

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS A TROMBOFILIAS EM
MULHERES COM PERDAS GESTACIONAIS**

Caroline Gross Dutra

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dra Lavínia Schüler-Faccini
Porto Alegre, março de 2012.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Médica Populacional e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Lavínia por me orientar e me presentear com todo seu conhecimento científico, além de me ensinar que é preciso ter calma nas horas mais difíceis. Muito obrigada!

À Maria Teresa pela co-orientação e por ter confiado a mim este trabalho. Pela paciência e compreensão nas vezes em que tudo ficava mais complicado!

Ao CNPq e à Capes pelo investimento no projeto e pela bolsa de mestrado.

Aos professores do Departamento de Genética pelos ensinamentos e ao Elmo que está sempre disposto a ajudar e resolver eventuais problemas.

Aos colegas e amigos de laboratório Fernanda, Mari, Alice, Marcelo, Virgínia, Juliano, Dânae, Bibi, Nicolle e Nelson pelas rodas de chimarrão e muitas risadas!

Ao Lucas que me ajudou (e muito) nas coletas, bancada e análises.

Aos ginecologistas da Unidade de Reprodução Humana do Hospital Fêmeina Andréa Nácul, Simone Mattiello e Marcelo Soares, pela seleção de pacientes com AR.

Ao ginecologista Augusto Nácul do Serviço de Planejamento Familiar do Hospital Fêmeina pela seleção de pacientes do grupo controle.

À todos os residentes (R1) de 2011 do Hospital Fêmeina que também ajudaram muito na seleção de pacientes.

Às mulheres que participaram do projeto e que nos receberam muito bem e se interessaram pela pesquisa.

Às amigas Gerta Frantz, Norma Pagnoncelli, Mônica Martins, Marcela Fortis, Tatiana Studzinski, Cristine Machado e Joana Chagas pelos momentos de descontração.

Ao Marcos Höher pelas dicas de caráter clínico na elaboração do texto.

À minha família pelo apoio e por estarem sempre presentes em todas as etapas e conquistas da minha vida. Não chegaria onde estou sem vocês! À Darinha, que sempre pedia colo e carinho durante a leitura de artigos.

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS.....	II
AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE TABELAS.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO.....	8
I.1. Abortamentos recorrentes ou de repetição.....	10
I.2. Trombofilias.....	11
I.3. MTHFR e o ciclo do ácido fólico.....	13
I.4. Fator V de Leiden e Fator II (protrombina).....	16
I.5 Polimorfismos em eNos (-786C>T e 894G>T).....	18
CAPÍTULO II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	21
CAPÍTULO III. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	27
CAPÍTULO V. DISCUSSÃO.....	32
CAPÍTULO VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	49
Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	50
Anexo 2 – Ficha de entrevista.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AGOG: *American College of Obstetricians and Gynaecologists*

AR: abortamento recorrente ou de repetição

ASRM: *American Society for Reproduction Medicine*

DNA: *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

eNOS: *endothelial nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase endotelial)

FII: Fator II

FV: Fator V

FVL: Fator V de Leiden

hCG: *human chorionic gonadotropin* (gonadotrofina coriônica humana)

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IMC: índice de massa corporal

mRNA: *messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucléico mensageiro)

MTR: metionina sintase

MTHFR: metilenotetrahidrofolato redutase

MTRR: metionina sintase redutase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato

NO: *nitric oxide* (óxido nítrico)

NOS: *nitric oxide synthase* (óxido nítrico sintase)

NOS-3: *nitric oxide synthase-3* (óxido nítrico sintase-3)

OR: *odds ratio* (razão de chances)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

RCOG: *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists*

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

Real time PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SAM: s-adenosilmetionina

THF: tetrahidrofolato

5-MTHF: 5 metilenotetrahidrofolato

5-MTHFR: 5 metilenotetrahidrofolato redutase

5,10-MTHF: 5,10-metilenotetrahidrofolato

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Polimorfismos relacionados às trombofilias hereditárias com suas respectivas frequências na população brasileira.....	19
TABELA 2: Características da população de estudo.....	28
TABELA 3: Frequências genotípicas e alélicas em mulheres com AR (casos) e mulheres sem AR (controles).....	30
TABELA 4: Frequências alélicas em mulheres <35 anos na última gestação.....	31
TABELA 5: Distribuição de MTHFR 677C>T para mulheres com abortamentos recorrentes e controles.....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Etiologia dos Abortamentos Recorrentes.....	11
FIGURA 2: Representação esquemática do ciclo do ácido fólico.....	15
FIGURA 3: Representação esquemática da rota de coagulação sanguínea.....	18

RESUMO

A definição para abortamento é o término da gravidez antes de 24 semanas de gestação ou com peso fetal inferior a 500g. A incidência exata dos abortamentos não é conhecida devido à dificuldade em reconhecer concepções e perdas no início da gravidez. Abortamento Recorrente (AR) é definido por dois ou mais abortamentos consecutivos, sendo considerada uma enfermidade e não estando incluída entre os diferentes tipos de infertilidade. De todas as gestações reconhecidas, 25% resultam em abortamento sendo que, 5% dessas mulheres terão a experiência de ter dois abortamentos consecutivos e 1% terão três ou mais perdas. Em aproximadamente 50% dos casos de AR não é encontrada uma causa explicável, sendo então classificada como idiopática. Trombofilias consistem em desordens hemostáticas as quais levam a uma maior tendência a processos tromboembólicos, podendo também estar relacionadas a AR. O objetivo geral do presente trabalho é investigar mutações em genes relacionados a fenômenos de trombofilia em mulheres com duas ou mais perdas gestacionais. Nosso número amostral foi de 145 mulheres com no mínimo dois abortamentos consecutivos e 135 sem histórico de perdas gestacionais, oriundas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Hospital Fêmina. O DNA genômico foi obtido de amostra de sangue e de saliva. Os genótipos foram determinados através de *real time* PCR. As frequências encontradas dos alelos investigados no grupo de casos foram: 29,3% para o polimorfismo 677T do gene MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase), 1,0% para FVL (Fator V de Leiden) do gene FV, 0,4% para 20210A do gene FII (protrombina), 31,4% para -786C e 23,8% para 894T do gene eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), as quais estão relacionados a trombofilias e têm sido associados a AR. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados entre mulheres com AR e grupo controle. Também o hábito de fumar combinado à presença dos alelos de risco para as variantes aqui estudadas não parece ser determinante na enfermidade, mas o número de mulheres que relataram consumir

álcool sugere que a substância pode estar relacionada à AR. Nossos dados não concordam com a proposição de que esses polimorfismos estejam relacionados com AR em nossa população.

ABSTRACT

The definition for abortion is the termination of pregnancy before 24 weeks of pregnancy or fetal weight less than 500g. The exact incidence of miscarriages is not known due to the difficulty in recognizing conceptions and losses at the beginning of the pregnancy. Recurrent Miscarriage (RM) is defined by two or more consecutive miscarriages, being considered an illness and is not included among the different types of infertility. Of all recognized pregnancies, 25% result in abortions and 5% of these women will have the experience of having two consecutive miscarriages and 1% has three or more losses. In approximately 50% of cases of RM is not found a cause that can be explained, and is then classified as idiopathic. Thrombophilias consist of haemostatic disorders which lead to a greater tendency to thromboembolic processes, and may also be related to the RM. The general objective of this study is to investigate mutations in genes related to the phenomena of thrombophilia in women with two or more miscarriages. Our sample size was 145 women with at least two consecutive miscarriages and 135 without a history of miscarriages, from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and the Hospital Fêmina. Genomic DNA was obtained from a sample of blood and saliva. The genotypes were determined by real time PCR. The observed frequencies of the polymorphisms investigated were: 29,3% to 677T MTHFR gene (methylenetetrahydrofolate reductase), 1,0% to FVL (Factor V Leiden) FV gene, 0,4% to 20210A FII gene (prothrombin), 31,4% to -786T and 23,8% to 894T eNOS gene (endothelial nitric oxide synthase), all of which are related to the thrombophilias and have been associated with RM. We found no statistically significant differences on genotypic and allelic frequencies studied polymorphisms between women with RM and control group. Also the habit of smoking combined with the presence of alleles of risk for the variants studied here does not seem to be the decisive factor in illness, but the number of women who reported consuming alcohol suggests that the substance is related to the RA. Our data do

not agree with the proposition that these polymorphisms are related with RM in our population.

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

A definição para abortamento é o término da gravidez antes de 24 semanas de gestação ou com peso fetal inferior a 500g (WHO, 1977; RCOG, 2006). No entanto, para alguns autores, esta definição tem como limite a idade gestacional de 20 semanas (Silver *et al.*, 2011).

De acordo com Passos *et al.* (2001), abortamentos recorrentes ou de repetição (AR) consistem na ocorrência de duas ou mais perdas gestacionais consecutivas, antes da viabilidade fetal (<24 semanas de gestação).

As diretrizes do *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* (RCOG, 2006), definem as perdas gestacionais como:

- **Gestação química:** gestação com beta-hCG positivo seguida por um negativo, sem confirmação por ultrassonografia;
- **Saco vazio:** visualização de saco gestacional e ausência do embrião;
- **Perda fetal:** identificação prévia do embrião ou feto seguida pela parada dos batimentos cardíacos;
- **Perda gestacional precoce:** abortamento com menos de 12 semanas de gestação;
- **Perda gestacional tardia:** abortamento com mais de 12 semanas de gestação;
- **Gestação de localização desconhecida:** com beta-hCG positivo, mas sem a visualização do saco gestacional.

A incidência exata dos abortamentos não é conhecida devido à dificuldade em reconhecer concepções e perdas no início da gravidez. A principal causa dos abortamentos são alterações cromossômicas, cuja incidência é de até 50% nas perdas precoces e não têm taxas significativas nas tardias. Estima-se que 25% das gestações clinicamente reconhecidas resultam em abortamento espontâneo. Quando consideradas aquelas gestações que não são reconhecidas clinicamente esta proporção pode ser maior. Apenas 30% de todas as concepções resultam em um bebê nascido vivo (Macklon *et al.*, 2002; ASRM, 2008; Ford and Schust, 2009).

I.1 Abortamentos recorrentes ou de repetição (AR)

AR é definido por dois ou mais abortamentos consecutivos, sendo considerada como uma enfermidade, não estando incluída entre os diferentes tipos de infertilidade. De todas as gestações reconhecidas, 25% resultam em abortamento sendo que, 5% dessas mulheres terão a experiência de ter dois abortamentos consecutivos e 1% terão três ou mais perdas (ASRM, 2008). Em aproximadamente 50% dos casos não é encontrada uma causa explicável, sendo então classificada como idiopática (Ford and Schust, 2009). Dados disponíveis até o momento sugerem que mulheres com AR nulíparas têm um risco de perda na gestação subsequente de 30% após dois abortamentos e de 33% após três perdas (ACOG, 2001). Assim, aconselha-se a investigação a partir de duas perdas quando a paciente ainda não tem filhos (Ford and Schust, 2009).

A figura 1 resume as causas conhecidas de AR. Para muitos casos será encontrada uma causa para AR, sendo um número pequeno de etiologias reconhecidas. As causas para AR podem ser genéticas, anatômicas, endócrinas, infecciosas, autoimunes e trombofilias (Ford and Schust, 2009). Entre 2% e 4% dos casos estão associados a causas genéticas, como rearranjo estrutural cromossômico balanceado. Anormalidades anatômicas uterinas são encontradas em 10% a 15% das mulheres com AR, onde o septo uterino é a anomalia uterina congênita mais relacionada a AR e responsável por 76% das perdas entre as mulheres com distorções da cavidade uterina (Lin, 2004). Síndrome dos ovários policísticos e diabetes *mellitus* estão entre os problemas endocrinológicos que podem levar a episódios de AR. Outros, como defeito de fase lútea, hipotireoidismo e hiperprolactinemia também compõem a lista que implica em aproximadamente 17% a 20% (Stephenson, 1996). Algumas infecções causadas pelo vírus do herpes, toxoplasmose e rubéola estão associadas a abortamentos espontâneos esporádicos (Ford and Schust, 2009). No entanto, ainda não está clara qual a incidência de AR relacionados a infecções maternas (Fox-Lee and Schust, 2007). A Síndrome do anticorpo antifosfolípideo é uma doença autoimune a qual se tem dado mais atenção, pois está diretamente relacionada a AR. Entre 3% e 15% dos AR são causados por esta síndrome autoimune (ASRM, 2008). Já

entre as trombofilias hereditárias, estão deficiência ou defeitos dos fatores antitrombina, proteínas C e S e algumas mutações em genes relacionados à rota da coagulação sanguínea (Tranquilli *et al.*, 2010).

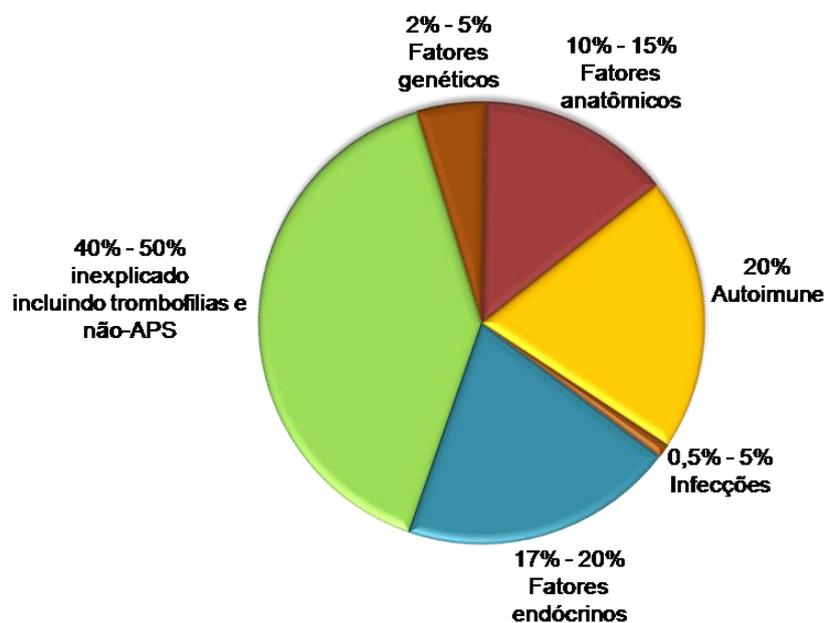


Figura 1: Etiologia dos Abortamentos Recorrentes.

APS, *antiphospholipid antibody syndrome* (adaptado de Ford and Schust, 2009).

I.2 Trombofilias

O estabelecimento do sistema vascular útero-placentário adequado e sua eficiente manutenção são essenciais para o prosseguimento de uma gestação. São as modificações próprias da gestação e o estado de hipercoagulabilidade que mantém a circulação sanguínea placentária, devido à elevação dos fatores pró-coagulantes e à redução dos fatores anticoagulantes e fibrinólise (Krabbendam *et al.*, 2005). Em uma gravidez normal há um aumento no débito cardíaco e uma redução da resistência vascular sistêmica da mulher. Após o parto, estes níveis voltam ao normal gradualmente (Clapp and Capeless, 1997).

Desde as primeiras semanas de gestação ocorrem grandes mudanças na hemodinâmica, devido principalmente aos níveis de metabólitos vasoativos da gestante. Este fenômeno consiste de redução na pressão arterial e resistência vascular sistêmica e pulmonar, ocorrendo por aproximadamente quatro semanas

(Phippard *et al.*, 1986) e estendendo-se até a metade da gravidez (Clapp and Capeless, 1997). O estado ativo de vasodilatação da vascularização arterial periférica é mantido pela contínua síntese de óxido nítrico (NO) (Vallance *et al.*, 1989). As células endoteliais liberam o NO e dessa maneira mantém a função endotelial e manutenção da diminuição da resistência vascular periférica. Sua disfunção parece estar envolvida na hipertensão gestacional ou pré-eclâmpsia (McCarthy *et al.*, 1993; Roberts and Redman, 1993). A atividade pró-coagulante é uma importante característica da gravidez (Grandone *et al.*, 1998). Durante uma gestação normal há um aumento dos fatores de coagulação I, II, VII, VIII, IX e XII juntamente com um decréscimo nos níveis de proteína S e inibição da fibrinólise (Bremme, 2003). Estas mudanças fisiológicas de hipercoagulabilidade podem estar relacionadas a um desenvolvimento adequado da placenta e promover um mecanismo seguro de homeostase ao longo da gestação (Tranquilli *et al.*, 2010).

As trombofilias podem ser hereditárias ou adquiridas. Consistem em desordens hemostáticas as quais levam a uma maior tendência a processos tromboembólicos (Krabbendam *et al.*, 2005). Alguns polimorfismos relacionadas a trombofilias, como o FVL (Fator V de Leiden) do gene FV, 677C>T do gene MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase), 20210G>A do gene FII (protrombina), e 894G>T, e -786C>T do gene eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), têm sido associados a AR (Lissalde-Lavigne *et al.*, 2005; Sehirali *et al.*, 2005; Yenicesu *et al.*, 2009; Raffaelli *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010;). Além disso, as deficiências de anticoagulantes da proteína C, proteína S e antitrombina III também mostram um risco aumentado para trombose e são incluídas como causas de AR (Laurino *et al.*, 2005; Rai and Reagan, 2006).

As combinações de trombofilias podem favorecer o aumento de perdas fetais recorrentes. De acordo com Laurino *et al.* (2005) a identificação de uma ou mais trombofilias hereditárias nas mulheres com AR pode ajudar nas investigações para compor os fatores de risco, incluindo deficiências em anticorpos antifosfolipídios, hiperhomocisteinemia, antitrombina III, proteína C e proteína S.

Na tabela 1 estão representados os polimorfismos relacionados às trombofilias hereditárias, bem como suas respectivas frequências nas populações

brasileira e geral caucasianas. Para os polimorfismos do fator V e do fator II, não foram localizados estudos que estimem as frequências na população brasileira, sendo utilizada a frequência encontrada em um estudo de caso controle (Sabino *et al.*, 2006).

I.3 MTHFR e o ciclo do ácido fólico

O gene metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) humano está localizado no cromossomo 1 na posição 1p36.3 e codifica a proteína 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase, a qual cataliza a redução de 5,10-MTHF (5,10-metilenotetrahidrofolato) para 5-MTHF (5-metiltetrahidrofolato) utilizando como agente redutor o NADPH (Matthews,1986). O metiltetrahidrofolato doa um grupamento metil no metabolismo da homocisteína para metionina e a deficiência de MTHFR pode levar a um aumento nos níveis de homocisteína no sangue (Jacques *et al.*, 1996). Uma variante do 5-MTHFR (5-metilenotetrahidrofolato redutase) localizada no éxon 4 do gene, descrita em 1988 por Kang *et al.*, foi associada a doenças da artéria coronariana. Esta foi denominada termolábil devido a sua baixa estabilidade quando submetida a altas temperaturas em ensaios *in vitro*. Pacientes homozigotos para o polimorfismo que codifica a proteína termolábil têm apenas 50% da atividade enzimática normal, conseqüentemente levando a um quadro de hiperhomocisteinemia.

O folato, também chamado de vitamina B9, é a forma circulante do ácido fólico no organismo. É uma vitamina essencial para o homem por ser um anti-anêmico, além de ser um fator de crescimento. Sua ação como coenzima é fundamental na divisão celular, pois age na biossíntese de purinas e ácido deoxitimidílico, necessários na síntese de DNA e RNA. O papel do folato é de grande importância na síntese e no reparo do DNA (Krishnaswamy and Madhavan, 2001; Craciunescu *et al.*, 2004). Durante a gravidez, o folato é indispensável para o rápido crescimento e multiplicações celulares do feto. Devido a seu envolvimento na síntese de DNA e RNA, é preciso um suprimento adequado de folato na gestação, pois também está envolvido no aumento do número de eritrócitos, volume uterino e crescimento da placenta (Scholl and

Johnson, 2000). O folato não é produzido no organismo, devendo então ser obtido através da dieta. As principais fontes de ácido fólico são os vegetais verdes, cereais, fígado e algumas frutas cítricas (Finglas *et al.*, 2003).

A figura 2 representa o ciclo do ácido fólico, o qual ocorre em duas etapas: inicia com a redução à sua forma ativa conhecida como tetrahidrofolato (TH) e então à 5,10-MTHF, após ser absorvido pelo organismo. A enzima metilenotetrahidrofolato redutase, codificada pelo gene MTHFR, tem uma atividade muito importante, pois é ela que catalisa a conversão do 5,10-MTHF a 5-MTHF, forma circulante do ácido fólico. O produto final são grupos metil utilizados na metilação do DNA e biossíntese de nucleotídeos (Goyette *et al.*, 1994). Na segunda etapa a homocisteína é remetilada a metionina através da reação catalisada pela metionina sintase, codificada pelo gene MTR. Assim, ocorre a produção de SAM (S-adenosilmetionina), o qual serve de doador universal de grupos metil para metilação de DNA e a vitamina B12 entra no ciclo como um cofator na sua produção (Leclerc *et al.*, 1996). A metionina sintase se torna inativa ao longo do ciclo porque o seu cofator, a cobalamina é oxidada ao longo do ciclo e inativa a enzima. Esta última é restaurada após sua redução e metilação promovida pela SAM. É a enzima metionina sintase redutase, codificada pelo gene MTRR requerida durante o processo de redução da metionina sintase que a mantém funcionando (Leclerc *et al.*, 1996). Para completar, a cistationina β -sintase é outra enzima importante no ciclo do ácido fólico, pois participa na biotransformação da homocisteína, condensando homocisteína e serina para formar cistationina durante a primeira reação de transulfuração do metabolismo da homocisteína. Esta reação é de grande importância, pois é nela que haverá a redução nos níveis de homocisteína no organismo (Kraus *et al.*, 1993). Uso de ácido fólico e outras vitaminas do complexo B e polimorfismos funcionais em enzimas do metabolismo do folato são os principais responsáveis pela concentração de homocisteína no organismo (Schneede *et al.*, 2000). A homocisteína é um aminoácido sulfurado, sintetizado a partir do metabolismo da metionina. São duas as reações de metabolismo da homocisteína: transulfuração e remetilação. A reação de transulfuração é a condensação da homocisteína com a serina, formando a cistationina, sendo esta

A hiperhomocisteinemia tem sido relacionada a eventos de doenças vasculares e perdas gestacionais recorrentes. Em pacientes com AR ainda não é sabido como a hiperhomocisteinemia poderia levar aos abortamentos, no entanto postula-se que altos níveis desse aminoácido possam causar um dano endotelial seguido de tromboembolismo venoso e insuficiência placentária (Clark *et al.*, 1999; Mignini *et al.*, 2005).

Frosst *et al.*, (1995) identificaram uma substituição de C para T no nucleotídeo 677 do MTHFR em seu estudo com pacientes com doenças cardiovasculares. Esse polimorfismo leva a troca do aminoácido alanina para a valina. O alelo tanto em homozigotos quanto em heterozigotos foi correlacionada ao efeito da termolabilidade da proteína.

A frequência do alelo T do polimorfismo 677C>T na população brasileira gira em torno de 30 a 40%, variando este percentual entre grupos étnicos. No trabalho realizado em 1998 por Arruda *et al.* foi encontrada na população brasileira uma frequência de 10% do genótipo 677TT entre descendentes de europeus, de 1,45% entre afrodescendentes e de 1,2% entre indígenas. No trabalho de Brandalize *et al.* (2009) com mães de pacientes com síndrome de Down, foi encontrada uma frequência de 9,2% do genótipo 677TT e 47,2% do genótipo 677CT na população controle de mulheres euro-descendentes de Porto Alegre.

I.4 Fator V de Leiden e Fator II (protrombina)

O gene do fator V (FV), localizado no cromossomo 1 (q24,2) contém 25 éxons (Ridell *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1988; Cripe *et al.*, 1992). O FV tem função de cofator não-enzimático junto ao fator Xa durante a conversão da protrombina (Davie *et al.*, 1979). Uma alteração no gene que codifica o fator V foi descrita em 1994 por Bertina *et al.* e consiste em uma mutação de ponto (G para A no nucleotídeo 1691 com substituição de uma arginina no aminoácido 506 por glutamina) no exon 10, a qual confere uma atividade resistente à degradação pela atividade da proteína C. A proteína mutada mantém sua atividade pró-coagulante pois sua ativação se dá normalmente. No entanto ela é menos suscetível à

inativação pela proteína C, fazendo com que a atividade da protrombina persista e o estado de hipercoagulabilidade também (Camire *et al.*, 1995; Kalafatis *et al.*, 1995). Na [figura 3](#) está representada a cascata de coagulação sanguínea.

A prevalência do polimorfismo na população mundial varia entre os grupos étnicos. Entre os caucasianos a frequência é de 4 a 5%, enquanto é rara ou ausente entre asiáticos, africanos, australianos e americanos nativos. Indivíduos heterozigotos para o Fator V de Leiden têm um risco aumentado em 7 vezes de apresentar trombose venosa e este risco é aumentado em 80 vezes entre indivíduos homozigotos (Rees *et al.*, 1995).

O gene do fator II (FII ou protrombina) está localizado no cromossomo 11 (p11,2) (Royle *et al.*, 1987). A protrombina é uma proteína dependente de vitamina K e tem papel importante na coagulação e na sua regulação. Durante o estágio final da cascata de coagulação a protrombina é convertida a trombina na presença dos fatores Xa e Va, além de íons cálcio e fosfolípidos (Pajic, 2010).

A segunda forma mais relatada de trombofilia hereditária é da mutação descrita por Poort *et al.* em 1996: 20210G>A no gene da protrombina, uma substituição de G para A na posição 20210 no exon 14 da sequência. A mutação está localizada na região 3' não traduzida aumenta a concentração de protrombina circulante. Esta substituição representa uma mutação de ganho de função, onde há um maior reconhecimento do sítio de clivagem na sequência, seu processamento e acúmulo de mRNA causando um aumento na expressão da proteína (Gehring *et al.*, 2001).

A prevalência de 20210G>A na população em geral varia de 0 a 4%, sendo maior entre europeus e rara em asiáticos, africanos, australianos e americanos nativos (Rosendaal *et al.*, 1998).

Pesquisas recentes vêm estudando a prevalência de variantes no FVL e FII em mulheres com perdas gestacionais sem explicação, mas as conclusões ainda são conflitantes (Serrano *et al.*, 2011).

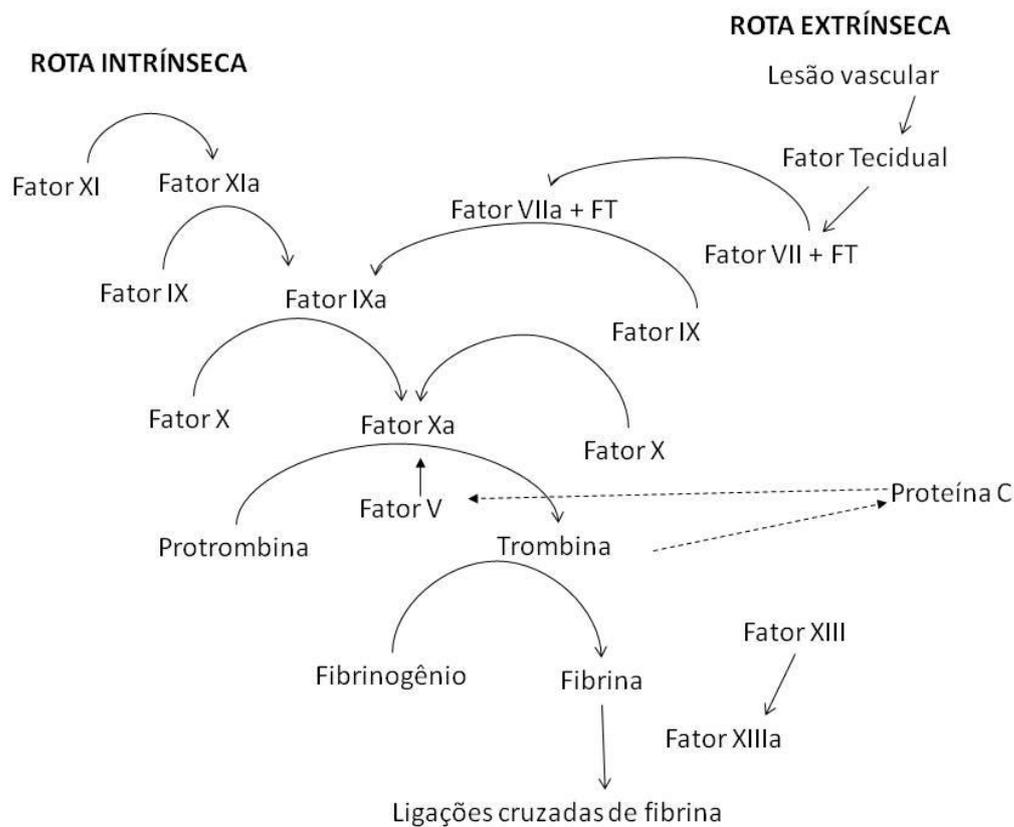


Figura 3: Representação esquemática da rota de coagulação sanguínea.

I.5 Polimorfismos em eNos (-786C>T e 894G>T)

O óxido nítrico (NO) promove o relaxamento, o crescimento e a migração das células musculares lisas vasculares, além de inibir a adesão de plaquetas e leucócitos junto ao endotélio vascular (Radomski *et al.*, 1987; Garg and Hassid, 1989; Kubes *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1996). Essas características mostram que o NO é importante no efeito do tônus vascular e pressão arterial (Hingorani *et al.*, 1999).

O gene da óxido nítrico sintase 3 (NOS-3) que codifica a isoforma eNOS é constituído de 26 éxons e localizado no cromossomo 7 (7q36) (Marsden *et al.*, 1993). Esta isoforma tem uma maior atividade na placenta durante o início da gravidez (Sahin-Toth *et al.*, 1997). É expresso no citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto e no endotélio vascular (Rossmann *et al.*, 1999). A produção de hCG (gonadotrofina coriônica humana) durante o primeiro trimestre é

modulada pela expressão de eNOS através da liberação de óxido nítrico das células do sinciciotrofoblasto. O eNOS induz a proliferação ao mesmo tempo que reduz a diferenciação das células que compõem o trofoblasto, provavelmente com uma possível sincronização do crescimento e desenvolvimento da placenta (Sanyal *et al.*, 2000).

Em 1999, Nakayama *et al.* observaram que uma substituição de uma timina por uma citosina no nucleotídeo 786 da região promotora de eNOS levava a uma redução da transcrição do gene. Essa variante foi fortemente associada com patologias coronarianas, como angina e infarto do miocárdio. O polimorfismo 894G>T que compreende a troca de uma guanina por uma timina no nucleotídeo 894 do exon 7 foi primeiro observado em 1998 por Yoshimura *et al.* e obteve uma significativa associação com espasmo coronariano.

As variantes polimórficas do gene que sintetiza o NO endotelial (eNOS) têm sido relacionadas com diversas doenças ligadas a problemas na vasodilatação. Os polimorfismos -786C>T e 894G>T são potencialmente envolvidos com a rota aterogênica (Zhang *et al.*, 2006).

Tabela 1: Polimorfismos relacionados às trombofilias hereditárias com suas respectivas frequências para os alelos de risco nas populações brasileira e geral caucasianas.

Gene	Polimorfismo	% População mundial	%População brasileira
MTHFR	677C>T (rs 1801133)	40 ¹	37,3 ²
FVL	1691G>A (rs 6025)	5 ³	1,1 ⁴
FII	20210G>A (rs 1799963)	2 ⁵	3,6 ⁴
eNOS promotor	-786C>T (rs2070744)	42 ⁶	41 ⁷
eNOS exon7	894G>T (rs1799983)	35 ⁶	29 ⁷

Fonte: ¹van der Put *et al.*, 1997; ²Arruda *et al.*, 1998; ³Rees *et al.*, 1995; ⁴Sabino *et al.*, 2006; ⁵Rosendaal *et al.*, 1998; ⁶Tanus-Santos *et al.*, 2001; ⁷Sandrim *et al.*, 2006.

Há inúmeros trabalhos relacionando AR e trombofilias. No entanto ainda não há um consenso sobre o real envolvimento destes polimorfismos que podem levar a episódios tromboembólicos com perdas gestacionais recorrentes (Kovalevski *et al.*, 2004). Segundo o *Royal College of Obstetricians and Gynaecologist (RCOG)* e o *American College of Obstetricians and Gynaecologist (ACOG)* não há evidências suficientes que testes para trombofilias sejam recomendados na investigação de AR; a *European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE)* recomenda o uso desses testes apenas para uma investigação mais aprofundada, sem ser determinante (Carp, 2009). Não há evidências de que o uso de anticoagulantes aumente as chances de prosseguimento da gravidez (de Jong *et al.*, 2011).

CAPÍTULO II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Para muitas pacientes que procuram os serviços de ginecologia é comum que a etiologia de abortamentos consecutivos permaneça incerta. As causas que podem levar aos abortamentos são inúmeras, no entanto, quando são esgotadas todas as possibilidades de rastreamento só resta a frustração da paciente e de seu médico. Ainda que diversas variantes em genes envolvidos em trombofilias já tenham sido implicadas em abortamentos consecutivos, ainda não existe um trabalho que analise conjuntamente a sua influência neste fenômeno. Outra questão a ser resolvida é qual é a proporção dos abortamentos recorrentes que pode ser atribuída a estes fatores. Assim, os objetivos do presente trabalho são:

Objetivo geral

Investigar mutações em genes relacionados a fenômenos de trombofilia e de vasodilatação em mulheres com duas ou mais perdas gestacionais consecutivas.

Objetivos específicos

1. Analisar a frequência dos polimorfismos de 677C>T do gene MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase), FVL (Fator V de Leiden) do gene FV e 20210G>A do gene FII (protrombina), também de 894G>T e -786C>T do gene eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) entre mulheres com duas ou mais perdas gestacionais consecutivas e em mulheres com pelo menos dois filhos e sem história prévia de perdas gestacionais.
2. Analisar a interação desses polimorfismos entre si e com outros fatores de risco para perdas gestacionais, como idade materna avançada, hábito de fumar e consumo de álcool.
3. Comparar o efeito de cada genótipo de MTHFR 677C>T, FVL, FII eNOS -786C>T e eNOS 894G>T sobre o número de abortamentos.

CAPÍTULO III. MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Este trabalho consiste em um estudo de caso-controle. Os critérios de inclusão e exclusão para o grupo de casos e controles foram os seguintes:

Casos:

- inclusão: ter histórico de no mínimo duas perdas gestacionais consecutivas, independente de ter outros filhos vivos;
- exclusão: aquelas que não tinham perdas consecutivas ou que tinham algum tipo de aberração cromossômica ou não concordância em participar do estudo.

Controles:

- inclusão: não ter história prévia de perdas gestacionais e com no mínimo dois filhos vivos;
- exclusão: mulheres com história de abortamento e não concordância em participar do estudo.

Grupo de estudo

Nosso número amostral foi de 145 mulheres com no mínimo dois abortamentos consecutivos oriundas do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Unidade de Reprodução Humana do Hospital Fêmina.

Mulheres do grupo controle foram convidadas a participar do projeto através dos ambulatórios de ginecologia do HCPA e de Planejamento Familiar do Hospital Fêmina, formado por um número amostral de 135 mulheres com no mínimo dois filhos e sem história prévia de abortamentos espontâneos.

Após esclarecimentos do objetivo desta pesquisa, o termo de consentimento (anexo 1) foi entregue para assinatura, sendo disponibilizada uma cópia para cada paciente do grupo de AR e grupo controle. Em seguida foi realizada uma entrevista estruturada (anexo 2), onde foram questionados dados das gestações, abortamentos, filhos, hábito de fumar e consumo de álcool, e a coleta de material biológico.

Análise molecular

O DNA genômico das amostras de sangue foi extraído de acordo com a metodologia de Lahiri & Nurnberger (1991). Nas amostras de saliva, a obtenção do DNA foi realizada com o Kit Oragene® (DNA genotek) seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas com o auxílio do equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e padronizadas a uma concentração de 20 ng/ μ L.

Foram genotipadas as seguintes variantes relacionadas à trombofilias: MTHFR (C667T; rs 1801133), FVL (1691G>A; rs6025), FII (20210G>A; rs1799963), eNOS exon 7 (894G>T; rs1799983) e eNOS pro (-786C>T; rs 2070744). Os genótipos foram determinados através de *real time* PCR, utilizando Taqman SNP (Applied Biosystems).

Análise estatística

Casos e controles foram comparados quanto a variáveis demográficas e principais fatores de risco conhecido para abortamentos recorrentes. Para variáveis numéricas usamos o teste Kruskal-Wallis e para variáveis categóricas o teste qui-quadrado.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para casos, controles e para a amostra total também foi calculado, e a associação entre os polimorfismos e os abortamentos foi analisada através da análise χ^2 .

O *Odds-ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95% foram calculados utilizando o genótipo com o mais baixo risco como referência.

O envolvimento de fatores genéticos e ambientais com AR e a interação dos polimorfismos entre si foram analisados através de regressão logística.

Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS versão 20.

Ética

Este estudo foi aprovado pelos comitês de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA; GPPG 09/582) e do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC 11-012).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Um total de 145 casos e 135 controles foi analisado. As características dos grupos de mulheres com AR (casos) e grupo controle estão representadas na tabela 2.

Foram consideradas com dificuldade para engravidar as mulheres que relataram não fazer uso de métodos contraceptivos e ter demorado mais de 12 meses para gestar.

No grupo de casos, 113 mulheres (77,9%) tinham apenas perdas gestacionais com menos de 24 semanas, 6 delas (4,1%) somente perdas gestacionais com mais de 24 semanas e 26 (17,9%) apresentaram em seu histórico tanto perdas com mais de 24 semanas como de menos de 24 semanas.

A média da idade entre os dois grupos foi comparada tomando-se a idade materna durante a gestação mais recente. As médias foram similares ($p=0,436$).

O número de mulheres que relataram ter o hábito de fumar até o dia da entrevista do grupo de casos foi menor em relação ao grupo controle ($p=0,021$).

Um maior número de mulheres do grupo de AR respondeu fazer uso de álcool até o dia da entrevista e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Casamentos consanguíneos ocorreram em 3,4% no grupo de casos e em 0,7% no grupo controle.

Tabela 2: Características da população de estudo.

Característica	Caso N (%)	Controle N (%)	Valor de P
Idade [média (min - máx)]	31,72 (17 - 49)	29,86 (17 - 42)	0,436*
Cor Branca [N (%)]	97 (66,90)	120 (88,90)	0,064*
Mulheres com filhos [N (%)]	35 (24,10)	135 (100)	-
Abortamentos [média (min - máx)]	3,25 (2 - 13)	0 (0)	-
Dificuldade engravidar [N (%)]	44 (30,30)	-	-
Hábito de fumar [N (%)]	17 (11,70)	31 (23,00)	0,021 [□]
Consumo de álcool [N (%)]	58 (40,00)	22 (16,30)	<0,05*
IMC (média ± DP)	26,33 (±4,32)	-	-
Consanguinidade [N (%)]	5 (3,40)	1 (0,70)	0,239*
Hábito de fumar e consumo de álcool [N (%)]	11 (7,58)	7 (5,18)	0,565*

* Qui-quadrado

[□] Teste exato de Fischer

A tabela 3 resume os principais resultados de frequências genotípicas e alélicas entre os dois grupos. Não encontramos diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados entre mulheres com AR e grupo controle (genótipo MTHFR 677TT, OR 1,15 95% IC 0,45 - 2,97; genótipo FV de Leiden OR 0,69 95% IC 0,12 - 3,74; FII (protrombina) OR 0,31 95% IC 0,01 - 3,34; eNOS -786 (genótipos TC e CC) OR 0,80 95% IC 0,47 - 1,37 e OR 0,73 95% IC 0,33 - 1,63, respectivamente; eNOS 894G>T (genótipos GT e TT) OR 0,76 95% IC 0,45 - 1,29 e OR 0,73 95% IC 0,24 - 2,20, respectivamente). Em nossa amostra de casos e controles não foi encontrado o genótipo homozigoto para o alelo A da variante FVL. Também não foi encontrado o genótipo homozigoto para o alelo A da variante FII.

Tabela 3: Frequências genótípicas e alélicas em mulheres com AR (casos) e mulheres sem AR (controles).

Polimorfismo	Casos N (%)	Controles N (%)	OR (95% IC)	p
MTHFR 677C>T (rs 1801133)				
	N=145	N=135		
CC	73 (50,3)	71 (52,6)	1,00	
CT	59 (40,7)	53 (39,2)	1,08 (0,64 - 1,83)	0,8500*
TT	13 (9,0)	11 (8,2)	1,15 (0,45 - 2,97)	0,9246*
C	205 (70,7)	195 (72,2)	1,08 (0,73 - 1,58)	0,7584*
T	85 (29,3)	75 (27,8)		
FVL 1691G>A (rs 6025)				
	N=145	N=135		
GG	142 (97,9)	131 (97,0)	1,00	
GA	3 (2,1)	4 (3,0)	0,69 (0,12 - 3,74)	0,7146*
AA	0	0	-	-
G	287 (99,0)	266 (98,5)	0,70 (0,12 - 3,70)	0,7162*
A	3 (1,0)	4 (1,5)		
FII 20210G>A (rs 1799963)				
	N=145	N=135		
GG	144 (99,3)	132 (97,8)	1,00	
GA	1 (0,7)	3 (2,2)	0,31 (0,01 - 3,34)	0,3552*
AA	0	0	-	-
G	289 (99,6)	267 (98,9)	0,31 (0,01 - 3,32)	0,3566*
A	1 (0,4)	3 (1,1)		
eNOS -786C>T (rs2070744)				
	N=145	N=135		
TT	71 (49,0)	58 (43,0)	1,00	
TC	57 (39,3)	58 (43,0)	0,80 (0,47 - 1,37)	0,4677*
CC	17 (11,7)	19 (14,0)	0,73 (0,33 - 1,63)	0,5206*
T	199 (68,6)	174 (64,4)	0,83 (0,57 - 1,20)	0,3383*
C	91 (31,4)	96 (35,6)		
eNOS 894G>T (rs1799983)				
	N=145	N=135		
GG	84 (58,0)	69 (51,1)	1,00	
GT	53 (36,5)	57 (42,2)	0,76 (0,45 - 1,29)	0,3416*
TT	8 (5,5)	9 (6,7)	0,73 (0,24 - 2,20)	0,7194*
G	221 (76,2)	195 (72,2)	0,81 (0,55 - 1,21)	0,3264*
T	69 (23,8)	75 (27,8)		

*Qui-quadrado

A análise da regressão logística sugere que não há associação entre os genótipos combinados entre si e com fatores como fumo e álcool.

Como a idade materna avançada é um fator de risco para AR, procuramos verificar o efeito dos polimorfismos MTHFR 677C>T, eNOS -786C>T e eNOS 894G>T apenas entre mulheres que tiveram sua última gestação com menos de

35 anos (tabela 4). A frequência dos alelos de risco para os três polimorfismos não apresentou diferença significativa entre os dois grupos.

Tabela 4: Frequências alélicas em mulheres <35 anos na última gestação.

Polimorfismo	Alelo	Casos N=92	Controles N=99	P
		N (%)	N (%)	
MTHFR 677C>T	C	138 (75,00)	145 (73,23)	0,7816*
	T	46 (25,00)	53 (26,77)	
eNOS 894G>T	G	141 (76,63)	142 (71,71)	0,5151*
	T	43 (23,37)	52 (28,29)	
eNOS -786C>T	T	125 (67,93)	132 (66,66)	0,7687*
	C	59 (23,07)	68 (33,34)	

* Qui-quadrado

Considerando mulheres que tiveram sua última gestação com 35 anos ou mais encontramos no grupo dos casos 51 mulheres e no grupo controle 32 mulheres. Esta diferença não foi estaticamente significativa ($p=0,422$).

Outra abordagem foi testar o efeito de cada genótipo de MTHFR 677C>T, eNOS -786C>T e eNOS 894G>T sobre o número de abortamentos. Para FVL e FII não foi possível fazer este teste pois, em ambos o genótipo homozigoto para o alelo de risco foi ausente. Não houve diferença significativa (Teste Kruskal-Wallis: MTHFR 677C>T $p= 0,437$; eNOS -786C>T $p=0,911$ e eNOS 894G>T $p=0,486$).

CAPÍTULO V. DISCUSSÃO

Metade dos casos de abortamentos clinicamente reconhecidos permanece com sua etiologia desconhecida (Ford and Schust, 2009). Neste trabalho, nós comparamos mulheres que apresentavam histórico de dois ou mais abortamentos consecutivos com mulheres que não tiveram abortamentos espontâneos e com pelo menos dois filhos vivos. Ainda é controverso se polimorfismos relacionados á trombofilias são responsáveis pelos AR. Em nossos resultados não foi verificado um risco aumentado para abortamentos nas pacientes portadoras dos alelos de risco para os polimorfismos estudados. Outros trabalhos também chegaram à mesma conclusão.

Há duas décadas alguns estudos têm apontado que mutações no MTHFR podem se constituir como fatores de risco para trombose e abortamentos habituais. Apesar de ainda ser incerto o mecanismo pelo qual o polimorfismo levaria a complicações gestacionais, acredita-se que a hiperhomocisteinemia causaria um dano endotelial e em seguida um tromboembolismo venoso e insuficiência placentária (Kang *et al.*, 1988; Altomare *et al.*, 2007).

Nós encontramos uma frequência de 40,7% e 9,0% de mulheres com genótipos CT e TT, respectivamente, para o polimorfismo dentro do grupo casos. Esta porcentagem foi muito semelhante no grupo controle também (39,2% e 8,2%, respectivamente). A tabela 5 resume os principais resultados de estudos com MTHFR 677C>T e AR.

Tabela 5: Distribuição genotípica de MTHFR 677C>T para mulheres com abortamentos recorrentes e controles.

Autor	Ano	Etnia	Abortamentos; gestações	N	Caso %			N	Controle %			p
					CC	CT	TT		CC	CT	TT	
Morales-Machin <i>et al.</i>	2009	Venezuela	≥2; <20 semanas	30	33	60	7	50	38	58	4	>0,05*
Cardona <i>et al.</i>	2008	Colômbia	≥3; primeiro e segundo trimestre, pre-eclâmpsia e restrição do crescimento intrauterino	93	40,9	46,2	12,9	206	45,1	40	14,6	0,48*
Rodríguez-Guillén <i>et al.</i>	2009	México	<20 semanas	23	54,2	45,8	74	74,3	25,7	0,17*		
D'Uva <i>et al.</i>	2008	Itália	≥2; <20 semanas	115	-	-	30	75	-	-	9,3	<0,001*

* Qui-quadrado

Morales-Machín *et al.*, em 2009 realizaram seu estudo com MTHFR 677C>T entre 30 mulheres com AR e 50 controles venezuelanas, o qual também

não se demonstrou como fator de predisposição para AR. Cardona *et al.* (2008) avaliaram a proporção dos polimorfismos de MTHFR 677C>T e níveis de homocisteína em mulheres com perdas gestacionais na Colômbia e não encontraram relação entre os parâmetros. No trabalho realizado por Rodríguez-Guillén *et al.* os autores verificaram um risco aumentado em 5 vezes para abortamento espontâneo em mulheres com genótipo MTHFR 677TT quando comparadas com aquelas de genótipo CC e CT, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa. Embora o estudo tenha sido realizado com 23 casos e 74 controles, os autores observaram uma frequência elevada do alelo T na amostra. Uma possível explicação é a origem étnica das populações estudadas. Mayor-Olea *et al.*, (2008) verificaram em seu trabalho que a partir do século XX houve um aumento da frequência do alelo T na população espanhola. D'Uva *et al.*, em 2008 verificou que pacientes italianas com genótipo MTHFR 677TT tinham um risco maior de abortamentos e seu grupo controle também apresentou uma frequência relativamente alta para o alelo. Em outros países, incluindo a Alemanha o polimorfismo parece não estar associado a AR (Morales-Machín *et al.*, 2009). A população brasileira apresenta maior diversidade étnica devido à imigração de europeus provenientes de Portugal, Itália, Espanha e Alemanha (Salzano e Freire-Maia, 1967). Esta pode ser uma possível relação entre a alta frequência do alelo T e a não associação a AR.

Na metanálise conduzida por Wu *et al.* (2012), um efeito do genótipo MTHFR 677TT só foi observado em mulheres com mais de três perdas gestacionais (OR=1,792; IC 95% 1,187-2,704; p=0,005). Em nossa amostra não encontramos esse efeito (DR=0,73; IC 95% 0,15-3,42; p=0,736).

No presente trabalho não foi realizada a dosagem de homocisteína nas pacientes, mas alguns trabalhos demonstram que mulheres portando o alelo T podem possuir níveis de homocisteína normais, como verificado por Powers *et al.* em 2003 em 57 pacientes grávidas. Outro mecanismo independente dos níveis deste aminoácido pode ser o responsável pelos abortamentos (Altomare *et al.*, 2007). No entanto outros autores encontram associação significativa entre altos níveis de homocisteína e o alelo T (Unfried, 2002). Segundo Mayor-Olea (2008), a combinação de ambiente e diferentes níveis de atividade enzimática de MTHFR

poderia influenciar na vitalidade do feto, e que o consumo de folato poderia auxiliar os fetos de genótipo 677C>T a sobreviverem e nascerem. Mutações em MTHFR são associadas a vários problemas gestacionais como perdas de primeiro trimestre e tardias, pré-eclâmpsia, defeitos de tubo neural entre outras. No entanto é difícil encontrar evidências mais claras correlacionando mutações em MTHFR e as adversidades que podem ocorrer durante uma gestação, sejam elas a favor ou contra (Altomare *et al.*, 2007).

Grande parte das pesquisas em trombofilia hereditária também está relacionada com a mutação de ponto que substitui o nucleotídeo G pelo A na posição 1691 no Fator V, denominada de Fator V de Leiden, a qual pode levar a um quadro de hipercoagulação. Outra forma relatada em trabalhos com trombofilias é o polimorfismo 20210G>A do Fator II (protrombina). Esta última, apesar de menos frequente na população em geral, tem sido apontada como um fator de predisposição a AR. Encontramos uma frequência de 2,07% de pacientes no grupo casos de 2,97% no grupo controle para o genótipo heterozigoto do FVL enquanto que para o FII as frequências foram de 0,69% entre os casos e de 2,23% do genótipo heterozigoto entre os controles. Serrano *et al.* (2011) compararam uma amostra de 100 pacientes portuguesas com três ou mais abortamentos de menos de 10 semanas e 100 controles, também não encontrando associação entre FV e FII com AR. Em 2004 Roqué *et al.* investigaram a associação entre trombofilias herdadas e adquiridas e abortamentos. Somente nas pacientes com perdas após 14 semanas de gestação foi encontrado um risco aumentado quando essas apresentavam algum tipo de trombofilia, entre elas FII, FVL e hiperomocisteinemia concluindo que, quando a circulação úteroplacentária ainda não é funcional, as trombofilias não sejam responsáveis pelos abortamentos. No trabalho de Jivraj *et al.* (2009), foi comparada uma amostra de 25 mulheres grávidas com genótipo FVL 1691GA com histórico de AR e 307 mulheres grávidas com histórico de AR com genótipo FVL 1691GG (controles). A taxa de nascidos vivos foi mais baixa entre aquelas com a mutação em um dos alelos em relação ao grupo controle. No entanto a diferença não foi estatisticamente significativa (12/25 ou 48% contra 175/307 ou 56,9%). Jivraj *et al.* em 2006 observaram que quando o casal apresentava mais

de um polimorfismo para trombofilias, o risco de abortamento espontâneo em uma futura gestação sem tratamento era duas vezes maior. Assim, concluíram que o genótipo paterno para trombofilia poderia influenciar no sucesso da gravidez, por inferência ao genótipo fetal. Na nossa amostra, não houve diferença entre os grupos com perdas gestacionais de menos ou mais de 24 semanas, nem mesmo em relação ao número de abortamentos e os polimorfismos em FVL e FII. Os polimorfismos paternos não foram estudados em nossa amostra.

Polimorfismos do gene que sintetiza o NO endotelial (eNOS) já são relacionados a muitas doenças ligadas a vasodilatação. Já é sabido que -786C>T e 894G>T são potencialmente envolvidos com a rota aterogênica (Zhang *et al.*, 2006). A isoforma NOS-3 tem uma maior atividade na placenta durante o início da gravidez (Sahin-Toth *et al.*, 1997) e eNOS é especialmente importante durante o primeiro trimestre de gestação pois modula a produção de hCG. Em nossa amostra encontramos uma frequência de 31,38% do alelo de risco C entre os casos e 35,56% no grupo controle para eNOS -786C>T. Já para eNOS 894G>T, essas frequências para o alelo de risco T em casos e controles foi de 23,80% e 27,28%, respectivamente. Visto que não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos polimorfismos relacionados à eNOS, os resultados não sugerem que estes estejam associados a AR. O trabalho realizado na Tunísia por Zammiti *et al.* (2007) também não encontrou esta relação. Segundo o autor, AR é complexo e regulado por múltiplos padrões genéticos. Polimorfismos associados à vasodilatação parecem exercer influência sobre o fluxo e a pressão sanguínea, no entanto não parecem ter qualquer consequência no resultado da gestação (Zammiti *et al.*, 2007). No trabalho realizado por Suryanarayana *et al.* (2006) no Sul da Índia, 145 pacientes com pelo menos três abortamentos e 99 mulheres do grupo controle foram comparadas e não foi encontrada associação com eNOS 894G>T.

Verificamos uma frequência muito semelhante entre casos e controles quanto à presença dos alelos de risco para MTHFR 677C>T, eNOS -786C>T e eNOS 894G>T no grupo de mulheres que tiveram sua última gestação antes dos 35 anos. Este resultado reforça os achados de nosso estudo: a falta de associação entre esses polimorfismos e AR, uma vez que a idade avançada

materna é um fator de risco para abortamentos espontâneos (Nybo Andersen *et al.*, 2000; Marquard *et al.*, 2010). Também não encontramos diferença estatisticamente significativa em relação ao número de mulheres com 35 anos ou mais entre os grupos. No entanto, houve um maior número de mulheres com idade avançada na última gestação no grupo caso. Erros meióticos durante o desenvolvimento dos oócitos em mulheres acima de 35 anos são mais frequentes, aumentando as chances de aneuploidias embrionárias (Sullivan *et al.*, 2004; Garrisi *et al.*, 2009). No entanto, a incidência de AR em mulheres nessa faixa de idade ainda é desconhecida (Marquard *et al.*, 2010).

Observamos em nossas análises que mulheres com AR consomem mais álcool em relação ao grupo controle e esta diferença foi significativa. O álcool apresenta efeitos adversos no sistema hemostático, dependendo da quantidade e do tipo de bebida alcoólica que é ingerida (Pomp *et al.*, 2008). Apesar de ainda não ser conhecido os mecanismos pelos quais o consumo de álcool leve a abortamentos espontâneos, sabe-se que a substância atravessa a barreira placentária. Assim, o feto fica exposto a concentrações da substância semelhantes às do sangue materno (Freire, Padilha e Saunders, 2009), tornando um ambiente inóspito, pois o líquido amniótico fica impregnado pela substância, uma vez que o metabolismo e a eliminação do álcool são lentos (Freire *et al.*, 2005). O álcool tem um efeito de redução do crescimento fetal por hipóxia e elevação do estresse oxidativo. Assim, interferem nos processos celulares que necessitam de oxigênio (Bosco e Diaz, 2012).

Quanto ao hábito de fumar, houve um maior número de mulheres do grupo controle que fazem uso da substância e esse resultado apresentou significância estatística ($p=0,021$). As mulheres que fizeram parte do nosso grupo caso são pacientes que já estão em tratamento para AR. Há um apelo por parte dos médicos para que elas não façam uso do fumo. Segundo Dechanet *et al.* (2011), os compostos presentes no cigarro podem prejudicar o útero, bem como a vascularização do endométrio, promovendo um relaxamento do miométrio e elevando o risco para abortamento.

Também o consumo de álcool e hábito de fumar combinados à presença dos alelos de risco para as variantes aqui estudadas não parecem ser determinantes na enfermidade.

Menos de 5% de todos os casamentos no Brasil ocorre entre consanguíneos (Hamamy, 2011). Nossos dados de consanguinidade em ambos os grupos estão dentro do esperado em nossa população (3,4% para casos e 0,7% para controles; $p=0,114$). A proporção de consanguinidade no grupo de casos foi maior do que nos controles, mas não houve diferença estatisticamente significativa.

Em conclusão, nossos dados não concordam com a proposição de que os polimorfismos MTHFR 677C>T, FVL, FII (protrombina), eNOS -786C>T e eNOS 894G>T estejam relacionados com AR em nossa população.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões do presente trabalho foram as seguintes:

1. As frequências dos polimorfismos FVL (Fator V de Leiden) do gene FV e 20210G>A do gene FII (protrombina), também de 677C>T do gene MTHFR (metilenotetrahidrofolato redutase), 894G>T e -786C>T do gene eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) encontradas em mulheres com AR foram semelhante às encontradas no grupo de mulheres sem história prévia de abortamentos;
2. A interação desses polimorfismos entre si e com idade materna avançada não diferiu entre os grupos. Já o consumo de álcool pareceu ser um fator de risco para AR. O hábito de fumar foi mais frequente entre mulheres do grupo controle, no entanto esta é uma questão de difícil interpretação;
3. Não encontramos qualquer efeito de cada genótipo dos polimorfismos MTHFR 677C>T, eNOS -786C>T e eNOS 894G>T sobre o número de abortamento.

Com os resultados obtidos no presente estudo, concluímos que os polimorfismos MTHFR 677C>T, FVL, FII (protrombina), eNOS -786C>T e eNOS 894G>T não estão relacionados com AR em nossa população. Nosso estudo reforça a hipótese já sugerida em outros trabalhos realizados com AR e os polimorfismos aqui estudados que estes não são a causa das perdas recorrentes. Embora esses polimorfismos estejam relacionados a trombofilias, talvez seja necessária uma reavaliação nos protocolos de investigação para AR em pacientes da nossa população.

REFERÊNCIAS

- AGOG (2001) AGOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynaecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 78 (2): 179-190.
- Altomare I, Adler A and Aledort LM (2007) The 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. *Thrombosis Journal* 5:17.
- Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MCP, Menezes R, Annichino-Bizzacchi JM and Costa FF (1998) Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 78:332-335.
- American Society for Reproductive Medicine (2008) Patient's fact sheet: pregnancy loss (disponível em http://www.asrm.org/uploadedFiles/ASRM_Content/Resources/Patient_Resources/Fact_Sheets_and_Info_Booklets/recurrent_preg_loss.pdf).
- Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA and Reitsma PH (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-67.
- Bosco C and Diaz E (2012) Placental hypoxia and foetal development versus alcohol exposure in pregnancy. *Alcohol Alcohol*. 47(2):109-117.
- Brandalize APC, Bandinelli E, Santos PA, Roisenberg I and Schüler-Faccini (2009) Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down Syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A*. 149A(10):2080-2087.
- Bremme KA (2003) Hemostatic changes in pregnancy. *Ballieres Best Pract Res Clin Haematol* 16:153–168.
- Camire RM, Kalafatis M, Cushman M, Tracy RP, Mann KG and Tracy PB (1995) The mechanism of inactivation of human platelet factor Va from normal and activated protein C-resistant individuals. *J Biol Chem* 270:20794–20800.
- Cardona H, Cardona-Maya W, Gómez JG, Castañeda S, Gómez JM, Bedoya G, Álvarez L, Torres JD, Tobón LI and Cadavid A (2008) Relación entre los polimorfismos de la metileno-tetrahidrofolato-reductasa y los niveles de homocisteína en mujeres con pérdida gestacional recurrente: perspectiva desde la nutrigenética. *Nutr Hosp* 23(3): 277-282.
- Carp HJ (2009) Aspirin in recurrent miscarriage: is there an indication? *Isr Med Assoc J*. 11(3):178-82.
- Clapp III JF and Capeless E (1997) Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 80:1469–1473.
- Clark P, Greer IA and Walker I (1999) Interaction of the protein C/ protein S anticoagulation system, the endothelium and pregnancy. *Blood Rev* 13:127-146.
- Craciunescu CN, Brown EC, Mar MH, Albright CD, Nadeau MR and Zeisel SH (2004) Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr*. 134:162-166.
- Cripe LD, Moore KD and Kane WH (1992) Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry* 31:3777-3785.
- Davie EW, Fujikawa K, Kurachi K and Kisiel W (1979) The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 48:277–318.

- de Jong PG, Goddijn M, Middeldorp S (2011) Testing for inherited thrombophilia in recurrent miscarriage. *Semin Reprod Med.* 29(6):540-547.
- de Paula Sabino A, Ribeiro DD, Carvalho MG, Cardoso J, Dusse LM, Fernandes AP (2006) Factor V Leiden and increased risk for arterial thrombotic disease in young Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17(4):271-275.
- Dechanet C, Brunet C, anahory T, Hamamah S, Hedon B and Dechaud H (2011) Effects of cigarette smoking on embryo implantation and placentation and analysis of factors interfering with cigarette smoke effects (part II). *Gynecol Obstet Fertil.* 39(10):567-574.
- D'Uva M, Di Micco P, Strina I, Ranieri A, Alviggi C, Mollo A, Fabozzi F, Cacciapuoti, di Frega MTS, Ianuzzo M and De Placido G (2008) Etiology of hypercoagulable state in women with recurrent fetal loss without other causes of miscarriage from Southern Italy: new clinical target for antithrombotic therapy. *Biologics.* Dec;2(4):897-902.
- Figueiró-Filho EA e Oliveira VM (2007) Associação entre abortamentos recorrentes, perdas fetais, pré-eclâmpsia grave e trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em mulheres do Brasil Central . *Rev Bras Ginecol Obstet;* 29(11):561-567.
- Finglas PM, Wright AJA, Wolfe CA, Hart DJ, Wright DM and Dainty TR (2003) Is the more to folates than neural-tube defects? *Pro Nutr Soc* 62:591-598.
- Ford HB and Schust DJ (2009) Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynaecol Spring* 2(2):76-83.
- Fox-Lee L and Schust DJ (2007) Recurrent pregnancy loss. In: Berek JS, ed. *Berek and Novak's Gynaecology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 1277-1322.
- Freire TM, Machado JC, Melo EV e Melo DG (2005) Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 27(7):376-378.
- Freire K, Padilha PC e Saunders C (2009) Fatores associados ao uso de álcool e cigarro na gestação. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 31(7):335-341.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP and Rozen R (1995) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 10: 111-113.
- Garg UC and Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774–1777.
- Garrisi JG, Colls P, Ferry KM, Zheng X, Garrisi MG and Munne S (2009) Effect of infertility, maternal age, and number of previous miscarriages on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 92:288-295.
- Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdorfer P, Vetter B, Hentze MW and Kulozik AE (2001) Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 28:389–392.
- Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG and Rozen R (1994) Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 7(2): 195-200.
- Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Cappucci G, Brancaccio V and Di Minno G (1998) Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: roles of factor V Leiden, prothrombin G20210A, and

- methylenetetrahydrofolate reductase C677 T mutations. *Am J Obstet Gynaecol* 179:1324–1328.
- Hamamy H (2011) Consanguineous marriages. *J Community Genet.* 2011 Nov 22.
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM and Brown MJ (1999) A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu2983Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100: 1515-1520.
- Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R (1996) Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1;93(1):7-9.
- Jivraj S, Rai R, Underwood J and Regan L (2006) Genetic thrombophilic mutations couples with recurrent miscarriages. *Hum Reprod* 21:1161-1165.
- Jivraj S, Makris M, Saravelos S and Li TC (2009) Pregnancy outcome in women with factor V Leiden and recurrent miscarriage. *BJOG* 116:995-998.
- Kalafatis M, Bertina RM, Rand MD and Mann KG (1995) Characterization of the molecular defect in factor VR506Q. *J Biol Chem* 270:4053–4057.
- Kang SS, Wong FW, Zhou JM, Sora J, Lessick M, Ruggie N and Grevich G (1988) Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism (S7)* 611-615.
- Kovalevski G, Gracia CR, Berlin JA, Sammel MD and Barnhart KT (2004) Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. *Arch Intern Med.* 164:558-563.
- Krabbendam I, Franx A, Bots ML, Fijnheer R and Bruinse HW (2005) Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol* 118(2):143-153.
- Kraus JP, Le K, Swaroop M, Ohura T, Tahara T, Rosenberg LE, Roper MD and Kozich V (1993) Human cystathionine B-synthase cDNA: Sequence, alternative splicing an expression in cultured cells. *Hum Mol Genet* 2:1633-1638.
- Krishnaswamy K and Madhavan NK (2001) Importance of folate in human nutrition. *Br J Nutr* 85: Suppl. 2, 115-124.
- Kubes P, Suzuki M and Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651– 4655.
- Lahiri DK and Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 11;19(19):5444.
- Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, Baumeister L, Doyle DL, Leppig K, Pettersen B, Resta R, Shields L, Uhrich S, Varga EA and Raskind WH (2005) Genetic avaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendation of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Counsel* 14(3):165-181.
- Leclerc D, ampeu E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R and Gravel RA (1996) Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutation in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Hum Mol Genet* 5: 1867-1874.
- Lin PC (2004) Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health* 13:33-39.
- Lissalde-Lavigne G, Fabbro-Peray P, Cochery-Nouvellon E, Mercier E, Ripart-Neveu S, Balducchi JP, Daurès JP, Perneger T, Quéré I, Dazat M, Marès P, Gris JC

- (2005) Factor V Leiden and prothrombin G20210A polymorphisms as risk factors for miscarriage during a first intended pregnancy: the matched case-control 'NOHA first' study. *J Thromb Haemost.* 2178-2184.
- Macklon NS, Geraedts JPM and Fauser BCJM (2002) Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update.* 8(4):333-343.
- Marquard K, Westohal LM, Milki AA and Lathi RB (2010) Etiology of recurrent pregnancy loss in women over the age of 35 years. *Fertil Steril* 94(4): 1473-1477.
- Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC and Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268:17478 – 17488.
- Matthews RG (1986) Methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *Methods Enzymol* 122: 372–381.
- Mayor-Olea A, Callejón G, Palomares A, Jiménez, Gaitán MJ, Rodríguez A, Ruiz M and Reyes-Engel (2008) Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *BMC Med Genet.* 28;9:104.
- McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK and Poston L (1993) Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclâmpsia. *Am J Obstet Gynaecol* 168:1323–1330.
- Mignini LE, Latthe PM, Villar J, Kilby MD, Carroli G, Khan KS (2005) Mapping the theories of pre-eclampsia: the role of homocysteine. *Obstet Gynaecol* 105:411–425.
- Morales-Machín A, Borjas-Fajardo L, Quintero JM, Zabala W, Alvarez F, Delgado W, Hernández ML, Solis-Añez E, Sánchez Y y Butrón Z (2009) Polimorfismo C677T Del gen de la metiltetrahidrofolato reductase como factor de riesgo em mujeres com aborto recorrente. *Invest Clin* 50(3): 327-333.
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y and Nakao K (1999) T(-786)-C mutation in the 5-prime-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870.
- Nybo Andersen Am, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J and Melbye M (2000) Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320(7251): 1708-1712.
- Pajic T (2010) Factor V Leiden and FII 20210 testing in thromboembolic disorders. *Clin Chem Lab Med* 48(Suppl 1):S79–S87.
- Passos EP, Freitas F, Salazar F, Cunha Filho JSL (2001) Abortamento. In: Freitas F., Martins-Costa S.H., Ramos J.G.L., & Magalhães J.A. Rotinas em obstetrícia. 4ª ed p. 60-68.
- Phippard AF, Horvath JS, Glynn EM, Garner MG, Fletcher PJ, Duggin GG and Tiller DJ (1986) Circulatory adaptation to pregnancy--serial studies of haemodynamics, blood volume, renin and aldosterone in the baboon (*Papio hamadryas*). *J Hypertens* 4:773–779.
- Pomp ER, Rosendaal FR, Doggen CJ (2008) Alcohol consumption is associated with a decreased risk of venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 99(1):59-63.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH and Bertina RM (1996) 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* 88:3698–3703.

- Powers RW, Dunbar MS, Gallaher MJ and Roberts JM (2003) The 677 C-T methylenetetrahydrofolate reductase mutation does not predict increased maternal homocysteine during pregnancy. *Obstet Gynaecol* 101:762-766.
- Radomski MW, Palmer RM and Moncada S (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2:1057-1058.
- Raffaelli F, Nanetti L, Vignini A, Mazzanti L, Giannubilo SR, Curzi CM, Turi A, Vitali P, Tranquilli AL (2010) Nitric oxide platelet production in spontaneous miscarriage in the first trimester. *Fertil Steril.* 93(6):1976-1982.
- Rai R. and Reagan L. (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601-611.
- Rees DC, Cox M and Clegg JB (1995) World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 346:1133-1134.
- Riddell DC, Wang H, Royle NJ, Nigli M, Guinto E, Kochinsky ML, Irwin DM, Cool D, MacGillivray RTA and Hamerton JL (1987) Regional assignment for the human genes encoding FII, FV, FXIII, ceruloplasmin and pseudoceruloplasmin. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet.* 46: 682.
- Roberts JM and Redman CW (1993) Pre-eclâmpsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 341:1447-1451.
- Rodríguez-Guillén MR, Torres-Sánchez L, Chen J, Galván-Portillo M, Blanco-Muñoz J, Anaya MA, Silva-Zolezzi I, Hernández-Valero M and López-Carrillo L (2009) Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Publica Mex* 51(51):19-25.
- Roqué H, Paidas MJ, Funai EF, Kuczynski E and Lockwood CJ (2004) Maternal thrombophilias are not associated with early pregnancy loss. *Thromb Haemost* 91(2):290-295.
- Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE and Reitsma PH (1998) Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 79:706-708.
- Rossmannith WG, Hoffmeister U and Wolfahrt S (1999) Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod* 5:487-494.
- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (2006) Management of early pregnancy loss. RCOG Guideline number 25.
- Royle NJ, Irwin DM, Koschinsky ML, MacGillivray RTA and Hamerton JL (1987) Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. *Somat. Cell Molec. Genet.* 13:285-292.
- Sahin-Toth, M., Kukor, Z. and Toth, M. (1997) Tetrahydrobiopterin preferentially stimulates activity and promotes subunit aggregation of membrane-bound calcium-dependent nitric oxide synthase in human placenta. *Mol Hum Reprod* 3:293-298.
- Salzano F e Freire-Maia N (1967) Populações brasileiras: Aspectos demográficos, genéticos e antropológicos. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- Sandrim VC, Coelho EB, Nobre F, Arado GM, Lanchote VL, Tanus-Santos JE. (2006) Susceptible and protective eNOS haplotypes in hypertensive black and white subjects. *Atherosclerosis.* 186(2):428-432.
- Sanyal M, Nag TC and Das C (2000) Localization of nitric oxide synthase in human trophoblast cells: role of nitric oxide in trophoblast proliferation and differentiation. *Am J Reprod Immunol* 43:70-77.

- Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D and Webb RC (1996) Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 78:225–230.
- Schneede J, Refsum H and Ueland PM (2000) Biological and environmental determinants of plasma homocysteine. *Semin Thromb Hemost* 26:263–279.
- Scholl TO and Johnson WG (2000) Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 71:1295S – 1303S.
- Sehirali S, Inal MM, Yildirim Y, Balim Z, Kosova B, Karamizrak T, Sancı M, Topcuoglu N, Tinar S (2005) Prothrombin G20210A mutation in cases with recurrent miscarriage: a study of the mediterranean population. *Arch Gynecol Obstet*. 273(3):170-173.
- Serrano F, Lima ML, Lopes C, Almeida JP and Branco J (2011) Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? *Arch Gynaecol Obstet* 284(5):1127-1132.
- Sharp L and Little J (2004) Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGe Review. *Am J Epidemiol* 159:423-443.
- Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kin JH, Shim SH, Choi DH and Kim NK (2010) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 152(1):64-67.
- Silver RM, Branch DW, Goldenberg R, Iams JD, Klebanoff MA (2011) Nomenclature for pregnancy outcomes: time for a change. *Obstet Gynecol*. 118(6):1402-1408.
- Stephenson MD (1996) Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 66:24-29.
- Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Porter TF and Branch DW (2004) Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynaecol* 104:784-788.
- Suryanarayana V, Rao L, Kanakavalli M, Padmalatha, Deenadayal M and Singh L (2006) Recurrent early pregnancy loss and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms. *Arch Gynaecol Obstet*. 274(2):119-24.
- Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA 2001 Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 11:719-725.
- Tranquilli AL, Saccucci F, Giannubilo SR, Cecati M, Nocchi L, Lorenzi S and Emanuelli M (2010) Unexplained fetal loss: the fetal side of thrombophilia. *Fertil Steril* 94:378-380.
- Unfried G, Griesmacher A, Weismüller W, Nagele F, Huber JC and Tempfer CB (2002) The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Recurrent Miscarriage. *Obstet Gynaecol* 99(4):614-619.
- Vallance P, Collier J and Moncada S (1989) Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2:997–1000.
- van der Put NMJ, Eskes TKAB, Blom HJ (1997) Is the common 677C>T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *Q J Med* 90:111–115.
- Wang H, Riddell DC, Guinto ER, MacGillivray RTA and Hamerton JL (1988) Localization of the gene encoding human factor V to chromosome 1q21-25. *Genomics* 2:324-328.
- Welch GN, Upchurch GJR and Loscalzo J (1997) Hyperhomocyst(e)inaemia and atherothrombosis. *Ann NY Acad Sci* 811:48-58.

- WHO (1977) Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period. *Acta Obstet Gynaecol Scand* 56:247–253.
- Wu X, Zhao L, Zhu H, He D, Tang W, Luo Y (2012) Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Feb 7.
- Yenicesu GI, Cetin M, Ozdemir O, Cetin A, Ozen F, Yenicesu C, Yildiz C, Kocak N (2009) A prospective case-control study analyzes 12 thrombophilic gene mutations in Turkish couples with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 63(2):126-136.
- Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y and Nakao K (1998) A missense glu298asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 103:65-69.
- Zammiti W, Mtiraoui N and Mahjoub (2007) Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in Tunisian women. *Am J Reprod Immunol*. 59(2):139-45.
- Zhang C, Lopez-Ridaura R, Hunter DJ, Rifai N and Hu FB (2006) Common variants of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary heart disease among U.S. diabetic men. *Diabetes* 55(7):2140-2147.

ANEXOS

ANEXO 1: VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS A TROMBOFILIAS EM MULHERES COM PERDAS GESTACIONAIS (GPPG 09/582)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-los para participar de um estudo para investigação de fatores de risco para perdas gestacionais recorrentes. Entre os fatores de risco estão alterações hereditárias da coagulação, e para o diagnóstico é necessária uma amostra de sangue / saliva. Necessitamos de pacientes com perdas gestacionais recorrentes que serão comparados com pacientes que não tiveram estas complicações. A sua participação é importante para que possamos chegar a conclusões que possam lhe beneficiar ou a outras pacientes em futuras gestações. A sua participação é voluntária, sem prejuízo de seu tratamento, e você tem o direito de se retirar do estudo a qualquer momento, bastando unicamente manifestar a sua vontade. As informações são confidenciais, e as conclusões serão utilizadas para publicação em revista científica.

Para viabilizarmos o estudo é necessário além de responder a um questionário, sejam coletados 10mL de sangue de uma veia periférica / saliva. O volume coletado não tem repercussão sobre seu organismo, e o risco da coleta de sangue pode ser a dor da punção, a formação de uma pequena mancha escura na pele (equimose) ou um sangramento mínimo.

Os resultados dos exames de sangue / saliva estarão a sua disposição com os pesquisadores no Serviço de Genética Médica / Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Favor assinar a linha correspondente a seu nome, se estiver de acordo em participar do estudo.

Nome da paciente: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Pesquisadores:

Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino – pesquisadora responsável
Serviço de Genética Médica do HCPA – fone 3359-8011

Profa. Dra Lavínia Schüller-Faccini;
Prof. Dr. Eduardo Passos
Lucas Fraga – bolsista de iniciação científica
Caroline Gross Dutra – Aluna de Mestrado - PPGBM

ANEXO 2: VARIANTES GENÉTICAS RELACIONADAS A TROMBOFILIAS EM MULHERES COM PERDAS GESTACIONAIS

IDENTIFICAÇÃO

Cônjuge da Paciente

1. Nome: _____
2. Data nascimento: _____ Idade: _____
3. Profissão/ocup: _____
4. Escolaridade: _____

Paciente

5. Nome: _____
6. Endereço: _____
7. Bairro: _____ Cidade: _____
8. CEP: _____
9. Fone casa: _____ Fone Cel: _____
10. Data nascimento: _____ Idade: _____
11. Profissão/ocup: _____
12. Escolaridade: _____
13. Peso habitual: _____ kg Peso atual: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____
14. Doença auto-imune: _____
15. Doenças tromboembólicas:

	Materna	Paterna	Familiares
Varizes			
Trombose			
AVC			

16. Grupo Sanguíneo: _____ Fator RH: () positivo () negativo () não sabe
17. Dificuldades para engravidar? () Sim () Não
18. Gestações: _____
19. NV: _____
20. NM: _____
21. Abortamento espontâneo: _____
22. Abortamento provocado: _____
23. Filhos vivos: _____

(heredograma no verso)

	Materna	Paterna	Obs
24. Fumo			
25. Alcool			
26. Outras drogas			
27. Medicamentos			
28. Antecedentes de malformação			
29. Grupo étnico			
30. Doença crônica			

31. Dados gestacionais:

Nº gest	Ano	Pré-natal local	Gesta planej	Uso de fólico peric qdade/data	Compl	HCG	ECO/data	Parto C/N	Curetag	Nvivo	Nmorto	Abort espon	Obs

32. Pesquisa de mutações relacionadas a trombofilias do presente estudo

gene	polimorfismo	Resultado
▪ gene FV	FVL (Fator V de Leiden)	
▪ gene FII (protrombina)	20210G>A	
▪ gene MTHFR (metilenotetrahidrofolatoredutase)	677C>T	
▪ gene eNOS (oxido nítrico sintase endotelial)	894G>T	
▪ gene eNOS (oxido nítrico sintase endotelial)	intron -4-786T→C	

33. Resumo da investigação realizada

CAUSA	EXAME	S/N	DATA	NORMAL	ANORMAL	OBS
Genética	Cariótipo do esposa					
	Cariótipo do esposo					
	Cariótipo do material de aborto					
Anatômica	Histeroscopia					
	Ecografia					
	Laparoscopia					
	Histerossalpingografia					
	Defeito mülleriano					
	Incompetência Istmocervical					
Endócrina	Biópsia de endométrio					
	Gonadotrofinas					
	Prolactina					
	Hormônios tireóideos					
	TPO - tireoperoxidase					
	Glicemia					
	Outros distúrbios identificados					
trombofilias adquiridas	Ac anticardiolipina					
	Ac lúpico anticoagulante					
	FAN fator antinuclear					
outras						

