGCCAGCCA GC TG-3'	67,5 °C	163pb	<i>BseLI</i>

Figura 6: Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *F5* 1691G>A.

Figura 7: Eletroforese em gel agarose 2% dos produtos de PCR digeridos pela enzima de restrição *MnII* do polimorfismo *F5* 1691G>A, utilizando GelRed como corante fluorescente de ácidos nucleicos.

Genótipos: 1= GA; 2, 3,4, 5, 6 e 7=GG; *marcador de tamanho de DNA de 50 pares de bases.

3.6.2.2 Análise do polimorfismo *F2* 20210G>A (rs1799963)

A técnica da PCR-RFLP para o polimorfismo *F2* 20210G>A, foi padronizada previamente em nosso laboratório. As sequências de *primer* utilizadas, assim como as condições de PCR para amplificação encontram-se na **tabela 4**.

Para o ensaio da PCR foi utilizado volume final de 50µL contendo 0,5 µL de cada *primer*, 5µL de tampão específico da enzima (New England BioLabs Inc.), 1µL de Taq Polimerase, 1µL de dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados), 2µL de DNA na concentração de 20ng em volume final de 50µL completado com água ultrapura auto clavada.

A restrição enzimática foi feita utilizando a enzima *HindIII* (New England BioLabs Inc.). O tamanho do fragmento amplificado foi de 479 pb (**Tabela 4**). O programa de amplificação utilizado foi de desnaturação inicial à 96° por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 95° por 1 minuto (min), hibridação à 67,5° durante 1 min e extensão final à 72° por 1 min) e extensão final à 72° por 7 min. O produto da PCR de 479 pb foi analisado em gel de agarose a 1% utilizando um marcador molecular de 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) como referência para confirmar o tamanho do fragmento. Após a confirmação da amplificação 10 µL do produto de PCR foi incubado a 37° com 2 µL de tampão, 0,5 µL de *HindIII* e completado com água para volume final de 20 µL por 3 horas. Após a restrição enzimática, a identificação dos fragmentos foi realizada em gel de poliacrilamida 5% submerso em tampão TBE 1x (Tris-EDTA-Borato). Para observar o tamanho dos fragmentos no gel, o mesmo foi corado utilizando a técnica de coloração com nitrato de prata (AgNO₃) e a foto documentação foi realizada por fotografia em luz branca utilizando o aparelho MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Jerusalem, Israel). O alelo ancestral G gera o fragmento de 420pb e 59pb, já o alelo mutado A apresenta um fragmento de 384pb e 59pb conforme demonstrado nas **Figura 8 e 9**.

Figura 8: Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo 20210G>A no gene *F2*.

Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, dos produtos de restrição enzimática (Enzima *Hind*III) para o polimorfismo *F2* 20210G>A, utilizando impregnação com nitrato de prata.

As amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 apresentam o genótipo GG; as amostras 9 e 13 apresentam, genótipo GA; *marcador de tamanho de DNA de 50 pares de bases.

3.6.2.3 Análise do polimorfismo *FGB* -148C>T (rs1800787) e *FGB* -455 G>A (rs1800790)

Os genótipos do polimorfismo *FGB* -148C>T foram obtidos por PCR em tempo real utilizando o ensaio C_7429789_10 da *Applied Biosystem* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Já o polimorfismo -455 G>A foi obtido por PCR em tempo real utilizando o ensaio C_7429790_20 da *Applied Biosystem* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). O sistema de amplificação utilizado foi o Taqman® SNP Genotyping Assay (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

O programa de PCR em tempo real para ambos os polimorfismo foi constituído de: (1) *pré-read* de 1 min por 60°C; *amplification* um ciclo de 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Os dados foram analisado utilizando o *software 7500 software v2.0.5* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

Todos os ensaios de PCR foram realizados com volume final de 10 µL, contendo 5 µL de TaqMan® Genotyping Master Mix (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), 0,5 µL de ensaio, 0,5 µL de DNA á 20 ng e 4,0 µL de água ultra pura autoclavada.

A quantidade de DNA e de reagentes utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma “placa teste”, realizada previamente as genotipagens.

3.6.2.4 Análise do polimorfismo *THBM* 1418C>T (rs1042579)

Os genótipos do polimorfismo *THBM* 1418C>T foram obtidos por PCR em tempo real utilizando o ensaio C__2531431_10 da *Applied Biosystem* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*).

O programa de PCR em tempo real foi constituído de: (1) *pré-read* de 1 min por 60°C; *amplification* um ciclo de 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan® foram detectados pelo equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems,*

Foster City, CA, USA). Os dados foram analisado utilizando o *software 7500 software v2.0.5* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os ensaios de PCR foram realizados com volume final de 10 µL, contendo 5 µL de TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,5 µL de ensaio, 0,5 µL de DNA á 20 ng e 4,0 µL de água ultra pura autoclavada.

3.6.2.5 Análise do polimorfismo *SERPINE1* 4G/5G (rs1799889)

Para a determinação desse polimorfismo os iniciadores e as condições de reação para o PCR foram descritos por Doggen et al., 1999. O produto de PCR (163 pb) foi submetido à digestão com a enzima de restrição BseLI (Fermentas, Life Sciences) (**Tabela 4**). O programa de amplificação utilizado foi de desnaturação inicial à 96° por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação à 95° por 1 minuto (min), hibridação à 67,5° durante 1 min e extensão final à 72° por 1 min) e extensão final à 72° por 7 min. O produto de PCR de 163 pb foi analisado em gel de agarose a 1% utilizando um marcador molecular de 100 pb (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) como referência para confirmar o tamanho do fragmento. Após realizada a amplificação, o produto de PCR recebeu um choque térmico (10 min no banho a temperatura de 70° seguido de 5 min em gelo). Após esse procedimento 10 µL do produto de PCR foi incubado a 37° com 2 µL de tampão, 0,5 µL de BseLI e completado com água para volume final de 20 µL por 5 horas. Após a restrição enzimática, a identificação dos fragmentos foi realizada em gel de poliacrilamida 9% submerso em tampão TBE 1x (Tris-EDTA-Borato). O alelo 4G foi representado por fragmentos de 107 pb e 56 pb, e o alelo 5G foi representado por fragmentos de 74 pb, 56 pb e 34 pb. O fragmento de 56 pb é resultante de um sítio constitutivo para a enzima utilizada, estando presente nos 3 genótipos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 9%, corados com nitrato de prata (AgNO₃) e identificados por um padrão de peso molecular de DNA de 50 pb, a fotodocumentação foi realizada por fotografia em luz branca utilizando o aparelho MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd, Jerusalem, Israel). Os indivíduos foram classificados de acordo com o genótipo: 4G/4G, 4G/5G e 5G/5G (**Figuras 10 e 11**).

Figura 10: Representação dos tamanhos dos fragmentos obtidos na PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo 4G/5G no gene *SERPINE1*.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida 9%, dos produtos de restrição enzimática (Enzima BseLI) para o polimorfismo *SERPINE1* 4G/5G, utilizando impregnação com nitrato de prata.

As amostras 1, 3, 4, 9, 13, 17 apresentam o genótipo 4G/5G; as amostras 2, 6, 7, 8, 11, 12, 16, 18 apresentam o genótipo 5G/5G e as amostras 5, 10 e 14 apresentam o genótipo 4G/4G. Amostra 15 apenas produto de PCR *marcador de tamanho de DNA de 50 pares de bases.

Nota: Os “borrões” apresentados na figura são procedentes da enzima utilizada, a qual deixa esse “borrão” característico no gel.

3.6.2.6 Análise do polimorfismo *CPB2* c.505 G>A (rs3742264)

Os genótipos do polimorfismo c.505G>A foram obtidos por PCR em tempo real utilizando o ensaio C__1872266_20 da Applied Biosystem (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O sistema de amplificação utilizado foi o *Taqman*[®] *SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O programa de PCR em tempo real para o polimorfismo foi constituído de: (1) *pré-read* de 1 min por 60°C; *amplification* um ciclo de 10 min a 95°C; 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas *TaqMan* foram detectados pelo equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os dados foram analisado utilizando o *software 7500 software v2.0.5* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Todos os ensaios de PCR foram realizados com volume final de 10 µL, contendo 5 µL de *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0,5 µL de ensaio, 0,5 µL de DNA á 20 ng e 4,0 µL de água ultra pura autoclavada.

A quantidade de DNA e de reagentes utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma “placa teste”, realizada previamente as genotipagens.

3.7 Análises Estatísticas

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

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

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

A frequência dos haplótipos e coeficiente de desequilíbrio padronizado (D') para os pares de desequilíbrio de ligação foram avaliados pelo algoritmo

de maximização de expectativa (EM), utilizando o *software* haploview e considerando desequilíbrio de ligação quando o $D' \geq 0,50$.

A regressão logística foi utilizada para calcular o *odds ratio* de ter aborto utilizando-se dois modelos: 1- a variável dependente é ter aborto primário; 2- a variável dependente é ter aborto secundário. As variáveis independentes incluídas foram os genótipos para os polimorfismos nos genes *FGB*, *F5*, *F2*, *THBD*, *SERPINE1* e *CBP2*.

O teste de qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para analisar as frequências dos genótipos dos polimorfismos entre os grupos.

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

4. RESULTADOS

4.1 Características gerais das mulheres participantes do estudo

Ao todo participaram do presente estudo 520 mulheres sendo deste total 256 com AER (grupo estudo) e 264 saudáveis (grupo controle), cujas descrições das suas características encontram-se na **Tabela 5**. As mulheres do grupo estudo foram classificadas em dois grupos conforme a sua história reprodutiva, sendo 117 mulheres com aborto primário e 139 mulheres com aborto secundário.

Com relação à cor de pele autodeclarada pelas mulheres houve diferença significativa entre os grupos ($p= 0,022$). No grupo controle houve maior frequência de mulheres autodeclaradas brancas, enquanto que nas mulheres com história de AER houve um predomínio de mulheres negras e pardas (**Tabela 5**).

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

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

Tabela 5. Características gerais das mulheres dos grupos aborto primário, aborto secundário e grupo controle, São Paulo, 2008 - 2011

	Grupos			P valor
	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Controle n= 264	
Idade ^a	32,3 (31,1 – 33,4)	34,2 (33,2 – 35,2)	33,4 (32,7 – 34,1)	0,028**
Grupos segundo o IMC (kg/m ²) ^b				
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)	
Cor da pele ^b				
Branca	52 (44,4)	56 (40,3)	144 (54,5)	0,022*
Negra	25 (21,4)	25 (18,0)	35 (13,3)	
Parda	39 (33,3)	57 (41,0)	80 (30,3)	
Amarela	1 (0,9)	0 (0,0)	5 (1,9)	
Índia	0 (0,0)	1 (0,7)	0 (0)	
Tabagista ^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**
Frequência do uso de álcool				
Menos que uma vez na semana	31 (56,4)	37 (63,8)	42 (44,2)	0,070*
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	

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

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

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

Tabela 6. História reprodutiva das mulheres com AER, 2008 – 2011

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

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

4.2 Avaliação entre os genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos após a exclusão de causas conhecidas

Dentre as mulheres com AER, 75 (29,2%) mulheres, sendo 35 mulheres com aborto primário e 40 mulheres com aborto secundário, já tinham pelo menos um fator de risco relacionado aos episódios de aborto. Foi considerado como fator de risco: malformações uterinas, alteração do cariótipo da mulher e/ou alteração do cariótipo do parceiro. Sabendo disso, inicialmente essas mulheres foram excluídas da análise estatística para verificar se o grupo de mulheres com AER (sem nenhum fator de risco associado) obtinham frequências dos genótipos e alelos diferentes do grupo com AER com pelo menos um fator de risco associado e mulheres controles. Entre os grupos não houve diferença nas frequências dos genótipos e alelos entre todos os polimorfismos estudados ($p > 0,05$), **Tabelas 7 e 8**. Deste modo optou-se por manter o grupo estudo incluindo todas as mulheres com AER, uma vez que o AER possui origem multifatorial e muitas vezes é necessário a presença de mais de um fator de risco, para que haja a perda gestacional.

A partir desse momento, todas as análises estatísticas foram realizadas com a inclusão de todas as mulheres participantes do estudo, sendo elas com ou sem causa conhecida.

Tabela 7. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A e *F2* 20210G>A, após exclusão de causas conhecidas para perdas recorrentes em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e no grupo controle, São Paulo, 2008 - 2011

Polimorfismo	Grupos			P valor
	Aborto primário n= 82	Aborto secundário n= 99	Controle n= 264	
<i>FGB -455G>A</i>				
GG	63 (76,8)	73 (73,7)	205 (77,7)	0,762*
GA	18 (22,0)	22 (22,2)	52 (19,7)	
AA	1 (1,2)	4 (4,0)	7 (2,7)	
Frequência alélica				
Alelo G	144 (87,8)	168 (84,8)	462 (87,5)	0,601
Alelo A	20 (12,2)	30 (15,2)	66 (12,5)	
<i>FGB -148C>T</i>				
CC	59 (72,0)	71 (71,7)	199 (75,4)	0,917*
CT	20 (24,4)	24 (24,2)	58 (22,0)	
TT	3 (3,7)	4 (4,0)	7 (2,7)	
Frequência alélica				
Alelo C	138 (84,1)	166 (83,8)	456 (86,4)	0,611
Alelo T	26 (15,9)	32 (16,2)	72 (13,6)	
<i>F5 1691G>A</i>				
GG	80 (97,6)	96 (97,0)	255 (96,6)	0,901*
GA	2 (2,4)	3 (3,0)	9 (3,4)	
Frequência alélica				
Alelo G	162 (98,8)	195 (98,5)	519 (98,3)	0,907
Alelo A	2 (1,2)	3 (1,5)	9 (1,7)	
<i>F2 20210G>A</i>				
GG	80 (97,6)	93 (93,9)	258 (97,7)	0,217*
GA	2 (2,4)	6 (6,1)	6 (2,3)	
Frequência alélica				
Alelo G	162 (98,8)	192 (97,0)	522 (98,9)	0,174
Alelo A	2 (1,2)	6 (3,0)	6 (1,1)	

Causas conhecidas: Alteração no cariótipo da mãe e/ou parceiro e presença de malformações uterinas;
Os dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). Teste Qui-quadrado, * Teste *LikelihoodRatio*. ** Teste Exato de Fisher

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos três grupos;

Comparação dos genótipos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *FGB* -455G>A p=0,671*; *FGB* -148C>T p= 0,792*; *F5* 1691G>A p= 1,000**;
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *FGB* -455G>A p=0,671*; *FGB* -148C>T p= 0,696*; *F5* 1691G>A p= 1,000**;

Comparação dos alelos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *FGB* -455G>A p=1,000**;
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *FGB* -455G>A p=0,389**;

Tabela 8. Frequência de genótipos e de alelos para os polimorfismos *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505G>A, após exclusão de causas conhecidas, para perdas recorrentes em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e no grupo controle, São Paulo, 2008 - 2011

Polimorfismo	Grupos			P valor
	Aborto primário n= 82	Aborto secundário n= 99	Controle n= 264	
THBD 1418C>T				
CC	61 (74,4)	72 (72,7)	204 (77,3)	0,619*
CT	20 (24,4)	25 (25,3)	59 (22,3)	
TT	1 (1,2)	2 (2,0)	1 (0,4)	
Frequência alélica				
Alelo C	142 (86,6)	169 (85,3)	467 (88,5)	0,502
Alelo T	22 (13,4)	29 (14,7)	61 (11,5)	
SERPINE1 4G/5G[#]				
4G4G	16 (19,8)	13 (13,1)	37 (14,1)	0,499
4G5G	36 (44,4)	50 (50,5)	115 (43,7)	
5G5G	29 (35,8)	36 (36,4)	111 (42,2)	
Frequência alélica				
Alelo 4G	68 (42,0)	76 (38,4)	189 (35,93)	0,368
Alelo 5G	94 (58,0)	122 (61,6)	337 (64,07)	
CBP2 c.505 G>A				
GG	41 (50,0)	38 (38,4)	110 (41,7)	0,504
GA	35 (42,7)	48 (48,5)	125 (47,3)	
AA	6 (7,3)	13 (13,1)	29 (11,0)	
Frequência alélica				
Alelo G	117 (71,3)	124 (62,6)	345 (65,34)	0,205
Alelo A	47 (28,7)	74 (37,4)	183 (34,66)	

Causas conhecidas: Alteração no cariótipo da mãe e/ou parceiro e presença de malformações uterinas;

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

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos três grupos;

[#] Foi realizado a genotipagem de 518 amostras deste polimorfismo, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma do grupo aborto primário e outra do grupo controle.

Comparação dos genótipos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,661*; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,381; *CBP2* c.505 G>A p= 0,346
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,291*; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,503; *CBP2* c.505 G>A p= 0,780

Comparação dos alelos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,999**; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,164**; *CBP2* c.505 G>A p= 0,154**
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,260**; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,542**; *CBP2* c.505 G>A p= 0,496**

4.3 Frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos nos grupos aborto primário, aborto secundário e grupo controle.

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505G>A das participantes desse estudo pode ser observadas nas **Tabelas 9** e **10**. A distribuição dos genótipos de todos os polimorfismos estudados, estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p>0,05$).

A frequência dos genótipos, assim como a frequência dos alelos foi semelhante entre os grupos aborto primário, aborto secundário e grupo controle, **Tabelas 9** e **10** ($p>0,05$). Igualmente, quando foram comparados os genótipos e alelos dos três grupos, não se obteve diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 9. Frequências de genótipos e de alelos para os polimorfismos *FGB -455G>A*, *FGB -148C>T*, *F5 1691G>A* e *F2 20210G>A* em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e grupo controle, São Paulo, 2008 - 2011

Polimorfismo	Grupos			P valor
	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Controle n= 264	
<i>FGB -455G>A</i>				
GG	89 (76,1)	107 (77,0)	205 (77,7)	0,878*
GA	26 (22,2)	27 (19,4)	52 (19,7)	
AA	2 (1,7)	5 (3,6)	7 (2,7)	
Frequência alélica				
Alelo G	204 (87,2)	241 (86,7)	462 (87,5)	0,946
Alelo A	30 (12,8)	37 (13,3)	66 (12,5)	
<i>FGB -148C>T</i>				
CC	83 (70,9)	101 (72,7)	199 (75,4)	0,903*
CT	30 (25,6)	33 (23,7)	58 (22,0)	
TT	4 (3,4)	5 (3,6)	7 (2,7)	
Frequência alélica				
Alelo C	196 (83,8)	235 (84,5)	456 (86,4)	0,592
Alelo T	38 (16,2)	43 (15,5)	72 (13,6)	
<i>F5 1691G>A</i>				
GG	113 (96,6)	135 (97,1)	255 (96,6)	0,954*
GA	4 (3,4)	4 (2,9)	9 (3,4)	
Frequência alélica				
Alelo G	230 (98,3)	274 (98,6)	519 (98,3)	0,956
Alelo A	4 (1,7)	4 (1,4)	9 (1,7)	
<i>F2 20210G>A</i>				
GG	112 (95,7)	132 (95,0)	258 (97,7)	0,303*
GA	5 (4,3)	7 (5,0)	6 (2,3)	
Frequência alélica				
Alelo G	229 (97,9)	271 (97,5)	522 (98,9)	0,311
Alelo A	5 (2,1)	7 (2,5)	6 (1,1)	

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

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos dois grupos;

Comparação dos genótipos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *FGB -455G>A* p=0,741*; *FGB -148C>T* p= 0,656*; *F5 1691G>A* p= 1,00**; *F2 20210G>A* p= 0,324**
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *FGB -455G>A* p=0,872*; *FGB -148C>T* p= 0,786*; *F5 1691G>A* p= 1,00**; *F2 20210G>A* p= 0,148**

Comparação dos alelos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *FGB -455G>A* p=0,906**; *FGB -148C>T* p= 0,372**; *F5 1691G>A* p= 1,00**; *F2 20210G>A* p= 0,327**
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *FGB -455G>A* p=0,740**; *FGB -148C>T* p= 0,525**; *F5 1691G>A* p= 1,00**; *F2 20210G>A* p= 0,150**

Tabela 10. Frequências de genótipos e de alelos para os polimorfismos *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505G>A em mulheres do grupo aborto primário, aborto secundário e grupo controle, São Paulo, 2008 - 2011

Polimorfismo	Grupos			P valor
	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Controle n= 264	
THBD 1418C>T				
CC	88 (75,2)	106 (76,3)	204 (77,3)	0,714*
CT	27 (23,1)	31 (22,3)	59 (22,3)	
TT	2 (1,7)	2 (1,4)	1 (0,4)	
Frequência alélica				
Alelo C	203 (86,8)	243 (87,4)	467 (88,5)	0,785
Alelo T	31 (13,2)	35 (12,6)	61 (11,5)	
SERPINE1 4G/5G[#]				
4G4G	19 (16,4)	19 (13,7)	37 (14,1)	0,912
4G5G	51 (44,0)	66 (47,5)	115 (43,7)	
5G5G	46 (39,7)	54 (38,8)	111 (42,2)	
Frequência alélica				
Alelo 4G	89 (38,4)	104 (37,4)	189 (35,9)	0,496
Alelo 5G	183 (61,6)	174 (62,6)	337 (64,1)	
CBP2 c.505G>A				
GG	53 (45,3)	59 (42,4)	110 (41,7)	0,884
GA	54 (46,2)	63 (45,3)	125 (47,3)	
AA	10 (8,5)	17 (12,2)	29 (11,0)	
Frequência alélica				
Alelo G	160 (68,4)	181 (65,1)	345 (65,3)	0,674
Alelo A	74 (31,6)	97 (34,9)	183 (34,7)	

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

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos dois grupos.

[#] Foi realizado a genotipagem de 518 amostras deste polimorfismo, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma do grupo aborto primário e outra do grupo controle.

Comparação dos genótipos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,427*; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,811; *CBP2* c.505 G>A p= 0,689
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,523*; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,762; *CBP2* c.505 G>A p= 0,897

Comparação dos alelos entre grupos:

- 1- Aborto primário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,547**; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,389**; *CBP2* c.505 G>A p= 0,455**
- 2- Aborto secundário vs controle = Polimorfismos: *THBD* 1418C>T p=0,732**; *SERPINE1* 4G/5G p= 0,700**; *CBP2* c.505 G>A p= 1,000**

4.4 Avaliação do risco de ter AER conforme os genótipos e alelos

Na **Tabela 11**, foi realizada regressão logística univariada tendo como variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2). Nessa tabela foi observado o risco de ter o evento aborto seja ele primário ou secundário utilizando como variáveis independentes os polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505 G>A.

Os polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505 G>A, não foram associados ao maior risco de ter AER nos grupos de AER primário e secundário, **Tabela 11**.

Tabela 11- Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2) de acordo com a distribuição dos genótipos *FGB -455G>A* , *FGB -148C>T*, *F5 1691G>A*, *F2 20210G>A*, *THBD 1418C>T*, *SERPINE1 4G/5G* e *CBP2 c.505 G>A* como variáveis independentes.

Polimorfismo	Genótipo	Modelo 1		Modelo 2	
		OR (IC 95%)	P valor	OR (IC 95%)	P valor
<i>FGB -455G>A</i>	GG	1,00	-	1,00	-
	GA	1,52 (0,31 – 7,46)	0,606	0,73 (0,23 – 2,36)	0,600
	AA	1,75 (0,34 – 9,03)	0,504	0,73 (0,21 – 2,51)	0,614
<i>FGB -148C>T</i>	CC	1,00	-	1,00	-
	CT	0,73 (0,21 – 2,56)	0,623	0,71 (0,22 – 2,30)	0,568
	TT	0,91 (0,25 – 3,34)	0,881	0,80 (0,23 – 2,71)	0,716
<i>F5 1691G>A</i>	GG	1,00	-	1,00	-
	GA	1,00 (0,30 – 3,33)	0,996	0,84 (0,25 – 2,78)	0,774
<i>F2 20210G>A</i>	GG	1,00	-	1,00	-
	GA	1,92 (0,57 – 6,42)	0,290	2,28 (0,75 – 6,92)	0,146
<i>THBD 1418C>T</i>	CC	1,00	-	1,00	-
	CT	0,22 (0,02 – 2,41)	0,213	0,26 (0,02 – 2,90)	0,273
	TT	0,23 (0,02 – 2,63)	0,237	0,26 (0,02 – 3,01)	0,283
<i>SERPINE1 4G/5G[#]</i>	5G5G	1,00	-	1,00	-
	4G5G	1,24 (0,65 – 2,38)	0,519	1,06 (0,56 – 2,01)	0,869
	4G4G	1,07 (0,67 – 1,72)	0,780	1,18 (0,76 – 1,84)	0,466
<i>CBP2 c.505 G>A</i>	GG	1,00	-	1,00	-
	GA	1,40 (0,63 – 3,08)	0,407	0,92 (0,47 – 1,80)	0,797
	AA	1,25 (0,57 – 2,75)	0,574	0,86 (0,44 – 1,68)	0,659

Aborto primário incluiu 117 mulheres não gestantes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas até a 20ª semana de gestação sem ter tido um feto viável. Aborto secundário incluiu 139 mulheres não gestantes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas até a 20ª semana de gestação com pelo menos um feto viável. Grupo controle incluiu 264 mulheres férteis saudáveis não grávidas que tiveram pelo menos dois partos de termo e sem história de perdas fetais.

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%).

[#] Para este polimorfismo foi realizado a genotipagem de 518 amostras, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma no grupo controle e uma no grupo aborto primário.

4.5 Distribuição de genótipos e de alelos nos grupos formados segundo o período em que ocorreu a perda gestacional em mulheres com aborto primário e secundário

Nas **Tabelas 12 e 13** estão apresentadas as frequências dos genótipos e alelos para os polimorfismos *FGB -455G>A*, *FGB -148C>T*, *F5 1691G>A*, *F2 20210G>A*, *THBD 1418C>T*, *SERPINE1 4G/5G* e *CBP2 c.505G>A* quando o grupo de mulheres com AER primário e secundário foi separado conforme a idade das perdas gestacionais.

Não houve diferença significativa com relação à frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos *FGB -455G>A*, *FGB -148C>T*, *F5 1691G>A*, *F2 20210G>A*, quando as mulheres com AER primário foram separadas conforme a idade em que ocorreram as perdas ($p>0,05$), **Tabela 12**. Entretanto, quando analisadas as mulheres com AER secundário a frequência dos alelos do polimorfismo *FGB -455G>A* foi diferente, sendo que o alelo mutado foi menos frequente nas mulheres com perdas no segundo trimestre da gestação (8,5%) do que nas mulheres com perdas precoces (até a 12ª semana) (16,9%) ($p<0,05$), **Tabela 12**.

Houve tendência de maior frequência do genótipo homozigoto ancestral para o polimorfismo *THBD 1418C>T* nas mulheres com AER secundário que apresentavam perdas no segundo trimestre de gestação (84,7%), do que as mulheres que apresentavam perdas precoces (70,0%) ($p<0,062$), **Tabela 13**. Todavia, a frequência dos alelos para esse polimorfismo foi diferente entre os grupos, havendo menor frequência do alelo mutado no grupo de mulheres com AER secundário que apresentavam perdas tardias (7,6%), do que nas mulheres com perdas precoce (16,3%), ($p=0,043$), **Tabela 13**. Da mesma forma que a frequência da combinação de alelos utilizando um modelo de herança dominante, demonstrou menor frequência dos genótipos que continham o alelo mutado no grupo de mulheres com AER secundário que apresentavam perdas no segundo trimestre (15,3%), do que em mulheres com perdas precoces (30,0%), ($p=0,047$), (**Anexo 4, Tabela 8**).

Quanto ao polimorfismo *CBP2 c.505G>A*, houve tendência para maior frequência do alelo mutado em mulheres com AER secundário com perdas até a 12ª semana de gestação (39,4%), quando comparado as mulheres com perdas no segundo trimestre de gestação (28,8%) ($p<0,075$), **Tabela 13**.

Tabela 12. Frequências de genótipos e de alelos para *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A e *F2* 20210G>A, segundo o período em que ocorreu a perda nos grupos de AER primário e secundário, São Paulo, 2008 - 2012

Polimorfismo	AER primário			AER secundário		
	Perda ate 12 semanas	Perda entre 13 e 20 semanas	P valor	Perda ate 12 semanas	Perda entre 13 e 20 semanas	P valor
	n= 79	n= 38		n= 80	n= 59	
<i>FGB -455G>A</i>						
GG	61 (77,2)	28 (73,7)	0,836*	57 (71,3)	50 (84,7)	0,148*
GA	17 (21,5)	9 (23,7)		19 (23,8)	8 (13,6)	
AA	1 (1,3)	1 (2,6)		4 (5,0)	1 (1,7)	
Frequência alélica						
Alelo G	139 (87,9)	65 (85,5)	0,677**	133 (83,1)	108 (91,5)	0,049**
Alelo A	19 (12,1)	11 (14,5)		27 (16,9)	10 (8,5)	
<i>FGB -148C>T</i>						
CC	58 (73,4)	25 (65,8)	0,196*	55 (68,8)	46 (78,0)	0,362*
CT	20 (25,3)	10 (26,3)		21 (26,3)	12 (20,3)	
TT	1 (1,3)	3 (7,9)		4 (5,0)	1 (1,7)	
Frequência alélica						
Alelo C	136 (86,1)	60 (78,9)	0,187**	131 (81,9)	104 (88,18)	0,181**
Alelo T	22 (13,9)	16 (21,1)		29 (18,1)	14 (11,9)	
<i>F5 1691G>A</i>						
GG	76 (96,2)	37 (97,4)	1,000**	78 (97,5)	57 (96,6)	1,000**
GA	3 (3,8)	1 (2,6)		2 (2,5)	2 (3,4)	
Frequência alélica						
Alelo G	155 (98,1)	75 (98,7)	1,000**	158 (98,8)	116 (98,3)	1,000**
Alelo A	3 (1,9)	1 (1,3)		2 (1,2)	2 (1,7)	
<i>F2 20210G>A</i>						
GG	75 (94,9)	37 (97,4)	1,000**	78 (97,5)	54 (91,5)	0,134**
GA	4 (5,1)	1 (2,6)		2 (2,5)	5 (8,5)	
Frequência alélica						
Alelo G	154 (97,5)	75 (98,7)	1,000**	158 (98,8)	113 (95,8)	0,139**
Alelo A	4 (2,5)	1 (1,3)		2 (1,2)	5 (4,2)	

AER: aborto espontâneo recorrente. Os dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). Teste Qui-quadrado, * Teste *LikelihoodRatio*. ** Teste Exato de Fisher.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos grupos;

Tabela 13. Frequências de genótipos e de alelos para *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505 G>A, segundo o período em que ocorreu a perda nos grupos de AER primário e secundário, São Paulo, 2008 – 2012

Polimorfismo	AER primário		P valor	AER secundário		P valor
	Aborto ate 12 semanas n= 79	Aborto entre 13 e 20 semanas n= 38		Aborto ate 12 semanas n= 80	Aborto entre 13 e 20 semanas n= 59	
THBD 1418C>T						
CC	60 (75,9)	28 (73,7)	0,866*	56 (70,0)	50 (84,7)	0,062
CT	18 (22,8)	9 (23,7)		22 (27,5)	9 (15,3)	
TT	1 (1,3)	1 (2,6)		2 (2,5)	0 (0,0)	
Frequência alélica						
Alelo C	138 (87,3)	65 (85,5)	0,686**	134 (83,7)	109 (92,4)	0,043**
Alelo T	20 (12,7)	11 (14,5)		26 (16,3)	9 (7,6)	
SERPINE1 4G/5G[#]						
4G4G	16 (20,3)	3 (8,1)	0,257	8 (10,0)	11 (18,6)	0,229
4G5G	33 (41,8)	18 (48,6)		42 (52,5)	24 (40,7)	
5G5G	30 (38,0)	16 (43,2)		30 (37,5)	24 (40,7)	
Frequência alélica						
Alelo 4G	65 (41,1)	24 (32,4)	0,247**	58 (36,3)	46 (39,0)	0,707**
Alelo 5G	93 (58,9)	50 (67,6)		102 (63,7)	72 (61,0)	
CBP2 c.505 G>A						
GG	40 (50,6)	13 (34,2)	0,181*	31 (38,8)	28 (47,5)	0,083
GA	34 (43,0)	20 (52,6)		35 (43,8)	28 (47,5)	
AA	5 (6,3)	5 (13,2)		14 (17,5)	3 (5,1)	
Frequência alélica						
Alelo G	114 (72,2)	46 (60,5)	0,098**	97 (60,6)	84 (71,2)	0,075**
Alelo A	44 (27,8)	30 (39,5)		63 (39,4)	34 (28,8)	

AER: aborto espontâneo recorrente. Os dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). Teste Qui-quadrado, * Teste *LikelihoodRatio*. ** Teste Exato de Fisher.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos grupos. [#] Não foi possível obter o genótipo de uma amostra do grupo aborto primário.

4.6 Distribuição dos genótipos e alelos nos grupos formados segundo o número de perdas

Nas **Tabelas 14 e 15** estão apresentadas as frequências dos genótipos e alelos para os polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505G>A, quando o grupo de mulheres com AER primário e secundário foi separado conforme o número de perdas gestacionais.

Não houve diferença significativa entre a frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos estudados em mulheres com AER secundário, que tiveram três perdas gestacionais quando comparadas as mulheres com AER secundário que tiveram mais de três abortos ($p>0,05$), **Tabelas 14 e 15**.

Com relação ao grupo de mulheres com aborto primário não houve diferença significativa entre a frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos *FGB* -455G>A, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505G>A, em mulheres com AER primário que tiveram três perdas gestacionais quando comparadas as mulheres com AER secundário que tiveram mais de três abortos ($p>0,05$), **Tabelas 14 e 15**. Entretanto, houve tendência das mulheres com AER primário com até três perdas, apresentarem maior frequência do genótipo homozigoto mutado (6,3%) do que as mulheres com AER primário com mais de três perdas (0,0%) ($p=0,060$), **Tabela 14**.

Tabela 14. Frequências de genótipos e de alelos para os polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *F5* 1691G>A e *F2* 20210G>A segundo o número de perdas gestacionais, São Paulo, 2008 – 2011

Polimorfismo	AER primário		P valor	AER secundário		P valor
	Até 3 abortos n= 64	Mais que 3 abortos n= 53		Até 3 abortos n= 62	Mais que 3 abortos n= 77	
<i>FGB -455G>A</i>						
GG	49 (76,6)	40 (75,5)	0,266*	45 (72,6)	62 (80,5)	0,139*
GA	13 (20,3)	13 (24,5)		16 (25,8)	11 (14,3)	
AA	2 (3,1)	0 (0,0)		1 (1,6)	4 (5,2)	
Frequência alélica						
Alelo G	111 (86,7)	93 (87,7)	0,847**	106 (85,5)	135 (87,7)	0,600**
Alelo A	17 (13,3)	13 (12,3)		18 (14,5)	19 (12,3)	
<i>FGB -148C>T</i>						
CC	46 (71,9)	37 (69,8)	0,060*	45 (72,6)	56 (72,7)	0,464*
CT	14 (21,9)	16 (30,2)		16 (25,8)	17 (22,1)	
TT	4 (6,3)	0 (0,0)		1 (1,6)	4 (5,2)	
Frequência alélica						
Alelo C	106 (82,8)	90 (84,9)	0,724**	106 (85,5)	129 (83,8)	0,741**
Alelo T	22 (17,2)	16 (15,1)		18 (14,5)	25 (16,2)	
<i>F5 1691G>A</i>						
GG	60 (93,8)	53 (100,0)	0,125**	59 (95,2)	76 (98,7)	0,324**
GA	4 (6,3)	0 (0,0)		3 (4,8)	1 (1,3)	
Frequência alélica						
Alelo G	124 (96,9)	106 (100,0)	0,128**	121 (97,6)	153 (99,4)	0,327**
Alelo A	4 (3,1)	0 (0,0)		3 (2,4)	1 (0,6)	
<i>F2 20210G>A</i>						
GG	60 (93,8)	52 (98,1)	0,375**	60 (96,8)	72 (93,5)	0,461**
GA	4 (6,3)	1 (1,9)		2 (3,2)	5 (6,5)	
Frequência alélica						
Alelo G	124 (96,9)	105 (99,0)	0,381**	122 (98,4)	149 (96,8)	0,466**
Alelo A	4 (3,1)	1 (1,0)		2 (1,6)	5 (3,2)	

AER: aborto espontâneo recorrente. Os dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). Teste Qui-quadrado, * Teste *LikelihoodRatio*. ** Teste Exato de Fisher.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos grupos.

Tabela 15. Frequências de genótipos e de alelos para *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* c.505 G>A, segundo o número de perdas gestacionais, São Paulo, 2008 – 2011

Polimorfismo	AER primário		P valor	AER secundário		P valor
	Até 3 abortos n= 64	Mais que 3 abortos n= 53		Até 3 abortos n= 62	Mais que 3 abortos n= 77	
THBD 1418C>T						
CC	46 (71,9)	42 (79,2)	0,241*	48 (77,4)	58 (75,3)	0,936*
CT	16 (25,0)	11 (20,8)		13 (21,0)	18 (23,4)	
TT	2 (3,1)	0 (0,0)		1(1,6)	1 (1,3)	
Frequência alélica						
Alelo C	108 (84,4)	95 (89,6)	0,253**	109 (87,9)	134 (87,0)	0,858**
Alelo T	20 (15,6)	11 (10,4)		15 (12,1)	20 (13,0)	
SERPINE1 4G/5G[#]						
4G4G	14 (21,9)	5 (9,6)	0,134	6 (9,7)	13 (16,9)	0,450
4G5G	24 (37,5)	27 (51,9)		30 (48,4)	36 (46,8)	
5G5G	26 (40,6)	20 (38,5)		26 (41,9)	28 (36,4)	
Frequência alélica						
Alelo 4G	52 (40,6)	37 (35,6)	0,498**	42 (33,9)	62 (40,3)	0,319**
Alelo 5G	76 (59,4)	67 (64,4)		82 (66,1)	92 (59,7)	
CBP2 c.505 G>A						
GG	29 (45,3)	24 (45,3)	0,949*	24 (38,7)	35 (45,5)	0,610
GA	30 (46,9)	24 (45,3)		31 (50,0)	32 (41,6)	
AA	5 (7,8)	5 (9,4)		7 (11,3)	10 (13,0)	
Frequência alélica						
Alelo G	88 (68,8)	72 (67,9)	1,000**	79 (63,7)	102 (66,2)	0,705**
Alelo A	40 (31,2)	34 (32,1)		45 (36,3)	52 (33,8)	

AER: aborto espontâneo recorrente. Os dados das variáveis categóricas foram apresentados como número de participantes (porcentagem). Teste Qui-quadrado, * Teste *LikelihoodRatio*. ** Teste Exato de Fisher.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos grupos. [#] Não foi possível obter o genótipo de uma amostra do grupo aborto primário.

4.7 Análise de haplótipos para os polimorfismos -455G>A e -148C>T no gene *FGB*

Com o intuito de avaliar o efeito da combinação dos alelos dos polimorfismos no gene *FGB*, realizou-se a análise dos haplótipos através do programa computacional *Haploview* (Barrett et al., 2005; Barrett, 2009). O estudo do desequilíbrio de ligação foi realizado por meio do cálculo do coeficiente D' de Lewontin (Lewontin, 1964). Este cálculo demonstrou que os polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T encontram-se em “completo” desequilíbrio de ligação ($D'=1,0$), sendo que dos 4 possíveis haplótipos formados pela combinação dos 2 alelos, apenas 3 foram encontrados. Este dado foi observado tanto quando analisado as mulheres do grupo com aborto primário juntamente com as mulheres do grupo controle, bem como quando feita a análise das mulheres do grupo secundário com as mulheres do grupo controle, **Figura 12**. No que concerne ao coeficiente de correlação entre os dois loci (r^2) na análise do grupo aborto primário *versus* grupo controle o valor encontrado foi igual a 0,854, já na análise do grupo aborto secundário frente ao grupo controle o valor obtido foi de 0,880.

O haplótipo GT, o qual é formado pelo alelo ancestral do polimorfismo *FGB* -455G>A e do alelo mutado do polimorfismo *FGB* -148C>T, foi mais frequente nas mulheres com AER primário (3,4%) do que no grupo controle (1,1%) ($p=0,030$), **Tabela 16**. Entretanto, quando utilizado um modelo de regressão GLM (modelo linear generalizado) do programa haplo.stats, o haplótipo GT não foi associado ao maior risco de AER (OR: 2,78, 95% IC: 0,99 – 7,87, $p=0,055$).

Tabela 16. Frequências dos haplótipos para os polimorfismos -455G>A e -148C>T no gene *FGB* em mulheres do grupo controle e do grupo com AER. São Paulo, 2008 – 2011

				Frequência nos grupos		x ²	p
	Haplótipos	<i>FGB</i> -455G>A	<i>FGB</i> -148C>T	AER	Controle		
Aborto primário	a (tipo selvagem)	G	C	0,838	0,864	0,889	0,346
	B	A	T	0,128	0,125	0,015	0,902
	C	G	T	0,034	0,011	4,684	0,030
Aborto secundário	a (tipo selvagem)	G	C	0,857	0,864	0,499	0,480
	B	A	T	0,128	0,125	0,107	0,744
	C	G	T	0,015	0,011	1,297	0,255

AER: aborto espontâneo recorrente.

Figura 12: Análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados (*FGB* -455 G>A (rs1800790) e *FGB* -148 C>T (rs1800787)) em mulheres com AER primário e grupo controle 1A; e em mulheres com AER secundário e grupo controle 1B.

Nota: Figura gerada através do programa computacional *Haploview* versão 4.2.

4.8 Análise de regressão logística multivariada

Um modelo de regressão logística multivariada condicional para a variável dependente ter aborto primário (modelo 1) e ter aborto secundário (modelo 2) foi realizado incluindo como variáveis independentes os genótipos para os polimorfismos estudados. Os genótipos utilizados como referência para cada polimorfismo foram os seguintes: *F5* 1691G>A (referência GG vs GA), *F2* 20210G>A (referência GG vs GA), *CBP2* c.505G>A (referência GG + GA vs AA), *THBD* 1418C>T (referência CC + CT vs TT), *SERPINE1* 4G/5G (referência 5G/5G vs 4G/4G + 4G/5G) *FGB* -455G>A (referência GG vs GA e GG vs AA) e *FGB* -148C>T (referência CC vs CT e CC vs TT).

No modelo 1, o polimorfismo *FGB* -148C>T foi associado ao maior risco de ter aborto primário (OR: 2,91, IC 95% 1,02 – 8,29, $p=0,045$), **Tabela 17**. Já no modelo 2 nenhum dos polimorfismos foi associado ao risco de ter aborto secundário, **Tabela 17**.

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

Modelo	Variáveis independentes	OR	(95% IC)	P valor
1	<i>F5</i> 1691G>A	0,93	0,27 – 3,20	0,912
	<i>F2</i> 20210G>A	1,94	0,56 – 6,71	0,293
	<i>CBP2</i> c.505G>A	0,75	0,35 – 1,61	0,465
	<i>THBD</i> 1418C>T	1,13	0,67 – 1,90	0,643
	<i>SERPINE1</i> 4G/5G	1,13	0,72 – 1,78	0,589
	<i>FGB</i> -455G>A	0,34	0,11 – 1,04	0,059
	<i>FGB</i> -148C>T	2,91	1,02 – 8,29	0,045
2	<i>F5</i> 1691G>A	0,71	0,20 – 2,45	0,582
	<i>F2</i> 20210G>A	2,43	0,78 – 7,54	0,125
	<i>CBP2</i> c.505G>A	1,15	0,60 – 2,19	0,679
	<i>THBD</i> 1418C>T	1,07	0,65 – 1,75	0,791
	<i>SERPINE1</i> 4G/5G	1,12	0,74 – 1,72	0,589
	<i>FGB</i> -455G>A	0,54	0,16 – 1,80	0,316
	<i>FGB</i> -148C>T	1,95	0,61 – 6,25	0,263

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

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

OR: Odds ratio (IC 95%).

As variáveis independentes incluídas no modelo foram os genótipos para *F5* 1691G>A (referência GG vs GA), *F2* 20210G>A (referência GG vs GA), *CBP2* c.505G>A (referência GG + GA vs AA), *THBD* 1418C>T (referência CC + CT vs TT), *SERPINE1* 4G/5G (referência 5G/5G vs 4G/4G + 4G/5G), *FGB* -455G>A (referência GG vs GA e GG vs AA), *FGB* -148C>T (referência CC vs CT e CC vs TT).

5. DISCUSSÃO

Grande parcela das mulheres com AER tem sido beneficiada com os avanços da medicina, sendo que hoje já é possível identificar diversos fatores que estão relacionados ao AER, desde problemas anatômicos no útero até fatores genéticos (Berger *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2010). Apesar deste avanço e da redução do número de casos que permanecem sem elucidação de causa, cerca de 40 a 50% dessas mulheres são classificadas com AER idiopático (Lin, 1993; Stephenson, 1996; Lin, 2003; Allison e Schust, 2009; Altmäe *et al.*, 2011).

Dentre os fatores associados aos AER estão os polimorfismos em genes relacionados à hemostasia (Kovalevsky *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2012; Ozdemir *et al.*, 2012). Esses polimorfismos têm sido associados a eventos tromboembólicos como a TVP, trombose arterial e venosa, bem como a embolia pulmonar. Eles também exercem um importante papel nos AERs relacionados com complicações vasculares da placenta, como a excessiva trombose dos vasos placentários, o infarto placentário e a insuficiência uteroplacentária (Smith *et al.*, 2007; Rodger *et al.*, 2010; Dahm *et al.*, 2012; Sode *et al.*, 2013).

Embora vários estudos tenham avaliado os efeitos dos polimorfismos genéticos principalmente no fator V, protrombina e PAI-1 na etiologia do AER, são raros os estudos que se propuseram a avaliar o efeito de polimorfismos genéticos no gene da cadeia beta do fibrinogênio, no gene da trombomodulina e no gene do TAFI.

Na população brasileira, estes estudos são ainda mais escassos e necessários de serem realizados, pelo fato de que os resultados obtidos em estudos de associação em outros países e continentes podem não se aplicar a nossa população, uma vez que a mesma apresenta características únicas devido ao seu alto grau de miscigenação (Souza *et al.*, 1999; Pena *et al.*, 2009).

Nesse âmbito, o objetivo desse estudo foi avaliar a associação entre polimorfismos no gene do fibrinogênio (*FGB* -455G>A e -148C>T), trombomodulina (*THBD* 1418C>T), fator V (*F5* 1691G>A), protrombina (*F2*

20210 G>A), PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G) e TAFI (*CPB2* c.505G>A) e abortos espontâneo recorrentes.

No presente estudo foram incluídas mulheres com história de AER seja primário ou secundário. Essa classificação realizada com base na história reprodutiva da mulher é importante, uma vez que diminui a heterogeneidade da amostra, já que esses subtipos de AER provavelmente apresentam diferentes mecanismos fisiopatológicos que resultam nas perdas gestacionais (Rull, Nagirnaja e Laan, 2012). Entretanto, se faz necessário ressaltar que uma limitação dessa classificação é o fato de que uma ou mais mulheres incluídas nesse momento no grupo AER primário, podem ter no futuro um feto viável e desta forma passarem a fazer da parte do grupo AER secundário. Contudo, essa possibilidade existe em todos os estudos publicados até o momento na literatura.

A frequência de perdas consecutivas foi semelhante nos dois grupos de AER estudados, mostrando que quase ¼ das mulheres tiveram 5 ou mais perdas nos dois grupos.

Sabe-se que a etiologia do AER é multifatorial e que alguns fatores tais como alteração no cariótipo da mãe e/ou parceiro e presença de malformações uterinas podem estar associados às perdas recorrentes. No presente estudo, primeiramente foram excluídas as mulheres que apresentavam os fatores citados acima, e após, as análises estatísticas foram refeitas utilizando o grupo de mulheres sem excluir nenhuma delas, e foram observados os mesmos resultados. Considerando que a origem do AER é multifatorial e que muitas vezes é necessária a presença de mais de um fator de risco para que a mulher tenha o aborto, decidimos por apresentar os resultados do grupo total de AER.

Associação entre os polimorfismos genéticos relacionados a hemostasia e o AER

No presente estudo, as frequências dos genótipos e de alelos dos sete polimorfismos (*FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *THBD* 1418C>T, *F5* 1691G>A, *F2* 20210G>A, *SERPINE1* 4G/5G e *CPB* c.505G>A) foram semelhantes nos três grupos estudados.

É importante salientar que a frequência alélica do polimorfismo *FGB* -455G>A encontrada no grupo controle, em nosso estudo, foi semelhante à

descrita por Ticconi et al. (2010), em estudo realizado com mulheres italianas com as mesmas características obstétricas (tenham tido no mínimo duas gestações sem complicações e sem abortos prévios) ($p>0,05$). Já quando comparado com mulheres iranianas saudáveis, nosso grupo controle apresentou maior frequência do alelo 455A ($p<0,05$) (Jeddi-Tehrani et al., 2011). Entretanto, no presente trabalho, mulheres com AER primário e com AER secundário, apresentaram menor frequência do alelo A (primário: 12,8% e secundário: 13,3%) do que as mulheres italianas com três ou mais abortos 26,7%, ($p<0,05$) (Ticconi et al., 2011). Além disso, as frequências do alelo 455A nas mulheres com história de AER foi semelhante a encontrada em mulheres iranianas com até 35 anos de idade, com duas ou mais perdas gestacionais sucessivas até a vigésima semana de gestação (Jeddi-Tehrani et al., 2011), assim como a encontrada em indivíduos brasileiros ($p>0,05$) (Sampaio et al., 2007).

A frequência do alelo 148T do polimorfismo *FGB* -148C>T observada em nosso estudo foi de 16,2% em mulheres com AER primário, e de 15,5% em mulheres com AER secundário. Essa frequência é semelhante à observada em outro estudo conduzido no Brasil em indivíduos saudáveis (Sampaio et al., 2007), e em poloneses submetidos à revascularização do miocárdio ($p>0,05$) (Wypasek et al., 2011). A frequência encontrada também é semelhante em americanos que tiveram acidente vascular cerebral, TVE e também naqueles que não tiveram evento cardiovascular. Porém em americanos que tiveram infarto do miocárdio a frequência do alelo T (22,7%) foi maior ($p<0,05$) (Blake et al., 2001).

Com relação à presença do FVL (polimorfismo *F5* 1691G>A), a frequência encontrada do alelo 1691A nas mulheres com história de AER primário foi de 1,7%, no grupo com aborto secundário 1,4% e no grupo controle 1,7%. As frequências encontradas no presente estudo foram similares às aquelas encontradas em indivíduos brasileiros saudáveis (Rodrigues et al., 2004); em mulheres brasileiras com três ou mais perdas fetais consecutivas (Souza et al., 1999); e em mulheres francesas com duas ou mais perdas consecutivas de gestação ($p>0,05$) (Pasquier et al., 2009). No entanto, as frequências de FVL dos dois grupos de AER estudados são menores do que aquela observada em mulheres do sudeste da Turquia com AER no primeiro semestre de gestação

(7,9%, $p<0,05$) (Altintas *et al.*, 2007) e em mulheres americanas com AER (12,8%, $p<0,001$) (Glueck *et al.*, 2008).

Na literatura, há controvérsia quanto ao papel do FVL na etiologia do AER, uma vez que muitos estudos caso-controle não encontraram associação (Pasquier, De Saint Martin e Le Gal, 2010; Karata *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2011). Acredita-se que a mutação no gene do fator V ocorreu para proteger as mulheres dos sangramentos tanto na menstruação como nos partos e, portanto, essa mutação não estaria associada às perdas, mas sim atuando como uma vantagem evolutiva (Lindqvist *et al.*, 1998; Dilley *et al.*, 2002; Lissalde-Lavigne *et al.*, 2005; Lindqvist e Dahlbäck, 2008). De fato, no presente estudo o FVL não foi associado ao AER, nem quando foi analisado isoladamente e nem em conjunto com as outras variáveis independentes incluídas no modelo de regressão logística multivariada.

A frequência observada, em nosso estudo, do alelo 20210A para o polimorfismo no gene da protrombina ($F2\ 20210G>A$) foi de 2,1% nas mulheres com AER primário, 2,5% nas com AER secundário e 1,1% no grupo controle. Estas frequências são semelhantes às encontradas em mulheres brasileiras com as mesmas características obstétricas (Souza *et al.*, 1999); mulheres do sudeste da Turquia com AER no primeiro semestre de gestação (Altintas *et al.*, 2007); e em francesas (Pasquier *et al.*, 2009).

O presente estudo não confirma a associação entre os polimorfismos classicamente associados ao AER (FVL e protrombina) e o maior risco de ter AER. A heterogeneidade de resultados referente ao papel do FVL e polimorfismo no gene da protrombina no AER se reflete nos estudos de meta-análises e revisões encontradas na literatura (Rey *et al.*, 2003; Lissalde-Lavigne *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2006; Kist *et al.*, 2008), e vem levantando questões da real importância da pesquisa desses polimorfismos em mulheres com história de AER (Ghosh, Vora e Shetty, 2006; Serrano *et al.*, 2011; Bates *et al.*, 2012).

Para o polimorfismo $THDB\ 1418\ C>T$, as frequências do alelo 1418T em mulheres com AER primário (13,2%) e secundário (12,6%) em nosso estudo, foram semelhantes a encontrada em indivíduos franceses (12%, $p>0,05$) (Olivot *et al.*, 2008), e também foi semelhante a frequência encontrada em mulheres nulíparas australianas (17,3%, $p<0,05$) (Said *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, a frequência observada para o alelo 4G4G do polimorfismo no gene do PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G) nos grupos AER primário (38,4%), AER secundário (37,4%) e controle (35,9%), foi diferente da encontrada em brasileiros com acidente vascular cerebral isquêmico (46,5%) e em brasileiros saudáveis (62,4%) (De Paula Sabino *et al.*, 2011). Do mesmo modo que a frequência de alelos no grupo estudo foi diferente da observada em mulheres iranianas com pelo menos duas perdas gestacionais antes da vigésima semana de gestação (Jeddi-Tehrani *et al.*, 2011). Entretanto a frequência do alelo 4G4G em mulheres com AER primário e secundário em nosso estudo foi semelhante à encontrada em tunisianas com AER inexplicado (33,2%) (Magdoud *et al.*, 2013).

Com relação ao polimorfismo no gene do TAFI (*CBP2* c.505G>A), a frequência do alelo 505A no grupo de mulheres com AER primário foi de 31,6%, enquanto que no grupo de mulheres com AER secundário foi de 34,9% e 34,7% nas mulheres do grupo controle. Essas frequências se assemelham a encontrada em indivíduos holandeses saudáveis (28,9%), e holandeses com TVP (Martini *et al.*, 2006), gestantes mexicanas sem complicações gestacionais, e mexicanas com pré-eclâmpsia (Acosta-Tejeda *et al.*, 2011), assim como em gestantes espanholas previamente diagnosticadas com síndrome antifosfolípides ($p>0,05$) (Martinez-Zamora *et al.*, 2009).

No presente estudo foi realizado um modelo de regressão logística multivariada na tentativa de observar o papel dos sete polimorfismos em conjunto no risco de ter AER. Observou-se que apenas o polimorfismo *FGB* -148C>T foi associado a maior chance de ter o AER no modelo que incluiu mulheres com AER primário e controles. Esse fato pode ser explicado devido a interação entre os polimorfismos estudados e outros fatores que possam aumentar o risco de AER em mulheres com perdas primárias em conjunto com a presença do polimorfismo *FGB* -148C>T. Uma vez, que esse polimorfismo está associado ao aumento das concentrações plasmáticas de fibrinogênio e isso juntamente com outros fatores pode levar ao aumento da deposição de fibrina intravasculares, promovendo uma trombose placentária a qual pode levar ao AER.

Papel dos haplótipos dos polimorfismos dos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T e sua relação com AER

As concentrações elevadas de fibrinogênio podem colaborar no estado de hipercoagulabilidade encontrada no período gestacional, podendo aumentar o risco de ter AER. Muitos polimorfismos têm sido descritos e estudados nos genes das cadeias alfa (FGA), cadeias beta (FGB) e cadeias gama (FGG) do fibrinogênio a fim de verificar associação com maior concentração deste fator.

No presente estudo foram estudados apenas dois polimorfismos na região promotora do gene *FGB* e estes SNPs não foram associados ao maior risco de ter AER quando analisados isoladamente. Tem sido relatado que os polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* -148C>T estão em desequilíbrio de ligação (Jacquemin, Antoniades et al., 2008; Morozumi, Sharma et al., 2009), sendo que no presente trabalho esses dois polimorfismos estavam em completo desequilíbrio de ligação ($D'=1$) apresentando uma alta correlação ($r^2= 0,854$). Desta forma, a realização do estudo dos haplótipos faz-se importante uma vez que os dois polimorfismos no gene *FGB* se segregam em conjunto e poderiam explicar uma parte da variação encontrada na expressão de RNAm e na quantidade de proteína no plasma.

Como dado inédito no presente estudo, observou-se que as mulheres com AER primário apresentaram maior frequência do haplótipo 455G/148T (3,4%) do que as mulheres do grupo controle (1,1%) ($p<0,050$), sendo observada uma tendência ($p= 0,055$) no modelo de regressão logística univariada que incluiu mulheres com AER primário e mulheres controles, mostrando que as portadoras de haplótipo 455G/148T apresentaram maior chance de ter AER (OR: 2,78; 95% IC: 0,99 – 7,87). O baixo número amostral do haplótipo em questão pode ter colaborado para a tendência no teste estatístico.

Esse achado é intrigante, uma vez que o haplótipo 455G/148T apresenta apenas um alelo mutado (148T), vindo confirmar a hipótese de que o polimorfismo *FGB* -455G>A não é funcional, e que associação encontrada entre as variantes desse polimorfismo seria decorrente do desequilíbrio de ligação que ocorre com outros polimorfismos no gene *FGB* (*FGB* -148C>T, *FGB* -1420G>A e *FGB* -854G>A) (Pihusch et al., 2001; Jacquemin et al., 2008; Morozumi, Sharma e De Nardin, 2009).

Associação entre a presença de polimorfismos genéticos e o período que ocorreram as perdas

No presente estudo, polimorfismos no gene do fibrinogênio (*FGB* -455G>A e -148C>T), da trombomodulina (*THBD* 1418C>T), do fator V (*F5* 1691G>A), da protrombina (*F2* 20210 G>A), do PAI-1 (*SERPINE1* 4G/5G) e do TAFI (*CPB2* c.505G>A) não foram associados ao período em que ocorreram as perdas (precoce ou tardia) no grupo de mulheres com AER primário. Nossos dados são semelhantes àqueles apresentados em vários estudos que mostram a falta de associação entre a presença de FVL e do polimorfismo *F2* 20210 G>A com o maior risco de ter AER primário (Balasch *et al.*, 1997; Pickering, Marriott e Regan, 2001; Pihusch *et al.*, 2001; Rai *et al.*, 2001; Carp *et al.*, 2002). Todavia, este tema é muito controverso. Uma recente revisão publicada em 2012 mostra que vários estudos encontraram associação entre os polimorfismos genéticos (FVL e mutação no gene da protrombina) e o AER primário (Bennett, Bagot e Arya, 2012), entretanto os autores recomendam cautela ao usar estes dados, pois a associação não é tão convincente.

No grupo de AER secundário, os polimorfismos *FGB* -455G>A e *THBD* 1418C>T, foram associados ao período em que ocorreram as perdas, sendo o alelo mutado para esses polimorfismos mais frequente em mulheres com AER secundário com perdas precoces (até a 12^a semana). Na literatura são escassos os trabalhos que estudaram esses dois polimorfismos em mulheres com AER (Jeddi-Tehrani *et al.*, 2011; Ticconi *et al.*, 2011). O único trabalho que avaliou o polimorfismo *FGB* -455G>A em mulheres com AER levando em conta o período das perdas gestacionais foi realizado por Pihusch e colaboradores (2001) (Pihusch *et al.*, 2001). Neste estudo não foi encontrado associação entre o polimorfismo *FGB* -455G>A e as perdas tanto no primeiro trimestre quanto no segundo (Pihusch *et al.*, 2001).

Com relação ao polimorfismo *THBD* 1418C>T, o nosso estudo foi o primeiro a avaliar a associação entre o período das perdas gestacionais e presença do polimorfismo em mulheres com AER secundário.

Mesmo tendo encontrado diferença na distribuição da frequência dos alelos dos polimorfismos *FGB* -455G>A e *THBD* 1418C>T em relação ao período em que ocorrem as perdas gestacionais em mulheres com AER

secundário, este dado deve ser visto com cautela, uma vez que pode ter sido um achado ao acaso, ou ter sido influenciado pelo baixo número amostral nos grupos após a subclassificação do grupo AER em dois grupos.

O fato de não haver estudos na literatura que tenham avaliado a associação de polimorfismo nos genes da cadeia beta do fibrinogênio, trombomodulina e TAFI, torna nosso estudo inédito.

Associação entre a presença de polimorfismos e o número de perdas consecutivas

A falta de associação entre a presença de polimorfismos genéticos e o número de perdas consecutivas que foi encontrada em nosso estudo é concordante com dados descrito na literatura para os polimorfismos nos genes do fator V (FVL) e protrombina em um estudo que incluiu grande número de casos de AER (Jaslow, Carney e Kutteh, 2010). No entanto, não há estudos que tenham avaliado os polimorfismos no gene da cadeia beta do fibrinogênio, trombomodulina, PAI-1 e TAFI tal com foi feito no presente estudo.

Além dos resultados apresentados nessa dissertação, recentemente foi publicado um estudo que avaliou os polimorfismos em genes da proteína C, antitrombina - AT e TFPI (Guerra-Shinohara *et al.*, 2012). Nesse estudo, foram incluídas apenas as mulheres com AER primário e mulheres controles. Como resultado, observou-se que mulheres portadoras do alelo mutado para o polimorfismo no gene da AT (*SERPINC1* 786G>A) tinham maior risco (OR: 1,77, 95% CI: 1,05 – 3,00, $p=0,034$) de ter AER, enquanto que as portadoras do polimorfismo *TFPI* T-287C apresentaram um efeito de proteção (OR: 0,46, 95% CI: 0,26 – 0,83, $p=0,034$) (Guerra-Shinohara *et al.*, 2012). Nossa hipótese para explicar o mecanismo pelo qual essas alterações genéticas estariam associadas ao AER são: 1- o genótipo TT do polimorfismo *TFPI* T-287C foi associado a menores concentrações de TFPI no plasma (Moatti *et al.*, 2000); 2- a presença desse genótipo num contexto que a proteína S (PS) está reduzida, particularmente no 1º ou 2º trimestres de gravidez, poderia favorecer a estado de hipercoagulabilidade através de mecanismos relacionados ao comprometimento da função do TFPI e uma reduzida sensibilidade a PCa, uma vez que a PS age também como cofator do TFPI; 3- além disso, o genótipo *TFPI* -287TT poderia ter papel potencial na regulação negativa da expressão

de TFPI na placenta. 4- esse desequilíbrio na hemostasia poderia estar mais pronunciado se fosse considerada a presença da variante do polimorfismo no gene da AT (*SERPINC1* 786G>A), o qual tem sido associado a concentrações reduzidas de AT no plasma (Antón *et al.*, 2009).

O uso de heparina de baixo peso molecular (LMWH), como meio profilático em mulheres com história de AER primário, desde o início da gravidez, tem sido utilizado na tentativa de aumentar a taxa de sucesso da gravidez. Estudos de coorte e estudos randomizados demonstraram que a administração de heparina de baixo peso molecular (enoxaparina) diariamente durante o período gestacional aumenta a taxa de sucesso na gestação em mulheres com AER, que possuem trombofilias hereditárias ou adquiridas (Carp, Dolitzky e Inbal, 2003; Fouda *et al.*, 2010). Essa taxa de sucesso pode ficar acima de 80% (Gris *et al.*, 1995; Lepercq *et al.*, 2001), sendo que é maior em mulheres com abortamentos primários e naquelas que apresentam maiores números de abortos (mais que cinco) (Carp, Dolitzky e Inbal, 2003; Fouda *et al.*, 2010).

A dose de enoxaparina depende do tratamento (profilático ou terapêutico), do peso da paciente e em alguns casos da evolução clínica. Geralmente a dose em mulheres com AER é realizada com administração diária de 40mg ou 80mg, após as mulheres estarem grávidas entre o período da quinta à décima semana de gestação, sendo que o tratamento dura todo o período gestacional e vai até seis semanas após o parto (Brenner, 2010). Segundo Brenner, (2005; 2010) a taxa de bebês nascidos vivos em mulheres com trombofilia e que não realizaram o tratamento era de aproximadamente 28%, porém após o tratamento o percentual subiu para 84% (40mg/dia) e 78% (80mg/dia). Nesse estudo as mulheres também apresentaram diminuição nas complicações durante a gravidez tais como: restrição de crescimento intrauterino e deslocamento prematuro da placenta (Brenner, Hoffman *et al.*, 2005; Brenner, 2010).

Sabe-se que a LMWH está associada ao aumento das concentrações plasmáticas de TFPI total e livre. Esse aumento de TFPI se deve ao fato da heparina apresentar efeito sobre as células do endotélio vascular fazendo com que haja o aumento da secreção de TFPI pelas mesmas (Sandset, Abildgaard *et al.*, 1988; Sarig, Blumenfeld *et al.*, 2005). Este efeito contribui para a

atividade antitrombótica global da LMWH, uma vez que além de haver o aumento do TFPI no plasma, o mesmo que é liberado pela LMWH não está associado as lipoproteínas (TFPI livre), e assim desempenham um efeito anticoagulante mais potente do que o TFPI que está associado as lipoproteínas (Abildgaard, 1993; Alban e Gastpar, 2001). Desse modo, os dados relativos a eficácia da heparina, especialmente no grupo de AER primário, poderiam ser explicados pelo efeito desse anticoagulante aumentar a atividade do TFPI, e desse modo, impedindo a formação de coágulo na placenta. Esse mecanismo seria decorrente do papel na atividade do inibidor do fator tecidual e não relacionado a presença do FVL, da mutação no gene da protrombina ou do polimorfismo no gene da *MTHFR* 677C>T (Sarig *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÕES

- No grupo de AER primário, a presença da variante do polimorfismo *FGB* - 148C>T foi associada a maior chance de ter AER em modelo de regressão que incluiu todos polimorfismos genéticos estudados;
- No grupo AER secundário, nenhum dos polimorfismos genéticos foi associado ao AER em modelo de regressão logística multivariada;
- Os polimorfismos genéticos não foram associados ao período em que ocorreram as perdas (precoce ou tardia) no grupo AER primário, no entanto, no grupo AER secundário, as mulheres que tiveram abortos até 12ª semana de gravidez, apresentaram maiores frequências do alelo A para o polimorfismo *FGB* -455G>A e do alelo T para o polimorfismo *THBD* 1418C>T;
- Os polimorfismos estudados não foram associados ao número de perdas recorrentes nos dois grupos de AER (primário e secundário);
- O haplótipo 455G/148T para os polimorfismos *FGB* -455G>A e *FGB* - 148C>T foi mais frequente no grupo de AER primário, não sendo encontrado associação no grupo secundário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-TEJEDA, M. et al. Association between genotype and plasma levels of thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFI) in the development of preeclampsia. **Thromb Res**, v. 128, n. 4, p. e39-42, Oct 2011.

ADAMS, R. L.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology (Carlton)**, v. 14, n. 5, p. 462-70, Aug 2009.

AKHTER, M. S. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is seen in higher frequency in the Indian patients with deep vein thrombosis. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 16, n. 2, p. 184-8, Apr 2010.

AL SALLOUT, R. J.; SHARIF, F. A. Polymorphisms in NOS3, ACE and PAI-1 genes and risk of spontaneous recurrent miscarriage in the Gaza Strip. **Med Princ Pract**, v. 19, n. 2, p. 99-104, 2010.

ALBERT, M. A. et al. Candidate genetic variants in the fibrinogen, methylenetetrahydrofolate reductase, and intercellular adhesion molecule-1 genes and plasma levels of fibrinogen, homocysteine, and intercellular adhesion molecule-1 among various race/ethnic groups: data from the Women's Genome Health Study. **Am Heart J**, v. 157, n. 4, p. 777-83.e1, Apr 2009.

ALLISON, J. L.; SCHUST, D. J. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 16, n. 6, p. 446-50, Dec 2009.

ALTINTAS, A. et al. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey. **Ann Hematol**, v. 86, n. 10, p. 727-31, Oct 2007.

ALTMÄE, S. et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitors TFPI and TFPI2 in human secretory endometrium--possible link to female infertility. **Reprod Sci**, v. 18, n. 7, p. 666-78, Jul 2011.

ANTÓN, A. I. et al. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. **Haematologica**, v. 94, n. 4, p. 589-92, Apr 2009.

ARIËNS, R. A. et al. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. **Blood**, v. 100, n. 3, p. 743-54, Aug 2002.

BADIMON, L.; STOREY, R. F.; VILAHUR, G. Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. **Thromb Haemost**, v. 105 Suppl 1, p. S34-42, May 2011.

BALASCH, J. et al. First-trimester repeated abortion is not associated with activated protein C resistance. **Hum Reprod**, v. 12, n. 5, p. 1094-7, May 1997.

BANSAL, A. S. Joining the immunological dots in recurrent miscarriage. **Am J Reprod Immunol**, v. 64, n. 5, p. 307-15, Nov 2010.

BARINI, R.; AL, E. Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 22, p. 217-223, 2000.

BARRETT, J. C. Haploview: Visualization and analysis of SNP genotype data. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2009, n. 10, p. pdb.ip71, Oct 2009.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, Jan 2005.

BATES, S. M. et al. VTE, thrombophilia, antithrombotic therapy, and pregnancy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**, v. 141, n. 2 Suppl, p. e691S-736S, Feb 2012.

BATTINELLI, E. M.; BAUER, K. A. Thrombophilias in pregnancy. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 25, n. 2, p. 323-33, viii, Apr 2011.

BECKER, B. F. et al. Endothelial function and hemostasis. **Z Kardiol**, v. 89, n. 3, p. 160-7, Mar 2000.

BEN ASSAYAG, E. et al. Gender differences in the expression of erythrocyte aggregation in relation to B beta-fibrinogen gene polymorphisms in apparently healthy individuals. **Thromb Haemost**, v. 95, n. 3, p. 428-33, Mar 2006.

BENNETT, S. A.; BAGOT, C. N.; ARYA, R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. **Br J Haematol**, v. 157, n. 5, p. 529-42, Jun 2012.

BERGER, D. S. et al. Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion. **Reprod Sci**, v. 17, n. 4, p. 331-8, Apr 2010.

BERTINA, R. M. et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature**, v. 369, n. 6475, p. 64-7, May 1994.

BI, S. et al. Beta-fibrinogen promoter -455 G/A (HaeIII) polymorphism prediction of plasma fibrinogen but not of ischemic cerebrovascular disease. **Chin Med Sci J**, v. 19, n. 1, p. 1-5, Mar 2004.

BIRON-ANDRÉANI, C. et al. Factor v Leiden homozygous genotype and pregnancy outcomes. **Obstet Gynecol**, v. 114, n. 6, p. 1249-53, Dec 2009.

BLAKE, G. J. et al. Mutation in the promoter region of the beta-fibrinogen gene and the risk of future myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. **Eur Heart J**, v. 22, n. 24, p. 2262-6, Dec 2001.

BLOHM, F.; FRIDÉN, B.; MILSOM, I. A prospective longitudinal population-based study of clinical miscarriage in an urban Swedish population. **BJOG**, v. 115, n. 2, p. 176-82; discussion 183, Jan 2008.

BLOOMENTHAL, D. et al. The effect of factor V Leiden carriage on maternal and fetal health. **CMAJ**, v. 167, n. 1, p. 48-54, Jul 2002.

BLUMENFELD, Z.; BRENNER, B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. **Fertil Steril**, v. 72, n. 5, p. 765-74, Nov 1999.

BOFFA, M. B.; KOSCHINSKY, M. L. Curiouser and curiouser: recent advances in measurement of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding

its molecular genetics, gene regulation, and biological roles. **Clin Biochem**, v. 40, n. 7, p. 431-42, Apr 2007.

BOFFA, M. B. et al. Effect of single nucleotide polymorphisms on expression of the gene encoding thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor: a functional analysis. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 183-9, Jan 2008.

BORG, A. J. et al. Thrombomodulin Ala455Val dimorphism is not associated with pre-eclampsia in Australian and New Zealand women. **Gynecol Obstet Invest**, v. 54, n. 1, p. 43-5, 2002.

BOUMA, B. N.; MOSNIER, L. O. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 33, n. 5-6, p. 375-81, 2003 Sep-2004 Dec 2003.

BOZDEMIR, V. et al. The association of beta-fibrinogen 455 G/A gene polymorphism with left atrial thrombus and severe spontaneous echo contrast in atrial fibrillation. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 10, n. 3, p. 209-15, Jun 2010.

BRADLEY, L. A. et al. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes?: Results from a targeted evidence-based review. **Genet Med**, v. 14, n. 1, p. 39-50, Jan 2012.

BRANCH, D. W.; GIBSON, M.; SILVER, R. M. Clinical practice. Recurrent miscarriage. **N Engl J Med**, v. 363, n. 18, p. 1740-7, Oct 2010.

BRENNER, B. Clinical management of thrombophilia-related placental vascular complications. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4003-9, Jun 2004.

BRENNER, B. Thrombophilia and pregnancy complications. **Pathophysiol Haemost Thromb**, v. 35, n. 1-2, p. 28-35, 2006.

BRENNER, B. Hypercoagulability and recurrent miscarriages. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 8, n. 7, p. 467-9, Jul 2010.

BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Rev**, v. 25, n. 4, p. 155-67, Jul 2011.

BROZE, G. J. The rediscovery and isolation of TFPI. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 8, p. 1671-1675, Aug 2003. ISSN 1538-7933. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000184638100001 >.

BUTENAS, S.; MANN, K. G. Blood coagulation. **Biochemistry (Mosc)**, v. 67, n. 1, p. 3-12, Jan 2002.

CAETANO, M. R. et al. Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. **Rev. Ciênc. Méd**, v. 15, n. 1, p. 47-53, 2006.

CAGLIANI, R. et al. Polymorphisms in the CPB2 gene are maintained by balancing selection and result in haplotype-preferential splicing of exon 7. **Mol Biol Evol**, v. 27, n. 8, p. 1945-54, Aug 2010.

CARBONE, J. F.; RAMPERSAD, R. Prenatal screening for thrombophilias: indications and controversies. **Clin Lab Med**, v. 30, n. 3, p. 747-60, Sep 2010.

CARP, H.; DOLITZKY, M.; INBAL, A. Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 3, p. 433-8, Mar 2003.

CARP, H. et al. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. **Hum Reprod**, v. 17, n. 6, p. 1633-7, Jun 2002.

CARRINGTON, B.; SACKS, G.; REGAN, L. Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 17, n. 6, p. 591-7, Dec 2005.

CESARI, M.; PAHOR, M.; INCALZI, R. A. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. **Cardiovasc Ther**, v. 28, n. 5, p. e72-91, Oct 2010.

CHAN, A. K.; PAREDES, N. The coagulation system in humans. **Methods Mol Biol**, v. 992, p. 3-12, 2013.

CHEN, X. et al. Association of beta-fibrinogen gene -148C/T and -455G/A polymorphisms and coronary artery disease in Chinese population: a meta analysis. **Sci China C Life Sci**, v. 51, n. 9, p. 814-20, Sep 2008.

CHEN, Y. L. et al. Association of 4G/5G polymorphism in PAI1 promoter with PAI1 level in deep vein thrombosis. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 22, n. 6, p. 624-7, Dec 2005.

CLEMETSON, K. J. Platelets and primary haemostasis. **Thromb Res**, v. 129, n. 3, p. 220-4, Mar 2012.

COLE, J. W. et al. Thrombomodulin Ala455Val Polymorphism and the risk of cerebral infarction in a biracial population: the Stroke Prevention in Young Women Study. **BMC Neurol**, v. 4, n. 1, p. 21, Dec 2004.

COLUCCI, M.; SEMERARO, N. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: at the nexus of fibrinolysis and inflammation. **Thromb Res**, v. 129, n. 3, p. 314-9, Mar 2012.

CONTRAN, R. S. **Pathologic basis of disease**. 1999.

CONWAY, E. M. et al. The amino terminal lectin-like domain of thrombomodulin is required for constitutive endocytosis. **Blood**, v. 89, n. 2, p. 652-61, Jan 1997.

COOK, D. G. et al. Ethnic differences in fibrinogen levels: the role of environmental factors and the beta-fibrinogen gene. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 8, p. 799-806, Apr 2001.

COULAM, C. B. et al. Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 60, n. 5, p. 426-31, Nov 2008.

DAHLBÄCK, B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. **Haemostasis**, v. 24, n. 2, p. 139-51, 1994 Mar-Apr 1994.

DAHME, A. E. et al. Candidate gene polymorphisms and the risk for pregnancy-related venous thrombosis. **Br J Haematol**, v. 157, n. 6, p. 753-61, Jun 2012.

DE ALMEIDA, J. M. F. **Trombofilia Hereditária e Gravidez: Controvérsias Actuais**. 2010. 46 Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Portugal.

DE LA RED, G. et al. Factor XIII-A subunit Val34Leu polymorphism is associated with the risk of thrombosis in patients with antiphospholipid antibodies and high fibrinogen levels. **Thromb Haemost**, v. 101, n. 2, p. 312-6, Feb 2009.

DE MAAT, M. P. Effects of diet, drugs, and genes on plasma fibrinogen levels. **Ann N Y Acad Sci**, v. 936, p. 509-21, 2001.

DE MAAT, M. P. et al. -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, n. 2, p. 265-71, Feb 1998.

DE PAULA SABINO, A. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism and PAI-1 plasma levels in young patients with ischemic stroke. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 8, p. 5355-60, Nov 2011.

DIJKSTRA, A. et al. SERPINE1 -675 4G/5G polymorphism is associated with asthma severity and inhaled corticosteroid response. **Eur Respir J**, v. 38, n. 5, p. 1036-43, Nov 2011.

DILLEY, A. et al. Mutations in the factor V, prothrombin and MTHFR genes are not risk factors for recurrent fetal loss. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 11, n. 3, p. 176-82, Mar 2002.

DISSANAYAKE, V. H. et al. Candidate gene study of genetic thrombophilic polymorphisms in pre-eclampsia and recurrent pregnancy loss in Sinhalese women. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 38, n. 9, p. 1168-76, Sep 2012.

DIZON-TOWNSON, D. S. et al. Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. **Am J Obstet Gynecol**, v. 177, n. 2, p. 402-5, Aug 1997.

EICHINGER, S. et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for recurrent venous thromboembolism. **Blood**, v. 103, n. 10, p. 3773-6, May 2004.

ERIKSSON, P. et al. Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 6, p. 1851-5, Mar 1995.

ERNST, E.; RESCH, K. L. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. **Ann Intern Med**, v. 118, n. 12, p. 956-63, Jun 1993.

ESMON, C. T. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. **J Biol Chem**, v. 264, n. 9, p. 4743-6, Mar 1989.

ESMON, C. T. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. **FASEB J**, v. 9, n. 10, p. 946-55, Jul 1995.

FAWAZ, N. A. et al. Factor V-Leiden, prothrombin G20210A, and MTHFR C677T mutations among patients with sickle cell disease in Eastern Saudi Arabia. **Am J Hematol**, v. 76, n. 3, p. 307-9, Jul 2004.

FEINBLOOM, D.; BAUER, K. A. The role of other hemostatic factors in predicting arterial thrombotic events. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 3, p. e29, Mar 2006.

FLOOD, K. et al. Platelet reactivity and pregnancy loss. **Am J Obstet Gynecol**, v. 203, n. 3, p. 281.e1-5, Sep 2010.

FOUDA, U. M. et al. Efficacy and safety of two doses of low molecular weight heparin (enoxaparin) in pregnant women with a history of recurrent abortion secondary to antiphospholipid syndrome. **J Obstet Gynaecol**, v. 30, n. 8, p. 842-6, 2010.

FRANCHINI, M. Utility of testing for factor V Leiden. **Blood Transfus**, v. 10, n. 3, p. 257-9, Jul 2012.

FRANCO, R. **FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE** Medicina. Ribeirão Preto. 34: 229-237 p. 2001.

FRANCO, R. F. et al. Identification of polymorphisms in the 5'-untranslated region of the TAFI gene: relationship with plasma TAFI levels and risk of venous thrombosis. **Haematologica**, v. 86, n. 5, p. 510-7, May 2001.

GERHARDT, A. et al. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. **N Engl J Med**, v. 342, n. 6, p. 374-80, Feb 2000.

GESSONI, G. et al. Factor V Leiden in Chioggia: a prevalence study in patients with venous thrombosis, their blood relatives and the general population. **Blood Transfus**, v. 8, n. 3, p. 193-5, Jul 2010.

GHOSH, K.; SHETTY, S.; VORA, S. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism in women with fetal loss. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 107, n. 2, p. 159-60, Nov 2009.

GHOSH, K.; VORA, S.; SHETTY, S. Thrombophilia and pregnancy loss--picking up a needle from the haystack! **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 3, p. 900; author reply 901, Mar 2006.

GLUECK, C. J. et al. Factor V Leiden mutation: a treatable etiology for sporadic and recurrent pregnancy loss. **Fertil Steril**, v. 89, n. 2, p. 410-6, Feb 2008.

GOHIL, R.; PECK, G.; SHARMA, P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 2, p. 360-70, Aug 2009.

GONÇALVES-FILHO, R. P. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in infertile women with and without endometriosis. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 90, n. 5, p. 473-7, May 2011.

GRIS, J. C. et al. Use of a low-molecular weight heparin (enoxaparin) or of a phenformin-like substance (moroxydine chloride) in primary early recurrent aborters with an impaired fibrinolytic capacity. **Thromb Haemost**, v. 73, n. 3, p. 362-7, Mar 1995.

GRIS, J. C. Case-control study of the frequency of thrombophilic disorders in couples with late foetal loss and no thrombotic antecedent--the Nîmes Obstetricians and Haematologists Study5 (NOHA5). **Thromb Haemost**, v. 81, n. 6, p. 891-9, Jun 1999.

GUAN, L. X. et al. [Association of genetic polymorphisms in plasminogen activator inhibitor-1 gene and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene with recurrent early spontaneous abortion]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 22, n. 3, p. 330-3, Jun 2005.

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

GUIMARÃES FILHO, H. A. et al. Prevalence of uterine defects in habitual abortion patients attended on at a university health service in Brazil. **Arch Gynecol Obstet**, v. 274, n. 6, p. 345-8, Oct 2006.

GUO, X.; ZHANG, D.; ZHANG, X. Fibrinogen gene polymorphism (Bbeta-148C/T) in Uygur patients with cerebral infarction. **Neurol Res**, v. 31, n. 4, p. 381-4, May 2009.

HAMASAKI, N.; KUMA, H.; TSUDA, H. Activated protein C anticoagulant system dysfunction and thrombophilia in Asia. **Ann Lab Med**, v. 33, n. 1, p. 8-13, Jan 2013.

HARGER, J. H. et al. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstet Gynecol**, v. 62, n. 5, p. 574-81, Nov 1983.

HEIT, J. A. et al. Thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 4, p. 710-7, Apr 2005.

HENRY, M. et al. Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. **Blood**, v. 97, n. 7, p. 2053-8, Apr 2001.

HEYLEN, E.; WILLEMSE, J.; HENDRIKS, D. An update on the role of carboxypeptidase U (TAFIa) in fibrinolysis. **Front Biosci**, v. 16, p. 2427-50, 2011.

HIDALGO, A. et al. Prevalence of the fibrinogen beta-chain, angiotensin-converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 polymorphisms in Costa Rican young adults with thrombotic disease. **Cell Biochem Funct**, v. 28, n. 5, p. 367-73, Jul 2010.

HOEKSTRA, T. et al. Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. **Thromb Haemost**, v. 91, n. 5, p. 861-72, May 2004.

HUANG, M. T. et al. Knockdown of thrombomodulin enhances HCC cell migration through increase of ZEB1 and decrease of E-cadherin gene expression. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 12, p. 3379-85, Dec 2010.

HUBER, K. Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. **J Thromb Thrombolysis**, v. 11, n. 3, p. 183-93, May 2001.

ICHINOSE, A.; ASAHINA, T.; KOBAYASHI, T. Congenital blood coagulation factor XIII deficiency and perinatal management. **Curr Drug Targets**, v. 6, n. 5, p. 541-9, Aug 2005.

ISERMANN, B. et al. The thrombomodulin-protein C system is essential for the maintenance of pregnancy. **Nat Med**, v. 9, n. 3, p. 331-7, Mar 2003.

JACQUEMIN, B. et al. Common genetic polymorphisms and haplotypes of fibrinogen alpha, beta, and gamma chains affect fibrinogen levels and the response to proinflammatory stimulation in myocardial infarction survivors: the AIRGENE study. **J Am Coll Cardiol**, v. 52, n. 11, p. 941-52, Sep 2008.

JAMES, A. H. Thromboembolism in pregnancy: recurrence risks, prevention and management. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 20, n. 6, p. 550-6, Dec 2008.

JAMES, A. H. Venous thromboembolism in pregnancy. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 3, p. 326-31, Mar 2009.

JAMES, A. H.; BRANCAZIO, L. R.; ORTEL, T. L. Thrombosis, thrombophilia, and thromboprophylaxis in pregnancy. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 3, n. 3, p. 187-97, Mar 2005.

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.

JEDDI-TEHRANI, M. et al. Analysis of plasminogen activator inhibitor-1, integrin beta3, Beta fibrinogen, and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in Iranian women with recurrent pregnancy loss. **Am J Reprod Immunol**, v. 66, n. 2, p. 149-56, Aug 2011.

JIVRAJ, S. et al. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, v. 21, n. 5, p. 1161-5, May 2006.

KALAFATIS, M. et al. Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. **J Biol Chem**, v. 270, n. 8, p. 4053-7, Feb 1995.

KARATA, S. et al. Hereditary Thrombophilia, Anti-Beta2 Glycoprotein 1 IgM, and Anti-Annexin V Antibodies in Recurrent Pregnancy Loss. **Am J Reprod Immunol**, Nov 2011.

KERLIN, B. et al. Cause-effect relation between hyperfibrinogenemia and vascular disease. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1728-34, Mar 2004.

KEY, N. S.; GENG, J. G.; BACH, R. R. Tissue factor; from Morawitz to microparticles. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 118, p. 165-73, 2007.

KINOSHITA, S. et al. Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. **Clin Biochem**, v. 38, n. 10, p. 908-15, Oct 2005.

KIST, W. J. et al. Thrombophilias and adverse pregnancy outcome - A confounded problem! **Thromb Haemost**, v. 99, n. 1, p. 77-85, Jan 2008.

KNUDSEN, U. B. et al. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 39, n. 1, p. 31-6, Mar 1991.

KOHLER, H. P.; GRANT, P. J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 342, n. 24, p. 1792-801, Jun 2000.

KOVACHEVA, K. et al. [Genetic thrombophilic defects (Factor V Leiden, prothrombin G20210A, MTHFR C677T) in women with recurrent fetal loss]. **Akush Ginekol (Sofiia)**, v. 46, n. 7, p. 10-6, 2007.

KOVALEVSKY, G. et al. Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. **Arch Intern Med**, v. 164, n. 5, p. 558-63, Mar 2004.

KUPFERMINC, M. J. et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. **N Engl J Med**, v. 340, n. 1, p. 9-13, Jan 1999.

KURZAWIŃSKA, G. et al. [Inherited thrombophilia as the reason of recurrent miscarriages in the first trimester of pregnancy]. **Ginekol Pol**, v. 80, n. 9, p. 657-63, Sep 2009.

LAMBRINOUDAKI, I. et al. The frequency of early, spontaneous miscarriage associated with the leu33pro polymorphism of Glycoprotein IIIa: a pilot study. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 50, n. 5, p. 485-90, Oct 2010.

LEGNANI, C. et al. Risk of early recurrent fetal loss and levels of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. **Thromb Res**, v. 130, n. 2, p. 237-41, Aug 2012.

LEPERCQ, J. et al. Venous thromboembolism during pregnancy: a retrospective study of enoxaparin safety in 624 pregnancies. **BJOG**, v. 108, n. 11, p. 1134-40, Nov 2001.

LEURS, J.; HENDRIKS, D. Carboxypeptidase U (TAFIa): a metallocarboxypeptidase with a distinct role in haemostasis and a possible risk factor for thrombotic disease. **Thromb Haemost**, v. 94, n. 3, p. 471-87, Sep 2005.

LEWONTIN, R. C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics**, v. 49, n. 1, p. 49-67, Jan 1964.

LIBOUREL, E. J. et al. Co-segregation of thrombophilic disorders in factor V Leiden carriers; the contributions of factor VIII, factor XI, thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and lipoprotein(a) to the absolute risk of venous thromboembolism. **Haematologica**, v. 87, n. 10, p. 1068-73, Oct 2002.

LICHTMAN, M. A. **Williams Hematology**. United States of America: 2006.

LIN, Q. D. [Immunologic diagnosis and treatment in the cases of unexplained habitual abortion]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 28, n. 3, p. 143-6, 188, Mar 1993.

LIN, Q. D. [Progress in basic and clinical research of unexplained recurrent spontaneous abortion]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 38, n. 8, p. 481-3, Aug 2003.

LINDQVIST, P. G.; DAHLBÄCK, B. Carriership of Factor V Leiden and evolutionary selection advantage. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 15, p. 1541-4, 2008.

LINDQVIST, P. G. et al. Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss--a possible evolutionary selection mechanism. **Thromb Haemost**, v. 79, n. 1, p. 69-73, Jan 1998.

LISMAN, T. et al. Reduced plasma fibrinolytic potential is a risk factor for venous thrombosis. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1102-5, Feb 2005.

LISSALDE-LAVIGNE, G. et al. The association between hereditary thrombophilias and pregnancy loss. **Haematologica**, v. 90, n. 9, p. 1223-30, Sep 2005.

LUND, M. et al. Hereditary thrombophilia and recurrent pregnancy loss: a retrospective cohort study of pregnancy outcome and obstetric complications. **Hum Reprod**, v. 25, n. 12, p. 2978-84, Dec 2010.

LYNCH, A. I. et al. Antihypertensive pharmacogenetic effect of fibrinogen-beta variant -455G>A on cardiovascular disease, end-stage renal disease, and mortality: the GenHAT study. **Pharmacogenet Genomics**, v. 19, n. 6, p. 415-21, Jun 2009.

MACFARLANE, R. G. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. **Nature**, v. 202, p. 498-9, May 1964.

MAGDOUD, K. et al. Plasminogen Activator Inhibitor 1 4G/5G and -844G/A Variants in Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. **Am J Reprod Immunol**, Mar 2013.

MANLY, D. A.; BOLES, J.; MACKMAN, N. Role of tissue factor in venous thrombosis. **Annu Rev Physiol**, v. 73, p. 515-25, Mar 2011.

MANN, K. G. et al. Models of blood coagulation. **Blood Cells Mol Dis**, v. 36, n. 2, p. 108-17, 2006 Mar-Apr 2006.

MANOCHA, S. et al. Fibrinogen-beta gene haplotype is associated with mortality in sepsis. **J Infect**, v. 54, n. 6, p. 572-7, Jun 2007.

MARTINELLI, I. et al. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. **N Engl J Med**, v. 343, n. 14, p. 1015-8, Oct 2000.

MARTINEZ-ZAMORA, M. A. et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and clot lysis time in pregnant patients with antiphospholipid syndrome: relationship with pregnancy outcome and thrombosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 62, n. 6, p. 381-9, Dec 2009.

MARTINI, C. H. et al. The effect of genetic variants in the thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene on TAFI-antigen levels, clot lysis time and the risk of venous thrombosis. **Br J Haematol**, v. 134, n. 1, p. 92-4, Jul 2006.

MARTISKAINEN, M. et al. Fibrinogen gene promoter -455 A allele as a risk factor for lacunar stroke. **Stroke**, v. 34, n. 4, p. 886-91, Apr 2003.

MARUYAMA, I.; BELL, C. E.; MAJERUS, P. W. Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. **J Cell Biol**, v. 101, n. 2, p. 363-71, Aug 1985.

MASINI, S. et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor polymorphisms and recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 2, p. 694-702, Aug 2009.

MCKNIGHT, J. R. et al. Obesity in pregnancy: problems and potential solutions. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 3, p. 442-52, 2011.

MELTZER, M. E. et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1. **Blood**, v. 116, n. 1, p. 113-21, Jul 2010.

MIDDELDORP, S. et al. The risk of pregnancy-related venous thromboembolism in women who are homozygous for factor V Leiden. **Br J Haematol**, v. 113, n. 2, p. 553-5, May 2001.

MOATTI, D. et al. A new T-287C polymorphism in the 5' regulatory region of the tissue factor pathway inhibitor gene. Association study of the T-287C and C-399T polymorphisms with coronary artery disease and plasma TFPI levels. **Thromb Haemost**, v. 84, n. 2, p. 244-9, Aug 2000.

MOROZUMI, T.; SHARMA, A.; DE NARDIN, E. The functional effects of the -455G/A polymorphism on the IL-6-induced expression of the beta-fibrinogen gene may be due to linkage disequilibrium with other functional polymorphisms. **Immunol Invest**, v. 38, n. 3-4, p. 311-23, 2009.

MORSER, J. Thrombomodulin Links Coagulation to Inflammation and Immunity. **Curr Drug Targets**, Dec 2011.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost**, v. 3, n. 8, p. 1894-904, Aug 2005.

MOSNIER, L. O. et al. Identification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in human platelets. **Blood**, v. 101, n. 12, p. 4844-6, Jun 2003.

MUELLER, T. et al. Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations are not associated with chronic limb ischemia: the Linz Peripheral Arterial Disease (LIPAD) study. **J Vasc Surg**, v. 41, n. 5, p. 808-15, May 2005.

MUSTERS, A. M. et al. Supportive care for women with unexplained recurrent miscarriage: patients' perspectives. **Hum Reprod**, v. 26, n. 4, p. 873-7, Apr 2011.

NAGASHIMA, M. et al. Alanine-scanning mutagenesis of the epidermal growth factor-like domains of human thrombomodulin identifies critical residues for its cofactor activity. **J Biol Chem**, v. 268, n. 4, p. 2888-92, Feb 1993.

NAUCK, M.; WIELAND, H.; MÄRZ, W. Rapid, homogeneous genotyping of the 4G/5G polymorphism in the promoter region of the PAII gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. **Clin Chem**, v. 45, n. 8 Pt 1, p. 1141-7, Aug 1999.

OCAK, G. et al. Risk of venous thrombosis in patients with major illnesses: results from the MEGA study. **J Thromb Haemost**, v. 11, n. 1, p. 116-23, Jan 2013.

OKAMOTO, T. et al. Thrombomodulin: a bifunctional modulator of inflammation and coagulation in sepsis. **Crit Care Res Pract**, v. 2012, p. 614545, 2012.

OLIVOT, J. M. et al. Thrombomodulin gene polymorphisms in brain infarction and mortality after stroke. **J Neurol**, v. 255, n. 4, p. 514-9, Apr 2008.

OZDEMIR, O. et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 16, n. 4, p. 279-86, Apr 2012.

PANDEY, S. K. et al. Prevalence of factor V Leiden G1691A, MTHFR C677T, and prothrombin G20210A among Asian Indian sickle cell patients. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 18, n. 3, p. 320-3, Jun 2012.

PASQUIER, E. et al. Inherited thrombophilias and unexplained pregnancy loss: an incident case-control study. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. 2, p. 306-11, Feb 2009.

PASQUIER, E.; DE SAINT MARTIN, L.; LE GAL, G. Antithrombotic medications and recurrent miscarriage. **N Engl J Med**, v. 363, n. 9, p. 887; author reply 888, Aug 2010.

PENA, S. D. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 10, p. 870-6, Oct 2009.

PICKART, L. Fat metabolism, the fibrinogen/fibrinolytic system and blood flow: new potentials for the pharmacological treatment of coronary heart disease. **Pharmacology**, v. 23, n. 5, p. 271-80, 1981.

PICKERING, W.; MARRIOTT, K.; REGAN, L. G20210A prothrombin gene mutation: prevalence in a recurrent miscarriage population. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 7, n. 1, p. 25-8, Jan 2001.

PIERONI, F. et al. Cytokine gene variants and venous thrombotic risk in the BRATROS (BRAZILIAN THROMBOSIS STUDY). **Thromb Res**, v. 120, n. 2, p. 221-9, 2007.

PIHUSCH, R. et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. **Am J Reprod Immunol**, v. 46, n. 2, p. 124-31, Aug 2001.

PIKE, R. N. et al. Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. **FEBS J**, v. 272, n. 19, p. 4842-51, Oct 2005.

PRESTON, F. E. et al. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. **Lancet**, v. 348, n. 9032, p. 913-6, Oct 1996.

PÉREZ-GÓMEZ, F.; BOVER, R. [The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage]. **Rev Esp Cardiol**, v. 60, n. 12, p. 1217-9, Dec 2007.

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

RAI, R. et al. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. **Hum Reprod**, v. 16, n. 5, p. 961-5, May 2001.

RALLIDIS, L. S. et al. Reduced carriership of 4G allele of plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism in very young survivors of myocardial infarction. **J Thromb Thrombolysis**, v. 29, n. 4, p. 497-502, May 2010.

REES, D. C.; COX, M.; CLEGG, J. B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, v. 346, n. 8983, p. 1133-4, Oct 1995.

REGAN, L. Overview of recurrent miscarriage. ***Gynaecol Forum***, v. 3, p. 3-7, 1998.

REGAN, L.; BRAUDE, P. R.; TREMBATH, P. L. Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. **BMJ**, v. 299, n. 6698, p. 541-5, Aug 1989.

REID, V. L.; WEBSTER, N. R. Role of microparticles in sepsis. **Br J Anaesth**, v. 109, n. 4, p. 503-13, Oct 2012.

REINHART, W. H. Fibrinogen--marker or mediator of vascular disease? **Vasc Med**, v. 8, n. 3, p. 211-6, 2003.

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

REY, E. et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. **Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 901-8, Mar 2003.

REZAEI, A. R. et al. Protein C inhibitor is a potent inhibitor of the thrombin-thrombomodulin complex. **J Biol Chem**, v. 270, n. 43, p. 25336-9, Oct 1995.

RIDKER, P. M. et al. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for venous thromboembolism screening. **JAMA**, v. 277, n. 16, p. 1305-7, 1997 Apr 23-30 1997.

ROBERTSON, L. et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. **Br J Haematol**, v. 132, n. 2, p. 171-96, Jan 2006.

RODGER, M. A. et al. The association of factor V Leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **PLoS Med**, v. 7, n. 6, p. e1000292, Jun 2010.

RODRIGUES, C. A. et al. Prothrombin G20210A mutation, and not factor V Leiden mutation, is a risk factor for cerebral venous thrombosis in Brazilian patients. **J Thromb Haemost**, v. 2, n. 7, p. 1211-2, Jul 2004.

ROSENDAAL, F. R. Venous thrombosis: a multicausal disease. **Lancet**, v. 353, n. 9159, p. 1167-73, Apr 1999.

ROSENDAAL, F. R. et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. **Thromb Haemost**, v. 79, n. 4, p. 706-8, Apr 1998.

RULL, K.; NAGIRNAJA, L.; LAAN, M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. **Front Genet**, v. 3, p. 34, 2012.

RUMBAUT, R., E; THIAGARAJAN, P. Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. **Morgan & Claypool Life Sciences**, 2010.

SAID, J. M. et al. The prevalence of inherited thrombophilic polymorphisms in an asymptomatic Australian antenatal population. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 48, n. 6, p. 536-41, Dec 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory**. 3. **Londres**: 2001.

SAMPAIO, M. F. et al. AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults. **Clin Chim Acta**, v. 377, n. 1-2, p. 154-62, Feb 2007.

SARIG, G. et al. Modulation of systemic hemostatic parameters by enoxaparin during gestation in women with thrombophilia and pregnancy loss. **Thromb Haemost**, v. 94, n. 5, p. 980-5, Nov 2005.

SARTORI, M. T. et al. The PAI-1 gene 4G/5G polymorphism and deep vein thrombosis in patients with inherited thrombophilia. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 9, n. 4, p. 299-307, Oct 2003.

SCHADINGER, S. L. et al. Secretion and antifibrinolytic function of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor from human platelets. **J Thromb Haemost**, v. 8, n. 11, p. 2523-9, Nov 2010.

SCHOENMAKERS, S. H.; REITSMA, P. H.; SPEK, C. A. Blood coagulation factors as inflammatory mediators. **Blood Cells Mol Dis**, v. 34, n. 1, p. 30-7, 2005 Jan-Feb 2005.

SEDANO-BALBÁS, S. et al. Acquired activated protein C resistance, thrombophilia and adverse pregnancy outcomes: a study performed in an irish cohort of pregnant women. **J Pregnancy**, v. 2011, p. 232840, 2011.

SEGAL, J. B. et al. Predictive value of factor V Leiden and prothrombin G20210A in adults with venous thromboembolism and in family members of those with a mutation: a systematic review. **JAMA**, v. 301, n. 23, p. 2472-85, Jun 2009.

SERRANO, F. et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? **Arch Gynecol Obstet**, Jan 2011.

SIEGERINK, B.; ROSENDAAL, F. R.; ALGRA, A. Genetic variation in fibrinogen; its relationship to fibrinogen levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. **J Thromb Haemost**, v. 7, n. 3, p. 385-90, Mar 2009.

SILVER, R. M. et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. **Obstet Gynecol**, v. 115, n. 1, p. 14-20, Jan 2010.

SKRETTING, G. et al. Functional characterization of polymorphisms in the human TFPI gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 397, n. 1, p. 106-11, Jun 2010.

SMITH, G. C.; PELL, J. P.; WALSH, D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. **Lancet**, v. 357, n. 9273, p. 2002-6, Jun 2001.

SMITH, N. L. et al. Association of genetic variations with nonfatal venous thrombosis in postmenopausal women. **JAMA**, v. 297, n. 5, p. 489-98, Feb 2007.

SODE, B. F. et al. Risk of venous thromboembolism and myocardial infarction associated with factor V Leiden and prothrombin mutations and blood type. **CMAJ**, Feb 2013.

SOLÁ, E. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 levels in severe and morbid obesity. Effect of weight loss and influence of 4G/5G polymorphism. **Thromb Res**, v. 122, n. 3, p. 320-7, 2008.

SOUZA, S. S. et al. Factor V leiden and factor II G20210A mutations in patients with recurrent abortion. **Hum Reprod**, v. 14, n. 10, p. 2448-50, Oct 1999.

STEC, J. J. et al. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. **Circulation**, v. 102, n. 14, p. 1634-8, Oct 2000.

STEFANIDOU, E. M. et al. Maternal caffeine consumption and sine causa recurrent miscarriage. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 158, n. 2, p. 220-4, Oct 2011.

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

STEPHENSON, M. D. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. **Fertil Steril**, v. 66, n. 1, p. 24-9, Jul 1996.

STORTONI, P. et al. Placental thrombomodulin expression in recurrent miscarriage. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 8, p. 1, 2010.

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

SVEINSDOTTIR, S. V. et al. Evaluation of recurrent venous thromboembolism in patients with Factor V Leiden mutation in heterozygous form. **Thromb Res**, v. 130, n. 3, p. 467-71, Sep 2012.

SZYMANSKI, L. M.; PATE, R. R.; DURSTINE, J. L. Effects of maximal exercise and venous occlusion on fibrinolytic activity in physically active and inactive men. **J Appl Physiol**, v. 77, n. 5, p. 2305-10, Nov 1994.

THEODORAKI, E. V. et al. Fibrinogen beta variants confer protection against coronary artery disease in a Greek case-control study. **BMC Med Genet**, v. 11, p. 28, 2010.

TICCONI, C. et al. Beta-fibrinogen G-455A polymorphisms and recurrent miscarriage. **Gynecol Obstet Invest**, v. 71, n. 3, p. 198-201, 2011.

TOTH, B. et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. **J Reprod Immunol**, v. 85, n. 1, p. 25-32, May 2010.

TSOUMANI, M. E. et al. Platelet-mediated inflammation in cardiovascular disease. Potential role of platelet-endothelium interactions. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 10, n. 5, p. 539-49, Sep 2012.

TYBJAERG-HANSEN, A. et al. A common mutation (G-455--> A) in the beta-fibrinogen promoter is an independent predictor of plasma fibrinogen, but not of ischemic heart disease. A study of 9,127 individuals based on the Copenhagen City Heart Study. **J Clin Invest**, v. 99, n. 12, p. 3034-9, Jun 1997.

USZYŃSKI, M. et al. A comparative study of the protein C system in mother's blood, cord blood and amniotic fluid. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 48, n. 2, p. 262-6, Jan 2010.

VAN DER VELDEN, P. A. et al. A frequent thrombomodulin amino acid dimorphism is not associated with thrombophilia. **Thromb Haemost**, v. 65, n. 5, p. 511-3, May 1991.

VAN HINSBERGH, V. W. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 1, p. 93-106, Jan 2012.

VAN HORN, J. T. et al. Histologic features of placentas and abortion specimens from women with antiphospholipid and antiphospholipid-like syndromes. **Placenta**, v. 25, n. 7, p. 642-8, Aug 2004.

VAN OPPENRAAIJ, R. H. et al. Predicting adverse obstetric outcome after early pregnancy events and complications: a review. **Hum Reprod Update**, v. 15, n. 4, p. 409-21, 2009 Jul-Aug 2009.

VANHOOFF, G. et al. The gene for human carboxypeptidase U (CPU)--a proposed novel regulator of plasminogen activation--maps to 13q14.11. **Genomics**, v. 38, n. 3, p. 454-5, Dec 1996.

VARGA, E.; KUJOVICH, J. Management of inherited thrombophilia: guide for genetics professionals. **Clin Genet**, v. 81, n. 1, p. 7-17, Jan 2012.

VERCAUTEREN, E. et al. Plasmin and the thrombin-thrombomodulin complex both contribute to TAFI activation in whole blood model thrombi. **J Thromb Haemost**, Nov 2012.

VERDÚ, J. et al. Association between the Thr325Ile and Ala147Thr polymorphisms of the TAFI gene and the risk of venous thromboembolic disease. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 14, n. 4, p. 494-5, Oct 2008.

VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. **Physiol Rev**, v. 93, n. 1, p. 327-58, Jan 2013.

WALKER, I. D. Thrombophilia in pregnancy. **J Clin Pathol**, v. 53, n. 8, p. 573-80, Aug 2000.

WARMUTH, M.; MAD, P.; WILD, C. Systematic review of the efficacy and safety of fibrinogen concentrate substitution in adults. **Acta Anaesthesiol Scand**, Dec 2011.

WENG, X.; ODOULI, R.; LI, D. K. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 3, p. 279.e1-8, Mar 2008.

WYPASEK, E. et al. Fibrinogen Beta-Chain -C148T Polymorphism is Associated with Increased Fibrinogen, C-Reactive Protein, and Interleukin-6 in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting. **Inflammation**, Apr 2011.

YUAN, X. D. et al. [Relationship between multi-locus fibrinogen polymorphisms and fibrinogen concentration, molecular reactivity and cerebral infarction]. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 30, n. 9, p. 582-7, Sep 2009.

ZUGAIB, M. **Obstetricia**. 2. 2012. 1344.

ANEXOS

Anexo 1. Formulário de entrevista

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo 3. Aprovação nos comitês de ética em pesquisa

Anexo 4. Tabelas complementares

Anexo 5. Ficha do aluno

Anexo 6. Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss

Anexo 7. Informações para os membros de Banca Julgadoras de Mestrado/Doutorado

Anexo 1. Formulário de entrevista

Data entrevista: ____/____/____ N°. Registro no HC-USP ou CS: _____

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

1. Data de nascimento: ____/____/____
2. Idade (anos): _____
3. **Cor de pele mulher:** (0) branca (1) negra (2) parda (3) amarela (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 em semanas:
1º _____; 2º _____; 3º _____; 4º _____; 5º _____; 6º _____; 7º _____; 8º _____; 9º _____
18. Número de 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. Qual é a **DATA DO ÚLTIMO** parto ou aborto? _____
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 gestações (2) sim, sem estar gestante (3) não sabe (4) decorrente do aborto

27. Você fuma? (0) não (1) sim _____

28. Nº de cigarros por dia _____

29. Você 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 _____

(5) outras, _____ vezes por semana _____

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

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

32. Você está tomando ácido fólico atualmente? (0) não (1) sim Qual é 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 problema na tireóide? (0) não (1) sim () hipertireoidismo () hipotireoidismo

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido

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 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

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

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*, *RFC1*, *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 20____.

Assinatura do sujeito da pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Assinatura da Testemunha

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

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

Anexo 3. Aprovação nos comitês de ética em pesquisa

Diretoria Clínica

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq.

PARECER

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

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

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Mario Henrique Burlacchinil de Carvalho

PESQUISADOR (A) EXECUTANTE: Débora de Lima Robi

DEPARTAMENTO: Obstetrícia e Ginecologia

CONSIDERAÇÕES DO RELATOR APROVADAS PELO PLENÁRIO:

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

CONCLUSÃO Devolver para atender as solicitações.

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

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

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 011-30696431: ramais 16,17,18 e 20 fax: 011 - 3069 6492 ramal 26
e-mail: cappesa@hcnel.usp.br / secretariacappesa@hcnel.usp.br/secretariacappesa2@hcnel.usp.br/tania.silva@hcnel.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 08/2008

São Paulo, 12 de fevereiro de 2008.

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

Prezado(a) Senhor(a),

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

Atenciosamente,

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício CEP/FC/06/2011

São Paulo, 07 de fevereiro de 2011.

Ilmo(a). Sr(a).

Profa. Dra. Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
FBC

I. **Projeto:** "Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente – Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6" (Protocolo CEP/FCF/451);

II. **Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara;

III. **Assunto:** Solicitação das seguintes alterações:

- a) Inclusão no projeto de novas determinações laboratoriais e de outros polimorfismos;
- b) Inclusão dos pesquisadores: Jessica Carrilho Britto, Silvana Henrique Cavalcante, Juliano Felix Bertinato, Fernanda Midori Seino e Nathalia Sierra Monteiro;
- c) Alteração do título do projeto. "Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente – Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6; hemostasia e processo inflamatório".

IV. **Situação do Protocolo:** Alterações APROVADAS em reunião de 7/2/2011.

Atenciosamente,

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Parecer CEP/FCF/129/2011
Protocolo CEP/FCF/451
CAAE – 0127.0.162.018-07

I. Título do Projeto: "Fatores genéticos e bioquímicos associados ao aborto espontâneo recorrente – Metabolismo da homocisteína, folato, cobalamina e vitamina B6; hemostasia e processo inflamatório" (Protocolo CEP/FCF/451).

II. Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara.

III. Equipe:

- a. mestrandos: Kelma Cordeiro da Silva Giusti; Robson José Lázaro; Juliano Felix Bertinato e Nathalia Sierra Monteiro.
- b. alunos de iniciação científica: Fernanda Midori Seino; Jéssica Carrilho Britto; Silvana Henrique Cavalcante; Marina Boacnin; Guilherme Wataru Gomes e Mario Guilherme Lamberti.

IV. Situação: Protocolo aprovado em 24/09/2007.

Alterações aprovadas em: 29 de outubro de 2007, 11 de fevereiro de 2008 e 07 de fevereiro de 2011.

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

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

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 vida 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.

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, trimetoprima, 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.

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. Tabelas suplementares

Tabela 1. Distribuição das mulheres dos grupos aborto primário e aborto secundário segundo as causas previamente conhecidas de AER, 2008 - 2011

Condição para exclusão	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139
Cariotipo mulher		
Normal	104 (88,9)	136 (97,8)
Alterado	9 (7,7)	3 (2,2)
Sem informação	4 (3,4)	0 (0,0)
Cariotipo homem		
Normal	113 (96,6)	135 (97,1)
Alterado	0 (0,0)	2 (1,4)
Sem informação	4 (3,4)	2 (1,4)
Malformações uterinas		
Ausente	91 (77,8)	103 (74,1)
Presente	23 (19,7)	35 (25,2)
Sem informação	3 (2,6)	1 (0,7)

Frequências absolutas e relativas entre parêntese

Tabela 2. Frequência da combinação de genótipos dos polimorfismos *FGB* - 455G>A, e *FGB* -148C>T, **utilizando modelo de herança dominante**, em mulheres com aborto primário, aborto secundário e do grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011

Polimorfismo	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Grupo controle n= 264	P valor
<i>FGB -455G>A</i>				
GG	89 (76,1)	107 (77,0)	205 (77,7)	0,943
GA + AA	28 (23,9)	32 (23,0)	59 (22,3)	
<i>FGB -148C>T</i>				
CC	83 (70,9)	101 (72,7)	199 (75,4)	0,632
CT+TT	34 (29,1)	38 (27,3)	65 (24,6)	

O teste de Qui-quadrado foi realizado para a comparação entre as frequências do grupo estudo e controle.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos três grupos;

Tabela 3. Frequência da combinação de genótipos dos polimorfismos *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* 505 G>A, **utilizando modelo de herança dominante**, em mulheres do grupo com AER e do grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011

Polimorfismo	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Grupo controle n= 264	P valor
THBD 1418C>T				
CC	88 (75,2)	106 (76,3)	204 (77,3)	0,905
CT + TT	29 (24,8)	33 (23,7)	60 (22,7)	
SERPINE1 4G/5G[#]				
5G5G	46 (39,7)	54 (38,8)	111 (42,2)	0,780
4G5G + 4G4G	70 (60,3)	85 (61,2)	152 (57,8)	
CBP2 505 G>A				
GG	53 (45,3)	59 (42,4)	110 (41,7)	0,802
GA + AA	64 (54,7)	80 (57,6)	154 (58,3)	

O teste de Qui-quadrado foi realizado para a comparação entre as frequências do grupo estudo e controle.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos dois grupos;

[#] Foi realizado a genotipagem de 518 amostras deste polimorfismo, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma do grupo aborto primário e outra do grupo controle.

Tabela 4. Frequência da combinação de genótipos dos polimorfismos *FGB* - 455G>A e *FGB* -148C>T, **utilizando modelo de herança recessivo**, em mulheres do grupo com AER e do grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011.

Polimorfismo	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Grupo controle n= 264	P valor
<i>FGB -455G>A</i>				
AA	2 (1,7)	5 (3,6)	7 (2,7)	0,641
GG + GA	115 (98,3)	134 (96,4)	257 (97,3)	
<i>FGB -148C>T</i>				
TT	4 (3,4)	5 (3,6)	7 (2,7)	0,847
CC + CT	113 (96,6)	134 (96,4)	257 (97,3)	

O teste de Qui-quadrado foi realizado para a comparação entre as frequências do grupo estudo e controle.

As distribuições dos genótipos estão em equilíbrio de Hardy Weinberg nos três grupos;

Tabela 5. Frequência da combinação de genótipos dos polimorfismos *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* 505G>A, utilizando modelo de herança recessivo, em mulheres do grupo com AER e do grupo controle, São Paulo, 2008 – 2011.

Polimorfismo	Aborto primário n= 117	Aborto secundário n= 139	Grupo controle n= 264	P valor
THBD 1418C>T				
TT	2 (1,7)	2 (1,4)	1 (0,4)	0,355
CC + CT	115 (98,3)	137 (98,6)	263 (99,6)	
SERPINE1 4G/5G[#]				
4G4G	19 (16,4)	19 (13,7)	37 (14,1)	0,803
5G5G + 4G5G	97 (83,6)	120 (86,3)	226 (85,9)	
CBP2 505 G>A				
AA	10 (8,5)	17 (12,2)	29 (11,0)	0,630
GG + GA	107 (91,5)	122 (87,8)	235 (89,0)	

O teste de Qui-quadrado foi realizado para a comparação entre as frequências do grupo estudo e controle.

[#] Foi realizado a genotipagem de 518 amostras deste polimorfismo, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma do grupo aborto primário e outra do grupo controle.

Tabela 6. Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2) de acordo com a distribuição dos genótipos utilizando um modelo de herança dominante para os polimorfismos *FGB* -455G>A , *FGB* -148C>T, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* 505 G>A como variáveis independentes, São Paulo, 2008 -2011

Polimorfismo	Genótipo	Modelo 1		Modelo 2	
		OR (IC 95%)	P valor	OR (IC 95%)	P valor
<i>FGB</i> -455G>A	GG	1,00	-	1,00	-
	GA + AA	1,09 (0,65 – 1,83)	0,734	0,96 (0,59 – 1,57)	0,878
<i>FGB</i> -148C>T	CC	1,00	-	1,00	-
	CT + TT	1,25 (0,77 – 2,04)	0,363	0,87 (0,55 – 1,38)	0,552
<i>THBD</i> 1418C>T	CC	1,00	-	1,00	-
	CT + TT	1,12 (0,67 – 1,86)	0,661	0,95 (0,58 – 1,54)	0,818
<i>SERPINE1</i> 4G/5G [#]	5G5G	1,00	-	1,00	-
	4G5G + 4G4G	1,11 (0,71 – 1,74)	0,642	0,87 (0,57 – 1,32)	0,515
<i>CBP2</i> 505 G>A	GG	1,00	-	1,00	-
	GA + AA	0,86 (0,56 – 1,34)	0,509	1,03 (0,68 – 1,57)	0,880

Aborto primário incluiu 117 mulheres não gestantes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas até a 20ª semana de gestação sem ter tido um feto viável. Aborto secundário incluiu 139 mulheres não gestantes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas até a 20ª semana de gestação com pelo menos um feto viável. Grupo controle incluiu 264 mulheres férteis saudáveis não grávidas que tiveram pelo menos dois partos de termo e sem história de perdas fetais.

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%).

[#] Para este polimorfismo foi realizado a genotipagem de 518 amostras, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma no grupo controle e uma no grupo aborto primário.

Tabela 7. Regressão logística univariada para variável dependente ter aborto primário (Modelo 1) ou ter aborto secundário (Modelo 2) de acordo com a distribuição dos genótipos utilizando um modelo de herança recessiva para os polimorfismos *FGB* -455G>A , *FGB* -148C>T, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 4G/5G e *CBP2* 505 G>A como variáveis independentes, São Paulo, 2008 -2011

Polimorfismo	Genótipo	Modelo 1		Modelo 2	
		OR (IC 95%)	P valor	OR (IC 95%)	P valor
<i>FGB</i> -455G>A	AA	1,00	-	1,00	-
	GG + GA	0,83 (0,17 – 4,14)	0,834	1,37 (0,43 – 4,40)	0,597
<i>FGB</i> -148C>T	TT	1,00	-	1,00	-
	CC + CT	1,30 (0,37 – 4,53)	0,681	0,73 (0,23 – 2,34)	0,597
<i>THBD</i> 1418C>T	TT	1,00	-	1,00	-
	CC + CT	4,57 (0,41 – 50,95)	0,216	0,26 (0,23 – 2,90)	0,274
<i>SERPINE1</i> 4G/5G [#]	4G4G	1,00	-	1,00	-
	5G5G + 4G5G	1,20 (0,66 – 2,19)	0,559	0,87 (0,57 – 1,32)	0,515
<i>CBP2</i> 505 G>A	AA	1,00	-	1,00	-
	GG + GA	0,76 (0,36 – 1,61)	0,757	0,89 (0,47 – 1,68)	0,709

Aborto primário incluiu 117 mulheres não gestantes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas até a 20ª semana de gestação sem ter tido um feto viável. Aborto secundário incluiu 139 mulheres não gestantes com três ou mais perdas gestacionais consecutivas até a 20ª semana de gestação com pelo menos um feto viável. Grupo controle incluiu 264 mulheres férteis saudáveis não grávidas que tiveram pelo menos dois partos de termo e sem história de perdas fetais.

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%).

[#] Para este polimorfismo foi realizado a genotipagem de 518 amostras, sendo que não foi possível obter o genótipo de duas amostras, sendo uma no grupo controle e uma no grupo aborto primário.

Tabela 8. Frequência da combinação de genótipos para os polimorfismos *FGB* -455G>A, *FGB* -148C>T, *THBD* 1418C>T, *SERPINE1* 1 4G/5G e *CBP2* 505 G>A, **utilizando um modelo de herança dominante**, segundo o período em que ocorreu a perda nos grupos de AER primário e secundário, São Paulo, 2008 – 2012

Polimorfismo	Aborto primário		P valor	Aborto secundário		P valor
	Aborto ate 12 semanas n= 79	Aborto entre 13 e 20 semanas n= 38		Aborto ate 12 semanas n= 80	Aborto entre 13 e 20 semanas n= 59	
<i>FGB</i> 455G>A						
GG	61 (77,2)	28 (73,7)	0,817**	57 (71,3)	50 (84,7)	0,069**
GA + AA	18 (22,8)	10 (26,3)		23 (28,8)	9 (15,3)	
<i>FGB</i> 148C>T						
CC	58 (73,4)	25 (65,8)	0,395**	55 (68,8)	46 (78,0)	0,253**
CT+TT	21 (26,6)	13 (34,2)		25 (31,3)	13 (22,0)	
<i>THBD</i> 1418C>T						
CC	60 (75,9)	28 (73,7)	0,821**	56 (70,0)	50 (84,7)	0,047**
CT + TT	19 (24,1)	10 (26,3)		24 (30,0)	9 (15,3)	
<i>SERPINE1</i> 4G/5G[#]						
5G5G	30 (38,0)	16 (43,2)	0,685**	30 (37,5)	24 (40,7)	0,728**
4G5G + 4G4G	49 (62,0)	21 (56,8)		50 (62,5)	35 (59,3)	
<i>CBP2</i> 505 G>A						
GG	40 (50,6)	13 (34,2)	0,114**	31 (38,8)	28 (47,5)	0,386**
GA + AA	39 (49,4)	25 (65,8)		49 (61,3)	31 (52,5)	

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

Anexo 5. Ficha do aluno

08/04/13

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7493511/1 - Juliano Felix Bertinato

Email: julianobertinato@usp.br
Data de Nascimento: 31/07/1987
Cédula de Identidade: RG - 6080882142 - RS
Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Sul
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Diploma de Farmacêutico - Universidade do Vale do Itajaí - Santa Catarina - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 07/02/2011
Início da Contagem de Prazo: 07/02/2011
Data Limite: 07/08/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elvira Maria Guerra Shinohara - 07/02/2011 até o presente.
E.Mail: emguerra@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/02/2011
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 08/02/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 07/02/2011
Matrícula de Acompanhamento em 11/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/02/2013

Impresso em: 08/04/13 17:36:05

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7493511/1 - Juliano Felix Bertinato

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HEP5800-2/3	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2011	10/05/2011	90	6	90	A	N	Concluída
FBC5793-10/1	Tópicos em Análises Clínicas I	15/03/2011	27/06/2011	30	2	90	A	N	Concluída
EDM5102-2/4	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	17/03/2011	27/04/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5755-1/2	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	05/04/2011	10/05/2011	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
HEP5801-1/1	Análise Estatística em Epidemiologia Utilizando o Ambiente R-I (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	25/05/2011	06/07/2011	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5722-2/1	Controle Hormonal da Resposta Inflamatória	02/08/2011	22/08/2011	60	4	78	A	N	Concluída
MPT5793-1/1	Citogenética I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/08/2011	27/09/2011	120	8	100	B	N	Concluída
FBC5757-3/2	Tópicos em Análises Clínicas II	09/08/2011	29/11/2011	30	2	92,8	A	N	Concluída
FBC5706-5/1	Farmacogenética Cardiovascular	30/08/2011	10/10/2011	90	0	0	-	N	Matrícula cancelada
MCMS903-1/1	Das Hemorragias às Vaso-Oclusões: O Espectro das Anormalidades da Hemostasia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/10/2011	23/10/2011	45	3	87,5	A	N	Concluída
EDM5791-5/8	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	29/06/2012	120	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5748-3/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	24/04/2012	05/06/2012	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5723-5/1	Mecanismos das Interações Patológicas entre Células Endoteliais, Elementos Circulantes e sua Importância em Processos Vaso-occlusivos	11/06/2012	01/07/2012	75	5	86,5	A	N	Concluída
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	100	A	N	Concluída
FBC5736-2/2	Alterações Bioquímicas e Moleculares nas Anemias	14/08/2012	18/09/2012	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	45
Estágios:			
Total:	0	25	45

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 11/02/2013

Impresso em: 09/04/13 07:43:19

Anexo 6. Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss

Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss

Elvira M. Guerra-Shinohara¹; Juliano Felix Bertinato¹; Carolina Tosin Bueno¹; Kelma Cordelro da Silva¹; Mário Henrique Burlacchini de Carvalho²; Rossana Pulcinelli Vieira Francisco²; Marcelo Zugaib²; Alvaro Cerda¹; Vânia Maris Morelli³

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil; ²Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, SP, Brasil; ³Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Departamento de Oncologia Clínica e Experimental, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil

Summary

Recurrent pregnancy loss (RPL) is a multifactorial condition. The effect of antithrombin (*SERPINC1*), protein C (*PROC*), thrombomodulin (*THBD*) and tissue factor pathway inhibitor (*TFPI*) single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the risk of RPL is thus far unknown. Our objective was to determine the association of SNPs in the above mentioned genes with RPL. We included 117 non-pregnant women with three or more consecutive losses prior to 20 weeks of pregnancy without a previous history of carrying a fetus to viability, and 264 healthy fertile non-pregnant women who had at least two term deliveries and no known pregnancy losses. The *PROC* (rs1799809 and rs1799808), *SERPINC1* (rs2227589), *THBD* (rs1042579) and *TFPI* (rs10931292, rs8176592 and rs10153820) SNPs were analysed by Real Time PCR. Genotype frequencies for *PROC* 2418A>G, *PROC* 2405C>T, *THBD* 1418C>T, *TFPI* T-33C and *TFPI* C-399T SNPs were similar in cases and

controls. The carriers of *SERPINC1* 786A allele (GA + AA genotypes) had an increased risk for RPL (odds ratio [OR]: 1.77, 95% confidence interval [CI]: 1.05–3.00, $p=0.034$) while women carrying the *TFPI*-287C allele (TC + CC genotypes) had a protection effect on having RPL (OR: 0.46, 95% CI: 0.26–0.83, $p=0.009$). The TCC haplotype for *TFPI* T-33C/ *TFPI* T-287C/ *TFPI* C-399T SNPs was less frequent in cases (5.7%) than in controls (11.6%) (OR: 0.45, 95% CI: 0.23–0.90, $p=0.025$). In conclusion, our data indicate that *SERPINC1* 786G>A variant increases the risk for RPL, while *TFPI* T-287C variant is protective; however, further studies are required to confirm our findings.

Keywords

Antithrombin, protein C, thrombomodulin, tissue factor pathway inhibitor, gene polymorphisms, recurrent pregnancy loss, miscarriages

Correspondence to:
Elvira Maria Guerra-Shinohara
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil
Tel.: +55 11 3091 3785
E-mail: emguerra@usp.br

Received: March 21, 2012
Accepted after major revision: July 28, 2012
Published online: August 23, 2012
doi:10.1160/TH12-03-0177
Thromb Haemost 2012; 108: 693–700

Introduction

Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined as three or more consecutive spontaneous abortions prior to the 20th week. The prevalence of RPL is 1–2% in women of childbearing age (1).

RPL is a multifactorial condition that could be influenced by several factors, such as autoimmune disorders, gynecological and endocrinological abnormalities, chromosome aberrations, elevated total homocysteine levels, infections and haemostasis disorders including inherited thrombophilia as variants of *F5* 1691G>A (factor V Leiden) and *F2* 20210G>A polymorphisms. Despite several etiologies recognised as a cause of RPL, approximately 40–50% of all cases remain unexplained (1).

Pregnancy is characterised by a hypercoagulable state in which levels of some coagulation factors and fibrinolytic inhibitors are increased, whereas levels of the natural anticoagulant free protein S (PS) are decreased (2).

Control of thrombin generation is essential for normal haemostasis and it is achieved by the anticoagulant pathways. The tis-

sue factor pathway inhibitor (TFPI) is an endothelial-associated protein that downregulates the initial phase of coagulation by inhibiting tissue factor-factor VIIa complex in a factor Xa-dependent manner (3). Protein C (PC) pathway also controls thrombin generation. Activation of PC occurs on the endothelial cell surface, where thrombin binds to thrombomodulin (TM) converting PC zymogen into its active form, known as activated protein C (APC). Free PS serves as an APC cofactor in the inactivation of factor Va and factor VIIIa by selective proteolysis (4). Another mechanism of coagulation control is achieved by antithrombin (AT), a multifunctional serpin (serine protease inhibitor) that inhibits essentially all the active enzymes of the coagulation pathway (4).

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in haemostasis-related genes may influence the generation of thrombin and the coagulant status (5). Given the key role of TFPI, PC, TM and AT in regulating thrombin generation as well as the limited data regarding their association with RPL, the aim of this study was to determine the effect of SNPs in *SERPINC1* (AT), *PROC* (PC), *THBD* (TM) and *TFPI* genes on the risk of RPL.

Materials and methods

Study population

This is a case-control study which included 117 unrelated non-pregnant women with three or more consecutive losses prior to 20 weeks of pregnancy without a previous history of carrying a fetus to viability (primary RPL) who were evaluated in the Prenatal Care Unit at the Hospital of the University of São Paulo (PC-HUSP). The control group was comprised of 264 unrelated healthy fertile women recruited by the researchers who were users of Public Health Service (PHS) or employees of the University of São Paulo, who had at least two term deliveries and no known pregnancy losses as well as known medical history of thrombosis, diabetes, hypertension, cancer and autoimmune disorders.

It is important to address that both cases and controls were from the general urban population of São Paulo City, the largest metropolitan area of the country, located in the Southeast region of Brazil. Controls were recruited in the same PHS where cases were initially seen. In the PHS, cases were then referred to the PC-HUSP for investigating the causes of RPL whereas controls were submitted to routine gynecological evaluation. In cases and controls, data on age, reproductive history, current use of tobacco, alcohol intake (per week), self-reported skin colour, height and weight were obtained through an interview by the use of a standard questionnaire. Concerning ethnicity, each woman was self-identified as White, Intermediate, Black, or Yellow according to the skin color categories defined by the Brazilian Census (6). The study was carried out from November 2008 to September 2011.

The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committees (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Paulo e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), and written informed consent was obtained from all participants prior to the inclusion in the study.

Blood sampling and genotype determination

Samples were drawn using the BD Vacutainers System® with EDTA for genomic DNA extraction using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (PreAnalytix/Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol.

Polymorphisms were analysed by Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using validated TaqMan SNP genotyping assays: *PROC* rs1799809 (C_1841974_10), *PROC* rs1799808 (C_1841973_10), *SERPINC1* rs2227589 (C_16180170_20), *THBD* rs1042579 (C_2531431_10), *TFPI* rs10931292 (C_30695640_10), *TFPI* rs8176592 (C_2671092_10) and *TFPI* rs10153820 (C_11514522_10).

F5 1691G>A (rs6025) and F2 20210G>A (rs1799963) SNPs were determined by a polymerase chain reaction followed by restriction digests (PCR-RFLP) as described previously (7, 8).

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using Statistical Package for Social Sciences 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Age and body mass index (BMI) of women from RPL and control groups were compared by Student's t-test. Data were displayed as a mean and a 95% confidence interval (CI).

The RPL group was subdivided according to the period of pregnancy loss in early (< 13 weeks) and late (≥13 weeks) groups. The frequencies of women in each group according to range of body mass index (BMI), use of tobacco, frequency of alcohol intake and self-reported skin colour were compared using the Chi-square test or Likelihood ratio test.

The distribution of genotypes for each polymorphism was checked for Hardy-Weinberg Equilibrium by the Chi-square test. The frequency of genotypes for each polymorphism in cases and controls was compared using Likelihood ratio, Fisher's Exact test or the Chi-square test. Haplotype frequencies and the standardised disequilibrium coefficient (D') for pair-wise linkage disequilibrium were assessed by the Expectation-Maximization (EM) algorithm using the Haploview Software, and we considered linkage disequilibrium when $D' \geq 0.50$. The function *haplo.glm* of the program Haplo Stats (9) was used to assess the effect of haplotypes on risk of having RPL.

The odds ratios (OR) and 95% CI for each SNP were calculated by logistic regression models.

In a subsequent analysis, 35 women were excluded because of one or more of the following causes: uterine malformations ($n=23$), abnormalities in woman karyotype ($n=9$) or in partner karyotype ($n=5$). Results from statistical analyses were similar to the group of 117 women, except for *SERPINC1* 786G>A SNP. We thus presented the results of the 117 women with RPL history. A p -value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Women of RPL and control groups presented similar age and BMI (►Table 1). There was no significant difference between the two groups regarding the frequencies of self-reported skin colour, use of tobacco and alcoholic intake per week (►Table 1).

Genotype and allelic frequencies for *PROC* 2418A>G, *PROC* 2405C>T, *THBD* 1418C>T, *TFPI* T-33C, *TFPI* C-399T, *F5*1691G>A and *F2* 20210G>A SNPs were similar between RPL and control groups (►Table 2).

Women carrying *SERPINC1* 786A allele (GA + AA genotypes) had increased risk for RPL (OR: 1.77, 95% CI: 1.05 – 3.00, $p=0.034$) when compared with GG genotype carriers (►Table 3). However, when women with uterine malformations or carriers of karyotype abnormalities (woman or her partner) were excluded from the analyses (82 women from RPL group and 264 women from control group), the association between carriers of 786A allele and RPL was attenuated (OR: 1.55, 95% CI: 0.84 – 2.85, $p=0.158$).

TFPI -287TT genotype was more frequent in RPL women (85.5%) when compared with the control group (73.1%, ►Tables 2 and 3). As shown in ►Table 3, women with TC + CC genotypes had a protection effect on having RPL (OR: 0.46, 95% CI: 0.26 – 0.83, $p=0.009$). When women with uterine malformations or carriers of karyotype abnormalities (woman or her partner) were excluded, this relationship remained (OR: 0.47, 95% CI: 0.24 – 0.91, $p=0.026$). Furthermore, *TFPI* T-287C SNP was in strong linkage disequilibrium with *TFPI* C-399T SNP ($D'=1.0$ and $r^2=0.035$) but not with *TFPI* T-33C SNP ($D'=0.411$).

The TCC haplotype for *TFPI* T-33C/ *TFPI* T-287C/ *TFPI* C-399T SNPs was more frequent in the control group (11.6%) than in RPL women (5.7%). The presence of each copy of the haplotype TCC confers protection against RPL when compared to reference haplotype TTC (OR: 0.45, 95% CI: 0.23 – 0.90, $p=0.025$, ►Table 4).

As in univariate logistic regression analyses, the *SERPINC1* 786G>A and *TFPI* T-287C were associated with RPL, a model of multivariate forward conditional logistic regression was carried out with both SNPs showing that odds ratios remained practically unchanged for *SERPINC1* 786G>A (OR: 1.85, 95% CI: 1.08 – 3.15, $p=0.025$) and *TFPI* T-287C (OR: 0.45, 95% CI: 0.25 – 0.81, $p=0.007$). Further inclusion of self-reported skin colour and the known causes of thrombophilia as genotypes for *F5* 1691G>A and *F2* 20210G>A SNPs in the model of multivariate forward conditional logistic regression did not modify the results (*SERPINC1* 786G>A OR: 1.76, 95% CI: 1.01 – 3.04, $p=0.044$ and *TFPI* T-287C OR: 0.47, 95% CI: 0.26 – 0.84, $p=0.011$).

Early and late period of pregnancy loss was not related to *SERPINC1* 786G>A SNP, *TFPI* T-287C SNP or *TFPI* haplotypes in overall RPL women ($n=117$) or in the RPL restricted group (after the exclusion of other causes of RPL, $n=82$) ($p>0.05$).

Discussion

In this case-control study, *SERPINC1* 786G>A and *TFPI* T-287C SNPs were associated with RPL. To the best of our knowledge, this is the first study which evaluated the relation between SNPs in *SERPINC1* (AT), *PROC* (PC), *THBD* (TM) and *TFPI* genes and the risk of RPL.

It is important to address that frequencies of minor alleles for *PROC* 2405C>T, *THBD* 1418C>T, *SERPINC1* 786G>A, *TFPI* T-33C, *TFPI* T-287C, *TFPI* C-399T, *F5* 1691G>A and *F2* 20210G>A SNPs were similar to those reported by other studies carried out in the United States, Europe, Australia and Brazil (10–21).

Although in the present study the analyses of the distribution of self-reported skin colour were similar between RPL and the control groups, we evaluated the influence of this variable on the association between gene polymorphisms and RPL without significant results. Ethnicity has been suggested to influence the results of candidate gene on association studies; therefore, stratification of the sample population using ancestry informative markers have been used to overcome this issue. However, it is noteworthy that

Table 1: General characteristics of women included in recurrent pregnancy loss (RPL) and control groups.

	RPL group (N=117)	Control group (N=264)	P-value
Age (years)	32.3 (31.1 – 33.4)	33.4 (32.7 – 34.1)	0.075
Self-reported skin colour			
White	52 (44.4)	144 (54.5)	0.126
Black	25 (21.4)	35 (13.3)	
Intermediate	39 (33.3)	80 (30.3)	
Yellow	1 (0.9)	5 (1.9)	
BMI (kg/m ²)	25.6 (24.7 – 26.4)	25.1 (24.6 – 25.6)	0.339
Range of BMI (kg/m ²)			
<19.0	4 (3.4)	13 (4.9)	0.875
19.0 to 24.9	58 (50.0)	132 (50.0)	
25.0 to 30.9	41 (35.3)	94 (35.6)	
31.0 to 36.9	9 (7.8)	20 (7.6)	
37.0 or more	4 (3.4)	5 (1.9)	
Use of tobacco	18 (15.4)	40 (15.2)	0.965
Frequency of alcohol intake			
Less than once a week	31 (56.4)	42 (44.2)	0.075
Once or twice a week	19 (34.5)	51 (53.7)	
Three to four times a week	3 (5.5)	1 (1.1)	
Five to six times a week	1 (1.8)	1 (1.1)	
Everyday	1 (1.8)	0	
Number of consecutive pregnancy losses			
3	64 (54.7)		
4	22 (18.8)		
5	19 (16.2)		
6	5 (4.2)		
7	3 (2.6)		
8	2 (1.7)		
9	1 (0.9)		
13	1 (0.9)		
Period of losses			
Early (<13 weeks)	79 (67.5)		
Late (≥13 weeks)	38 (32.5)		

BMI: body mass index, RPL: recurrent pregnancy loss. The values of numeric variables (age and BMI) were presented as a mean and (95% CI). The values of other variables are presented as the number of subjects (percentage). The comparison between groups was done using Student's t-test (numeric variables) and the Chi-Square test (use of tobacco and range of BMI). The Likelihood ratio test was used for comparing the frequencies of alcohol intake per week and self-reported skin color. There was missing data for BMI in RPL group.

SNPs	SNP ID	RPL group (N=117)	Control group (N=264)	P-value
<i>PROC</i> 2418A>G	rs1799809			
AA		38 (32.5)	90 (34.1)	0.869*
AG		22 (18.8)	44 (16.7)	
GG		57 (48.7)	130 (49.2)	
Allele frequency				
A		98 (41.9)	224 (42.4)	0.889*
G		136 (58.1)	304 (57.6)	
<i>PROC</i> 2405C>T	rs1799808			
CC		41 (35.0)	94 (35.6)	0.679*
CT		59 (50.5)	123 (46.6)	
TT		17 (14.5)	47 (17.8)	
Allele frequency				
C		141 (60.3)	311 (58.9)	0.725*
T		93 (39.7)	217 (41.1)	
<i>SERPINC1</i> 786G>A	rs2227589			
GG		87 (74.4)	221 (83.7)	0.110**
GA		28 (23.9)	40 (15.2)	
AA		2 (1.7)	3 (1.1)	
Allele frequency				
G		202 (86.3)	482 (91.3)	0.037*
A		32 (13.7)	46 (8.7)	
<i>THBD</i> 1418C>T	rs1042579			
CC		88 (75.2)	204 (77.3)	0.427**
CT		27 (23.1)	59 (22.3)	
TT		2 (1.7)	1 (0.4)	
Allele frequency				
C		203 (86.8)	467 (88.4)	0.508*
T		31 (13.2)	61 (11.6)	
<i>TFPI</i> T-287C	rs10931292			
TT		100 (85.5)	193 (73.1)	0.010**
TC		17 (14.5)	67 (25.4)	
CC		0 (0)	4 (1.5)	
Allele frequency				
T		217 (92.7)	453 (85.8)	0.007*
C		17 (7.3)	75 (14.2)	
<i>TFPI</i> T-33C	rs8176592			
TT		54 (46.2)	119 (45.1)	0.144*
TC		44 (37.6)	119 (45.1)	
CC		19 (16.2)	26 (9.8)	

Table 2: Genotype and allele frequencies of the *PROC* 2418A>G, *PROC* 2405C>T, *SERPINC1* 786G>A, *THBD* 1418C>T, *TFPI* T-287C, *TFPI* T-33C, *TFPI* C-399T, *F5* 1691G>A and *F2* 20210G>A single nucleotide polymorphisms in RPL cases and controls.

the Brazilian population is highly admixed (22), which is the result of five centuries of interethnic crosses of peoples from three continents: the European colonisers mainly represented by the Portuguese, the African slaves, and the autochthonous Amerindians (23–25). In a recent study, Giolo et al (25) analysed patterns of human genetic variation in Brazil using SNP data of 138 individu-

als from Sao Paulo, the same city where our study was carried out, and 991 individuals from 11 populations of the International HapMap Project (25). In sampled individuals from Sao Paulo, mean values of Amerindian, African and European ancestries varied, respectively, from 0.15 to 0.17; 0.24 to 0.27; and 0.56 to 0.61 in two model markers (25). Considering that subjects of the present study

Table 2: Continued

SNPs	SNP ID	RPL group (N=117)	Control group (N=264)	P-value
Allele frequency				
T		152 (65.0)	357 (67.6)	0.473*
C		82 (35.0)	171 (32.4)	
<i>TFPI</i> C-399T	rs10153820			
CC		75 (64.1)	169 (64.0)	0.719*
CT		35 (29.9)	84 (31.8)	
TT		7 (6.0)	11 (4.2)	
Allele frequency				
C		185 (79.1)	422 (79.9)	0.785*
T		49 (20.9)	106 (20.1)	
<i>F5</i> 1691G>A	rs6025			
GG		113 (96.6)	255 (96.6)	1.000***
GA		4 (3.4)	9 (3.4)	
Allele frequency				
G		230 (98.3)	519 (98.3)	1.000***
A		4 (1.7)	9 (1.7)	
<i>F2</i> 20210G>A	rs1799963			
GG		112 (95.7)	258 (97.7)	0.324***
GA		5 (4.3)	6 (2.3)	
Allele frequency				
G		229 (97.8)	522 (98.9)	0.321***
A		5 (2.2)	6 (1.1)	

SNP: single nucleotide polymorphisms; RPL: recurrent pregnancy loss. RPL group included 117 non-pregnant women with three or more consecutive losses prior to 20 weeks of pregnancy without carrying a fetus to viability (primary RPL). Control group included 264 healthy fertile non-pregnant women who had at least two term deliveries and no known pregnancy losses. The number of subjects and (percentage) of genotypes were presented for each SNP. The genotypes and alleles frequencies were compared by using the Chi-square test*, the Likelihood test** or the Fisher's Exact Test***. The distribution of genotypes for polymorphisms are in Hardy Weinberg Equilibrium, except for *PROC* 2418A>G polymorphism in both groups.

SNP: single nucleotide polymorphisms; RPL: recurrent pregnancy loss. RPL group included 117 non-pregnant women with three or more consecutive losses prior to 20 weeks of pregnancy without carrying a fetus to viability (primary RPL). Control group included 264 healthy fertile non-pregnant women who had at least two term deliveries and no known pregnancy losses. The number of subjects and (percentage) of genotypes were presented for each SNP. The genotypes and alleles frequencies were compared by using the Chi-square test*, the Likelihood test** or the Fisher's Exact test***. The distribution of genotypes for polymorphisms are in HardyWeinberg Equilibrium, except for *PROCR* 2418A>G polymorphism in both groups.

came from the same geographic region of the above mentioned report, we believe that our cases and controls had a very similar ethnic admixture, not only with each other, but also with the population studied by Giolo et al. (25).

Regarding the regulation of the thrombin generation, AT deficiency is a risk factor for venous thrombosis (4) and more recently it has also been implicated in adverse pregnancy outcomes (2, 26). *SERPINC1* 786G>A SNP was related to low levels of AT and anti-Xa activity in carriers of A allele (GA + AA genotypes) in Spanish Caucasian blood donors (27). Furthermore, *SERPINC1* 786A allele was associated with an increased risk of venous thrombosis in three large case-control studies (19). In our study, *SERPINC1* 786A allele (GA + AA genotypes) was associated with an increased risk for RPL. However, this association was attenuated when women with uterine malformations or carriers of karyotype abnormalities were excluded, probably because of a decrease in the power of the study due to the lower number of cases.

TFPI modulates the initiation of coagulation induced by the tissue factor. A low plasma level of total *TFPI* (28–31) and free *TFPI* (28, 32) has been associated with an increased risk of venous thrombosis. An experimental study showed that mice deficient in *TFPI* died *in utero* owing to intrauterine coagulopathy and vascular disintegrity (33), a finding that clearly demonstrated the pathophysiological importance of *TFPI*.

Several SNPs in the *TFPI* have been described (12, 14, 16, 17, 34). For instance, the *TFPI* -33CC genotype has been associated with increased levels of total *TFPI*, and carriers of C allele had a significantly lower risk of venous thrombosis as compared with TT genotype (12). The *TFPI* C-399T SNP was neither associated to the antigen plasma level of *TFPI* nor to the risk for venous thrombosis (34). In our case-control, neither *TFPI* T-33C nor C-399T SNPs had any impact on the risk of RPL.

TFPI T-287C SNP is located on the promoter region and it is involved in the regulation of *TFPI* expression (35). In a case-control

Table 3: Univariate logistic regression models for dependent variable: having RPL according to genotypes distributions of investigated SNPs as independent variables.

Models	SNPs	Genotypes	RPL group (N=117)	Control group (N=264)	OR (95% CI)	P-value
1	PROC 2418A>G	AA	38 (32.5)	90 (34.1)	1.00	
		AG + GG	79 (67.5)	174 (65.9)	1.08 (0.68 – 1.71)	0.759
2	PROC 2405C>T	CC	41 (35.0)	94 (35.6)	1.00	
		CT + TT	76 (65.0)	170 (64.4)	1.03 (0.65 – 1.62)	0.916
3	SERPINC1 786G>A	GG	87 (74.4)	221 (83.7)	1.00	
		GA + AA	30 (25.6)	43 (16.3)	1.77 (1.05 – 3.00)	0.034
4	THBD 1418C>T	CC	88 (75.2)	204 (77.3)	1.00	
		CT + TT	29 (24.8)	60 (22.7)	1.12 (0.67 – 1.86)	0.661
5	TFPI T-287C	TT	100 (85.5)	193 (73.1)	1.00	
		TC + CC	17 (14.5)	71 (26.9)	0.46 (0.26 – 0.83)	0.009
6	TFPI T-33C	TT	54 (46.2)	119 (45.1)	1.00	
		TC + CC	63 (53.8)	145 (54.9)	0.96 (0.62 – 1.48)	0.845
7	TFPI C-399T	CC	75 (64.1)	169 (64.0)	1.00	
		CT + TT	42 (35.9)	95 (36.0)	0.97 (0.63 – 1.57)	0.987
8	F5 1691G>A	GG	113 (96.6)	255 (96.6)	1.00	
		GA	4 (3.4)	9 (3.4)	1.00 (0.30 – 3.33)	0.996
9	F2 20210G>A	GG	112 (95.7)	258 (97.7)	1.00	
		GA	5 (4.3)	6 (2.3)	1.92 (0.57 – 6.42)	0.290

SNPs: single nucleotide polymorphisms, RPL: recurrent pregnancy loss. RPL group Included 117 non-pregnant women with three or more consecutive losses prior to 20 weeks of pregnancy without carrying a fetus to viability (primary RPL). Control group Included 264 healthy fertile non-pregnant women who had at least two term deliveries and no known pregnancy losses.

Haplotypes	TFPI T-33C	TFPI T-287C	TFPI C-399T	Frequencies In groups		OR	95% CI	P-value
				RPL	Control			
Haplotype a (wildtype)	T	T	C	0.422	0.408	1.00		
Haplotype b	C	T	C	0.299	0.249	1.12	0.76–1.65	0.591
Haplotype c	T	T	T	0.171	0.153	1.08	0.66–1.75	0.767
Haplotype d	T	C	C	0.057	0.116	0.45	0.23–0.90	0.025
Haplotype e	C	T	T	0.036	0.048	0.78	0.32–2.00	0.634
Haplotype f	C	C	C	0.013	0.026	0.56	0.13–2.50	0.455

RPL: recurrent pregnancy loss.

Table 4: Frequencies of haplotypes for T-33C, T-287C and C-399T SNPs in the TFPI gene in RPL and control groups.

on arterial thrombosis, the –287C allele was associated with higher levels of total TFPI as compared to the common TT genotype among controls, although no relationship was found between this SNP and coronary artery disease (17). In a case-control on venous thrombosis, even though the frequency of carriers of the –287C allele was higher among controls, no significant association was found between this SNP and the thrombotic risk (18). Thus far, the role of TFPI T-287C SNP in venous thrombotic disease is unsettled and further studies with larger sample size are warranted.

In the present study, we found a lower frequency of –287C allele in women with RPL compared with controls. An important extent of our work is the evaluation of TFPI haplotypes generated by the TFPI T-33C, T-287C and C-399T SNPs. Although there is limited information about the TFPI haplotype effect on the physiological function of the TFPI protein and consequently its potential role in RPL, an early *in vitro* approach using a reporter gene system (35) could explain some of our findings. In that study, it was demonstrated that HEK293T and CHO-K1 cells transfected with the ha-

plotype containing the -287C allele variant had increased transcriptional activity. In the present study, women carrying the TFPI -33T/-287C/-399C haplotype that contains -287C allele variant had a reduced RPL risk (OR: 0.45, 95% CI: 0.23 – 0.90). The other haplotype carrying -287C allele variant (CCC) also had a tendency to be protective (OR: 0.56, 95% CI: 0.13 – 2.50) but it did not reach statistical significance, possibly due to small sample size. The protective effect conferred by -287C allele could be a consequence of an increased transcription and consequently higher TFPI plasma levels, however, this hypothesis must be confirmed by further investigations.

TFPI levels vary during normal pregnancy (36, 37). In a recent report, among healthy women, TFPI levels were reduced in the 1st trimester of pregnancy when compared to the levels in non-pregnant women or in pregnant women of the 3rd trimester (38). Furthermore, free PS decreases during normal pregnancy (37, 39). PS acts not only as a cofactor of APC, but more recently it has also been described as a cofactor of TFPI (40).

Decreased free TFPI and PS levels in the absence of factor V Leiden were associated with a reduced sensitivity for APC (41). Particularly with respect to free TFPI, a reduction in its levels could result in an increase in factor Xa formation (41). Since factor Xa protects factor Va from inactivation by APC (42) by selectively blocking cleavage at Arg506 (43), increased factor Xa generation might lead to a reduced sensitivity for APC (41). Normal pregnancy (39) and the use of oral contraceptives (41) are examples of acquired conditions associated with a reduced sensitivity for APC in the absence of factor V Leiden, which is a phenotype that increases the risk of venous thrombosis (44, 45). Interestingly, in a study involving non-pregnant women mainly with a history of early RPL, decreased total TFPI levels were associated with an elevated thrombin generation and reduced sensitivity for APC (46).

TFPI is present in the human placenta. Lower mRNA and protein expression were found in the placental section in women with gestational vascular complication when compared to women with normal pregnancy (47). This finding could indicate a protection role of TFPI in the pregnancy outcome.

Regarding the possible mechanisms by which variant genes induce RPL, we hypothesize that since TT genotype for *TFPI* T-287C SNP has been associated with decreased TFPI levels (17), the presence of this genotype in a context of reduced free PS levels, particularly in the 1st and 2nd trimesters of pregnancy, would favour a hypercoagulable state through mechanisms related to an impaired TFPI function and a reduced sensitivity for APC. Moreover, *TFPI* -287TT genotype could have a potential role in downregulating TFPI expression at the placenta level. This haemostasis imbalance would be more pronounced if we consider the presence of variant of *SERPINC1* 786G>A SNP, which has been associated with reduced AT levels (27).

We would like to address a main strength of our study which includes a considerable number of cases with three or more consecutive losses prior to 20 weeks of pregnancy without carrying a fetus to viability and controls who had at least two term deliveries and no known pregnancy losses. Furthermore, we evaluated in the same population several SNPs in genes that encode proteins related

What is known about this topic?

- Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) have been associated with an increased risk of venous thrombosis.
- TFPI is lower in the first trimester of pregnancy when compared with non-pregnant women.
- Variant of *SERPINC1* 786G>A SNP has been associated with a higher risk of venous thrombosis while TT genotype for *TFPI* T-287C SNP has been associated with lower total TFPI plasma levels.

What does this paper add?

- Our data indicate that the *SERPINC1* 786G>A variant is associated with an increased risk for recurrent pregnancy loss, while the *TFPI* T-287C variant is protective.

to the control of thrombin generation. The limitation of this study is that inhibitors plasma levels were not measured.

In conclusion, our data indicate that *SERPINC1* 786G>A variant is associated with an increased risk for RPL while *TFPI* T-287C variant is protective. Prospective studies are warranted to evaluate the effect of *SERPINC1* 786G>A and *TFPI* T-287C SNPs on inhibitors plasma levels in women with and without RPL history during the 1st and 2nd trimesters of pregnancy.

Acknowledgements

This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2007/57605-0), Brazil. KCS and CTB were granted with fellowships by CNPq. JFB was granted with a fellowship by CAPES. We thank all of the women who participated in this study and the staff of Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, especially Dr. Antonio Gomes Amorim-Filho.

Conflicts of Interest

None declared.

References

1. Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia-associated pregnancy wastage. *Fertil Steril* 1999; 72: 765–774.
2. Battistelli EM, Bauer KA. Thrombophilias in pregnancy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25: 323–333.
3. Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 233–242.
4. Dahlback B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood* 2008; 112: 19–27.
5. Segers C, van Oerle R, ten Cate H, et al. Thrombin generation as an intermediate phenotype for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2010; 103: 114–122.
6. IBGE. Available at: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/>. Accessed May 9, 2012.
7. Andrade FL, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST, et al. Prothrombin mutant, factor V Leiden, and thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brazil. *Am J Hematol* 1998; 59: 46–50.
8. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996; 88: 3698–3703.

9. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, et al. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 425–434.
10. Pomp ER, Doggen CJ, Vos HL, et al. Polymorphisms in the protein C gene as risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2009; 101: 62–67.
11. Heit JA, Pettersen TM, Owen WG, et al. Thrombomodulin gene polymorphisms or haplotypes as potential risk factors for venous thromboembolism: a population-based case-control study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 710–717.
12. Amerziane N, Seguin C, Borgel D, et al. The -33T->C polymorphism in intron 7 of the TFPI gene influences the risk of venous thromboembolism, independently of the factor V Leiden and prothrombin mutations. *Thromb Haemost* 2002; 88: 195–199.
13. Lincoff LF, Adams MJ, Scorgie FE, et al. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor gene are associated with venous thromboembolism in the antiphospholipid syndrome and carriers of factor V Leiden. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18: 559–564.
14. Opstad TB, Pettersen AA, Weiss T, et al. Gender differences of polymorphisms in the TF and TFPI genes, as related to phenotypes in patients with coronary heart disease and type-2 diabetes. *Thromb J* 2010; 8: 7.
15. Altmäe S, Salumets A, Björsten K, et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitors TFPI and TFPI2 in human secretory endometrium—possible link to female infertility. *Reprod Sci* 2011; 18: 666–678.
16. Moatti D, Seknadji P, Galand C, et al. Polymorphisms of the tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene in patients with acute coronary syndromes and in healthy subjects – Impact of the V264M substitution on plasma levels of TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 862–869.
17. Moatti D, Haidar B, Fumeron F, et al. A new T-287C polymorphism in the 5' regulatory region of the tissue factor pathway inhibitor gene. Association study of the T-287C and C-399T polymorphisms with coronary artery disease and plasma TFPI levels. *Thromb Haemost* 2000; 84: 244–249.
18. Opstad TB, Eilertsen AL, Heibraaten E, et al. Tissue factor pathway inhibitor polymorphisms in women with and without a history of venous thrombosis and the effects of postmenopausal hormone therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2010; 21: 516–521.
19. Benzer ID, Bare LA, Doggen CJ, et al. Gene variants associated with deep vein thrombosis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 1306–1314.
20. Gadelha T, André C, Juci AA, et al. Prothrombin 20210A and oral contraceptive use as risk factors for cerebral venous thrombosis. *Cerebrovasc Dis* 2005; 19: 49–52.
21. Pereira AC, Lourenço DM, Maffei FH, et al. A transcobalamin gene polymorphism and the risk of venous thrombosis. The BRATROS (Brazilian Thrombosis Study). *Thromb Res* 2007; 119: 183–188.
22. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Br J Med Biol Res* 2009; 42: 870–876.
23. Parra FC, Amado JC, Lambertucci JR, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 177–182.
24. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; 6: e17063.
25. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 111–116.
26. Sabadell J, Casellas M, Alijotas-Reig J, et al. Inherited antithrombin deficiency and pregnancy: maternal and fetal outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 149: 47–51.
27. Antón AI, Teruel R, Corral J, et al. Functional consequences of the prothrombotic SERPINC1 rs2227589 polymorphism on antithrombin levels. *Haematologica* 2009; 94: 589–592.
28. Dahm A, Van Hylckama Vlieg A, Bendz B, et al. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2003; 101: 4387–4392.
29. Amini-Nekoo A, Futers TS, Moia M, et al. Analysis of the tissue factor pathway inhibitor gene and antigen levels in relation to venous thrombosis. *Br J Haematol* 2001; 113: 537–543.
30. Amini Nekoo A, Iles D. Analysis of a T-287C polymorphism in the tissue factor pathway inhibitor gene and identification of a repressor element in the promoter. *Thromb Res* 2008; 121: 813–819.
31. Zakai NA, Lutsey PL, Folsom AR, et al. Total tissue factor pathway inhibitor and venous thrombosis. The Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Thromb Haemost* 2010; 104: 207–212.
32. Hoke M, Kyrle PA, Minar E, et al. Tissue factor pathway inhibitor and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 2005; 94: 787–790.
33. Huang ZF, Higuchi D, Lasky N, et al. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption produces intrauterine lethality in mice. *Blood* 1997; 90: 944–951.
34. Miyata T, Sakata T, Kameda K, et al. C-399T polymorphism in the promoter region of human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene does not change the plasma TFPI antigen level and does not cause venous thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 80: 345–346.
35. Skretting G, Stavik B, Landvik NE, et al. Functional characterization of polymorphisms in the human TFPI gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397: 106–111.
36. Sandset PM, Helligren M, Uvebrandt M, et al. Extrinsic coagulation pathway inhibitor and heparin cofactor II during normal and hypertensive pregnancy. *Thromb Res* 1989; 55: 665–670.
37. Rosenkranz A, Hiden M, Leschnik B, et al. Calibrated automated thrombin generation in normal uncomplicated pregnancy. *Thromb Haemost* 2008; 99: 331–337.
38. Ittel A, Bretelle F, Gris JC, et al. Increased risk of gestational vascular complications in women with low free tissue factor pathway inhibitor plasma levels out of pregnancy. *Thromb Haemost* 2011; 105: 66–71.
39. Walker MC, Garner PR, Keely EJ, et al. Changes in activated protein C resistance during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 162–169.
40. Hackeng TM, Seré KM, Tans G, et al. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3106–3111.
41. de Visser MC, van Hylckama Vlieg A, Tans G, et al. Determinants of the APTT- and ETP-based APC sensitivity tests. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1488–1494.
42. Nesheim ME, Canfield WM, Kisiel W, et al. Studies of the capacity of factor Xa to protect factor Va from inactivation by activated protein C. *J Biol Chem* 1982; 257: 1443–1447.
43. Rosing J, Hoekema L, Nicolaes GA, et al. Effects of protein S and factor Xa on peptide bond cleavages during inactivation of factor Va and factor VaR506Q by activated protein C. *J Biol Chem* 1995; 270: 27852–27858.
44. de Visser MC, Rosendaal FR, Bertina RM. A reduced sensitivity for activated protein C in the absence of factor V Leiden increases the risk of venous thrombosis. *Blood* 1999; 93: 1271–1276.
45. Rodeghiero F, Tosetto A. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation are independent risk factors for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 1999; 130: 643–650.
46. Gardiner C, Cohen H, Austin SK, et al. Pregnancy loss, tissue factor pathway inhibitor deficiency and resistance to activated protein C. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2724–2726.
47. Aharon A, Lanir N, Drugan A, et al. Placental TFPI is decreased in gestational vascular complications and can be restored by maternal enoxaparin treatment. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2355–2357.