

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE TROMBOFILIAS
HEREDITÁRIAS EM DOADORES DE SANGUE DO
HCPA E EM MULHERES COM ABORTAMENTOS
RECORRENTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
JÉSSICA DICK GUARESCHI

PORTO ALEGRE, BRASIL

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE TROMBOFILIAS
HEREDITÁRIAS EM DOADORES DE SANGUE DO
HCPA E EM MULHERES COM ABORTAMENTOS
RECORRENTES**

Orientador: Prof^a. Dr^a Sandra Leistner Segal

Co-Orientador: Prof. Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten

JÉSSICA DICK GUARESCHI

A apresentação desta dissertação
é exigência do Programa de Pós-Graduação
em Saúde da Criança e do Adolescente, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
para obtenção do título de Mestre.

PORTO ALEGRE

2019

DISSERTAÇÃO-DE-MESTRADO

JÉSSICA DICK GUARESCHI

DOIS-MIL-E-DEZENOVE

CIP - Catalogação na Publicação

Dick-Guareschi, Jéssica
ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE TROMBOFILIAS HEREDITÁRIAS
EM DOADORES DE SANGUE DO HCPA E EM MULHERES COM
ABORTAMENTOS RECORRENTES / Jéssica Dick-Guareschi. --
2019.

68 f.

Orientador: Sandra Leistner-Segal.

Coorientador: Tor Gunnar Hugo Onsten.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Abortion. 2. Thrombophilia. 3. MTHFR. 4. Factor
V. 5. Prothrombin. I. Leistner-Segal, Sandra, orient.
II. Onsten, Tor Gunnar Hugo, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

15/02/2019

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dra Têmis Maria Félix

Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra Fernanda Sales Luiz Vianna

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra Ana Carolina Brusius Facchin

Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Sandra Leistner-Segal, pela oportunidade de ingressar nesse grupo de pesquisa em 2012 permitindo-me crescer no meio acadêmico, pelos valiosos ensinamentos, pela confiança e orientação conduzida sempre de maneira respeitosa e agradável.

Ao Dr. Tor Gunnar Hugo Onsten, coorientador, que esteve presente principalmente na fase inicial de coleta deste trabalho dando todo apoio necessário. À Dra Maria Teresa agradeço pelas contribuições, apontamentos e sugestões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Saúde da Criança e do Adolescente e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela oportunidade de realizar este trabalho e obter este título em uma instituição gratuita e de qualidade.

Agradeço a Aline Bochernitsan, a Ana Carolina Farias, a Francyne Kubaski e a Franciele Trapp por todo suporte para as análises, por todas as dicas e pelos preciosos cafés que compartilhamos.

Agradeço à minha mãe Zuleica, pelo incentivo e por não medir esforços para tornar tudo isso possível, com certeza foste minha principal incentivadora.

Ao meu marido Jean, pelo zelo, pelo carinho e por fazer de tudo para tornar esse período o mais leve possível, buscando sempre me ajudar com o equilíbrio mental e emocional.

Aos demais membros da minha família e amigos que me fazem lembrar o quão importante é realizar meus sonhos, mas sem esquecer minha essência e meus princípios.

Por fim, de forma fundamental, agradeço a Deus por iluminar e orientar meu caminho durante mais esta caminhada.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A trombofilia é uma tendência aumentada para o desenvolvimento de coágulos sanguíneos, podendo ser tanto genética como adquirida, causando assim riscos de complicações como trombose venosa, embolia pulmonar ou perdas gestacionais. Considerando que o abortamento recorrente (AR) pode ser definido como dois ou mais abortamentos consecutivos, há evidências de que as trombofilias hereditárias, principalmente as variações genéticas associadas ao *fator V*, *fator II* e *MTHFR* podem estar associadas a esta condição. **OBJETIVO:** Analisar a prevalência das trombofilias hereditárias numa amostra da população do estado do Rio Grande do Sul, representada por doadores do banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e em mulheres com abortamentos recorrentes. **METODOLOGIA:** Foram examinadas 325 amostras de doadores de sangue do banco de sangue do HCPA e 33 amostras de mulheres com casos de abortamento recorrente atendidas entre os anos de 2014 a 2018 no Ambulatório Pré-Natal do HCPA. O DNA dos doadores foi extraído de papel-filtro, enquanto o material genético das mulheres com AR já estava armazenado em biorepositório. O grupo de mulheres com AR foi pareado por idade com um grupo controle de 99 mulheres doadoras de sangue para um estudo caso-controle. A genotipagem de todas as amostras foi realizada por PCR qualitativo em Tempo Real com sondas específicas para cada variante - *FV* g.1691G>A, *FII* g.2021G>A, *MTHFR* g.677C>T, *MTHFR* g.1298A>C. **RESULTADOS:** No grupo de doadores de sangue, onde a média de idade foi de 38.5 (dp ± 11.4) anos, as frequências alélicas de cada variante genética foram de *FV* g.1691G>A 96.3% (G), 3.7% (A); *FII* g.2021G>A 95.7% (G), 4.3% (A); *MTHFR* g.677C>T 44.3% (C), 42.2% (T); *MTHFR* g.1298A>C 55.4% (A), 39.1% (C). No grupo caso de mulheres com AR a idade média foi de 35 (dp ±5.7) anos, as frequências alélicas de cada variante genética foram de *FV* g.1691G>A 100% (G), 0% (A); *FII* g.2021G>A 98.5% (G), 1.5% (A); *MTHFR* g.677C>T 76% (C), 24% (T); *MTHFR* g.1298A>C 80% (A), 20% (C). Quando comparamos o grupo caso, com o grupo controle (composto de mulheres retiradas do grupo de doadores de sangue e pareado por idade) verificamos que a prevalência das mutações nos genes *FV* e *FII* foi exatamente a mesma nos dois grupos, com nenhum resultado em homozigose para as mutações. Os resultados para *MTHFR*, apesar de diferirem em prevalência, não apresentaram associação significativa entre os grupos caso e controle. **CONCLUSÃO:** Os resultados da amostra populacional de doadores de sangue descrevem as frequências das variantes associadas a trombose venosa profunda e hiperhomocisteinemia, apresentando de forma importante um conhecimento sobre o perfil genético dos doadores de sangue sul-brasileiros. Para ambas as análises, acreditamos

que um aumento no tamanho da amostra é necessário para melhor esclarecer algumas interpretações. No entanto, este estudo contribui para aumentar o conhecimento da frequência das variantes genéticas analisadas em um grupo de indivíduos da população do sul do Brasil.

Palavras-Chave: abortamento; abortamento recorrente; trombofilias hereditárias; *MTHFR*; *Fator V*; *Fator II*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Both genetically and acquired, thrombophilia is an increased tendency for the development of blood clots, thus causing risks of complications such as venous thrombosis, pulmonary embolism or gestational loss. Considering that recurrent miscarriage (RM) can be defined as two or more consecutive miscarriages, there is evidence that hereditary thrombophilias, especially genetic variations associated with *factor V*, *factor II* and *MTHFR*, may be associated with this condition. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to analyze the prevalence of hereditary thrombophilias in a population sample from the state of Rio Grande do Sul, represented by blood bank donors from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), and in women with recurrent miscarriages. **METHODOLOGY:** We examined 325 blood donor samples from the HCPA blood bank and 33 samples from women with recurrent miscarriage attended between 2014 and 2018 at the HCPA Prenatal Outpatient Clinic. DNA of donors was extracted from filter paper, while the genetic material of women with RM was already stored in a biorepository. The group of women with RM was age matched with a control group of 99 female blood donors for a case-control study. Genotyping of all samples was performed by qualitative Real-Time PCR with probes specific for each variant - *FV* g.1691G>A, *FII* g.2021G>A, *MTHFR* g.677C>T, *MTHFR* g.1298A>C. **RESULTS:** In the group of blood donors, where the mean age was 38.5 (sd ± 11.4) years, the allele frequencies of each genetic variant were *FV* g.1691G> A 96.3% (G), 3.7% (A); *FII* g.2021G> 95.7% (G), 4.3% (A); *MTHFR* g.677C> T 44.3% (C), 42.2% (T); *MTHFR* g.1298A> C 55.4% (A), 39.1% (C). In the case of women with RA the mean age was 35 (sd ± 5.7) years, the allele frequencies of each genetic variant were *FV* g.1691G> A 100% (G), 0% (A); *FII* g.2021G> 98.5% (G), 1.5% (A); *MTHFR* g.677C> T 76% (C), 24% (T); *MTHFR* g.1298A> C 80% (A), 20% (C). When comparing the case group with the control group of women withdrawn from the age-matched blood donor group we found that the prevalence of mutations in the *FV* and *FII* genes was exactly the same in the two groups, with no homozygous results for the mutations. The results for *MTHFR*, although differing in prevalence, did not present a statistical significant association between the case and control groups. **CONCLUSION:** Results of the population sample of blood donors describe the frequencies of the variants associated with deep venous thrombosis and hyperhomocysteinemia, presenting important knowledge about the genetic profile of blood donors in South Brazil. Regarding the screening of these alterations in women with RM, the data suggest that there is no association. For both analyzes, we believe that an increase in sample size is necessary to better clarify some interpretations. Nevertheless, this

study contributes to increase the knowledge of the frequency of the genetic variants analyzed in a group of individuals of the population of south Brazil.

Keywords: miscarriage; recurrent miscarriage; hereditary thrombophilia; *MTHFR*; *Factor V*; *Factor II*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estratégia e resultado de busca de referências bibliográficas.....	17
FIGURA 2 - Representação esquemática do Gene do <i>FV</i>	21
FIGURA 3 – Cascata de Coagulação.....	23
FIGURA 4 - Mecanismo TaqMan	29
FIGURA 5 – Gráfico de Discriminação Alélica da variante g.677C>T.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

A	Adenida
AER	Abortos Espontâneos de Repetição
Arg	Arginina
APC	<i>Activated Protein C</i> (Proteína C Ativada)
ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
AR	Abortamento Recorrente
CF	<i>Consent Form</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESHRE	<i>European Society of Human Reproduction and Embryology</i>
FP	<i>Filter-Paper</i>
FVL	<i>Factor V Leiden</i> / Fator V de Leiden
G	Guanina
Gln	Glutamina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Hcy	<i>Homocysteine</i>
Hci	Homocisteína
HET	<i>Heterozygous</i> / Heterozigoto
MTHFR	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i> / Metilenotetrahidrofolato Redutase
MUT	<i>Homozygous for the Mutation</i> / Homozigoto para a Mutação
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PF	Papel-Filtro
RM	<i>Recurrent Miscarriage</i>

RPCA	Resistência à Proteína C Ativada
SAR	Síndrome de Abortamento Recorrente
SGM	Serviço de Genética Médica
SIPF	Sangue Impregnado em Papel-Filtro
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEV	Tromboembolismo Venoso
WD	<i>Wild-Type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	16
2.2. TROMBOFILIAS	18
2.3. ABORTAMENTOS RECORRENTES E TROMBOFILIAS	18
2.4. VARIANTE DO <i>FATOR V</i>	19
2.5. VARIANTE DO <i>FATOR II</i>	22
2.6. VARIANTES DO <i>MTHFR</i>	23
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. OBJETIVO GERAL.....	26
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. METODOLOGIA.....	27
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	27
5.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	27
5.2.1. Doadores de sangue	27
5.2.2. Mulheres com casos de abortamentos recorrentes	27
5.3. GRUPO DE PESQUISA	28
5.4. PROCEDIMENTOS	28
5.4.1. Extração do DNA de SIPF	28
5.4.2. Genotipagem.....	28
5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ARTIGOS ORIGINAIS	39

7.1. THE IMPACT OF HEREDITARY THROMBOPHILIAS IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE: A CASE-CONTROL STUDY	39
7.2. PREVALENCE OF HEREDITARY THROMBOPHILIAS IN BLOOD DONORS OF A REGIONAL HOSPITAL IN THE SOUTH OF BRAZIL	53
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	65
9. ANEXOS	66
9.1. ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	66
9.2. ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO PARA DOADORES DE SANGUE.....	68

1. INTRODUÇÃO

Os mecanismos envolvidos na reprodução humana são altamente complexos, sendo um processo relativamente ineficiente, pois segundo estudos epidemiológicos a fecundidade – probabilidade de alcançar uma gestação de sucesso, por ciclo menstrual – é de apenas 20-25%, em humanos (REGAN *et al.*, 2000; PLATTEAU *et al.*, 2006; TEKLENBURG *et al.*, 2010). Paralelamente à subfertilidade, a incidência de dissipação embrionária e perda gestacional é também elevada, sendo o abortamento a complicação mais frequente entre todos os desfechos adversos da gravidez (BOTTOMLEY *et al.*, 2009; TEKLENBURG *et al.*, 2010; VATIN *et al.*, 2014), sendo o abortamento recorrente definido como duas ou mais perdas gestacionais de forma repetida (SHAPIRA *et al.*, 2012).

Tanto hereditária como adquirida, a trombofilia tem sido descrita como um fator de risco para o aumento da suscetibilidade a resultados adversos de gravidez. A gravidez por si só é um estado de hipercoagulabilidade. A alteração fisiológica na hemostase, associada à gravidez, têm como função contrariar a instabilidade inerente à placentação hemocorial, que é característica dos seres humanos (LOCKWOOD *et al.*, 2011). O abortamento recorrente (AR), pode estar associado a desordens hemostáticas (RAY & REGAN, 2006).

No início do século XX surgiram as primeiras descrições de famílias com predisposição aumentada para eventos trombóticos, em especial, trombose e embolia pulmonar após operações e gestações (FRANCO *et al.*, 2001). As causas genéticas mais conhecidas que predisõem a trombofilias em caucasianos são as variantes no *fator V* (g.1691G>A), no *fator II* (g.20210G>A) e no *MTHFR* (g.677C>T e g.1298A>C) (HIMABINDU *et al.*, 2012).

As variantes nos genes de *FV* e *FII* já fazem parte do *screening* dos pacientes com tromboembolismo venoso (TEV) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através da técnica de PCR em Tempo Real. Assim, incluímos a análise das variantes de *MTHFR* para analisar a relação destas variantes com os casos de AR que ocorreram no HCPA nos últimos 5 anos, bem como, buscamos uma população saudável, representada por doadores de sangue do HCPA, para que pudéssemos averiguar a prevalência das variantes numa amostra sul-brasileira.

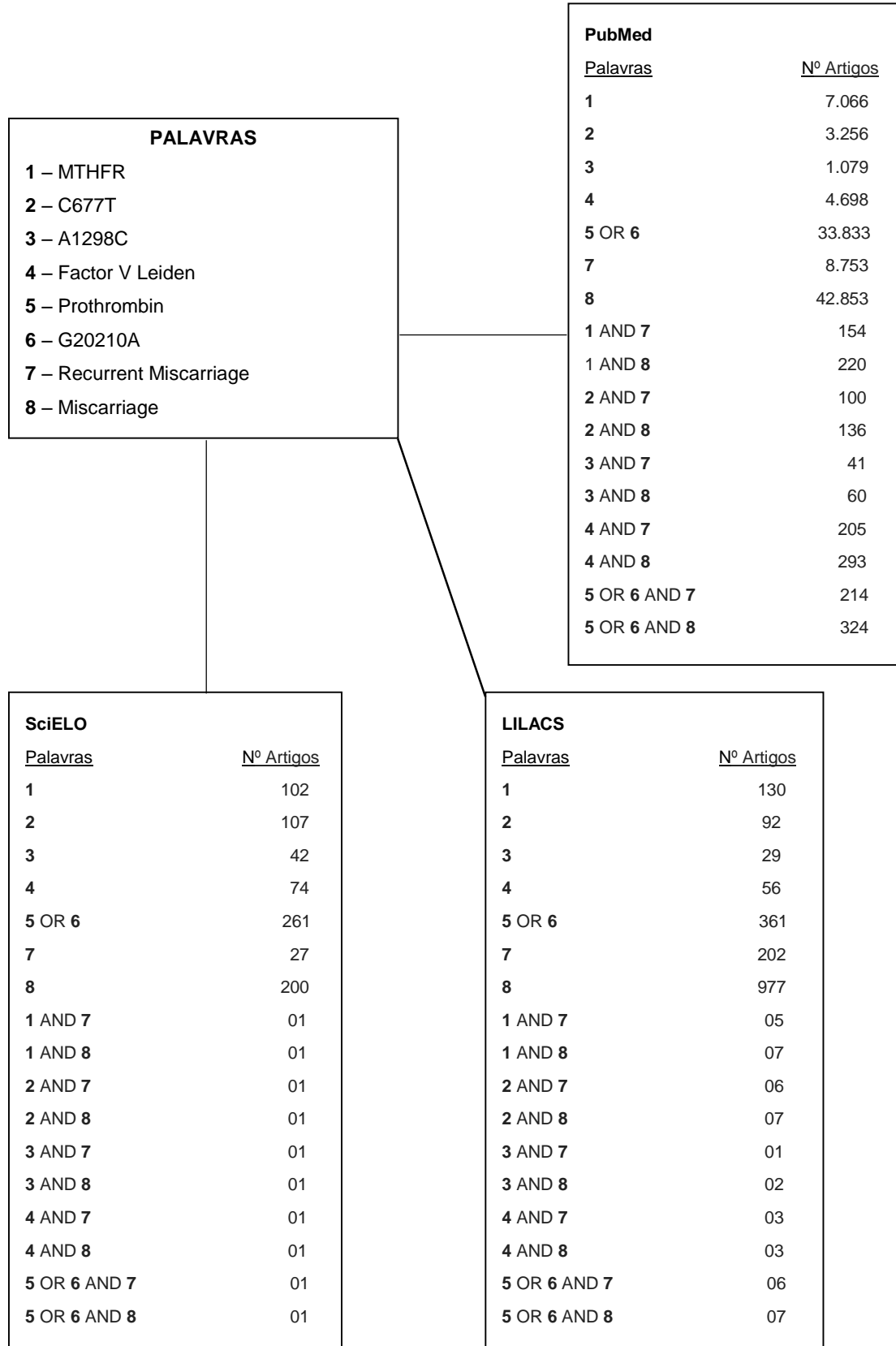
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A busca dos artigos para a revisão da literatura desta dissertação teve como foco os aspectos relacionados ao tromboembolismo venoso, abortamento recorrente, *MTHFR*, *gene do fator V* e *gene da protrombina*, incluindo artigos que relatam as manifestações clínicas, epidemiologia e aspectos moleculares

Foram utilizadas três bases de dados, incluindo: PubMed, SciELO e LILACS. A partir dos resultados encontrados, os artigos foram selecionados conforme sua relevância em relação ao assunto abordado nesta revisão. A Figura 1 apresenta as palavras-chaves e as combinações utilizadas nestas buscas.

Figura 1 - Estratégia e resultado de busca de referências bibliográficas. Foram utilizadas combinações de palavras, conforme é possível verificar na figura abaixo, para a busca das referências bibliográficas nas bases de dados PubMed, SciELO e Lilacs



2.2. TROMBOFILIAS

A predisposição ao tromboembolismo (oclusão de vaso sanguíneo por coágulos, também chamados de trombos) devido à presença de fatores genéticos ou adquiridos é denominada trombofilia (ROSENDAL, 1999). A trombose é uma doença de caráter multifatorial, e tanto fatores de risco genéticos quanto adquiridos (uso de anticoncepcional oral, gravidez, imobilização pós-cirúrgicas, traumatismo ou doenças malignas), podem estar presentes em um mesmo indivíduo, sendo o tromboembolismo resultante da interação sinérgica ou não entre esses fatores (FRANCO *et al.*, 2001).

Pacientes com trombofilia hereditária exibem uma predisposição à trombose recorrente e, o evento trombótico ocorre, em geral, antes dos 45 anos de idade. As doenças tromboembólicas são uma das causas mais comuns de morbidade, incapacitação e mortalidade, com incidência na população geral de um caso para cada mil indivíduos por ano (POORT *et al.*, 1996; MILANI *et al.*, 2008).

Em contraste com as doenças monogênicas, onde mutações em um único gene resultam na doença, em doenças multifatoriais, como a trombose venosa, diferentes mutações em genes distintos interagem para ocasionar o evento. Desta forma, a predisposição à trombose venosa associada com cada alteração genética isolada é relativamente baixa, porém a presença de mutações em vários genes aumenta significativamente o risco de desenvolvimento da doença (FRANCO *et al.*, 2001).

2.3. ABORTAMENTOS RECORRENTES E TROMBOFILIAS

Segundo a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (*American Society for Reproductive Medicine - ASRM*), a síndrome de abortamento recorrente (SAR) é definida por duas ou mais perdas gestacionais, até a 20^o semana de gestação (SHAPIRA *et al.*, 2012; SARAVELOS *et al.*, 2014), no entanto, a maioria dos clínicos recomendam iniciar avaliações desde o início do segundo abortamento (SHAPIRA *et al.*, 2012; SARAVELOS *et al.*, 2014).

Estatisticamente, menos de 5% das mulheres sofrem dois abortamentos consecutivos, e apenas 1-3% relatam três ou mais perdas gestacionais (CAO *et al.*, 2013; VAN DEN BERG *et al.*, 2014), entretanto esta incidência é superior ao que seria de esperar ao acaso (LARSEN *et al.*, 2013). Outro dado importante é que apenas 50-60% dos abortamentos têm etiologia identificada (KIWI, 2006; BREZINA *et al.*, 2014).

Múltiplos fatores genéticos podem estar na gênese da inviabilidade da gravidez, entre elas, estas quatro variantes polimórficas - *Fator V* - g.1691G>A, *Fator II* - g.20210G>A e *Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)* - g.677C>T e g.1298A>C - são candidatas a predispor o tromboembolismo venoso na gravidez, conforme apontado por diversos estudos (BOMBELL & MCGUIRE, 2008; FIROUZABADI *et al.*, 2009; FINAN *et al.*, 2010; TRAINA *et al.*, 2011; FRAGA *et al.*, 2014).

As trombofilias hereditárias, foram demonstradas como causadoras de perdas gestacionais recorrentes, (KIWI, 2006; SU *et al.*, 2013) diagnosticadas em 50 a 65% das mulheres com história de AR inexplicável (D'UVA *et al.*, 2010). Podem ser devidas à deficiência em inibidores da coagulação, ou a variantes nos genes trombofílicos, predispondo ao desenvolvimento de microtrombos na vascularização feto-materna acarretando na redução da perfusão do espaço intervilositário, infarto placentário, efeitos citotóxicos diretos causando, conseqüentemente, AR (ABRAITIS *et al.*, 2007)

É um diagnóstico a considerar sobretudo quando existem antecedentes pessoais ou familiares de distúrbios trombóticos, como TEV (D'UVA *et al.*, 2010).

O Fator V Leiden (FVL) – o fator hereditário de risco trombótico mais comum no AR (D'UVA *et al.*, 2010) – provoca trombose pela resistência do Fator V à inativação pela Proteína C ativada, levando à produção aumentada de trombina e, conseqüentemente, hipercoagulação (MTIRAOUÏ *et al.*, 2005; D'UVA *et al.*, 2010)

A variante do *fator II* (g.20210G>A) intensifica o acúmulo de protrombina e a síntese de trombina, predispondo a eventos tromboembólicos (MTIRAOUÏ *et al.*, 2005).

Elevados níveis de homocisteína também parecem predispor aos AR e, uma das causas genéticas frequentes de hiperhomocisteinemia são as variantes do gene *MTHFR* (g.677C>T e g.1298A>C), que resultam em atividade reduzida da enzima promovendo um estado tendencialmente trombótico (KIM *et al.*, 2006, CAO *et al.*, 2013).

2.4. VARIANTE DO *FATOR V*

O fator V (FV) é uma glicoproteína de 330 kDa que, quando ativada, potencializa a conversão da protrombina em trombina. Sua atividade pró-coagulante é inibida por meio da clivagem pela proteína C ativada (APC) nas regiões Arg306, Arg506 e Arg679. A substituição da guanina pela adenina na posição 1691, no éxon 10 do gene do *Fator V*, resulta na troca da

Arginina (Arg) pela Glutamina (Gln) na posição 506 da proteína, alteração também conhecida como Fator V de Leiden (FVL) (BERTINA, 2001; NORSTROM, 2002). Tal alteração reduz substancialmente a inativação pela APC, pois seu sítio de clivagem está alterado, elevando assim a geração de trombina e podendo desenvolver um estado de hipercoagulabilidade (BERTINA, 2001). Em 1993, Dahlback e colaboradores descreveram que uma baixa resposta anticoagulante a proteína C ativada era associada com risco de trombose (DAHLBACK *et al.*, 1993).

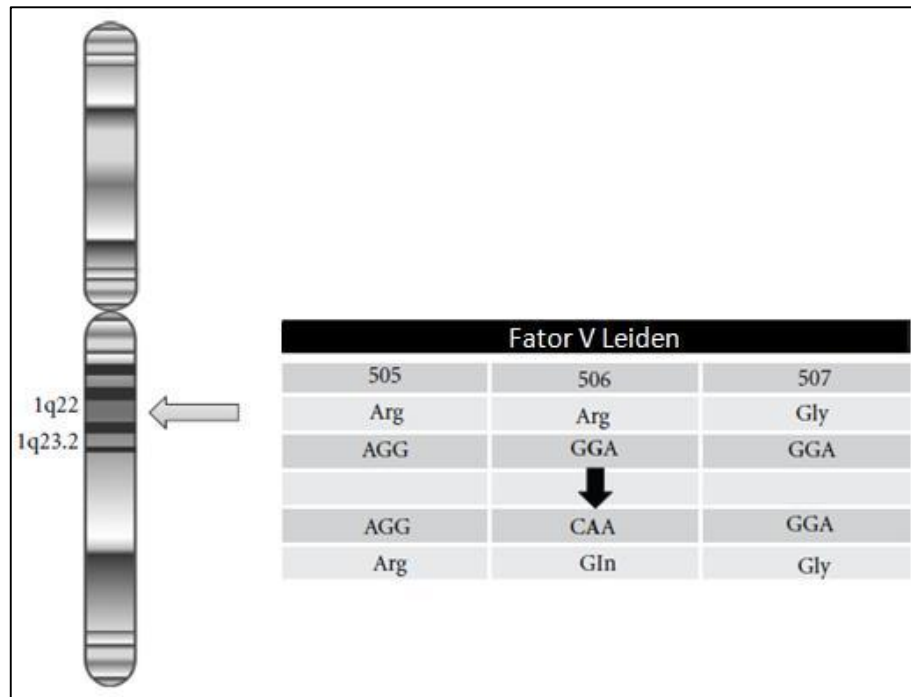
O FV circula em sua forma inativa até o sistema de coagulação ser ativado devido à dano nos vasos sanguíneos. Em um estado normal, FV ativado (FVa) age como um cofator que interage com a forma ativa do fator X para converter protrombina em trombina que, conseqüentemente, cliva o fibrinogênio em fibrina. Assim, a fibrina polimeriza levando à formação de um trombo. A participação da APC como um anticoagulante natural limita a extensão da coagulação por clivagem e degradação do FV. APC cliva o FV em sítios específicos (na posição 506) e desregula seu funcionamento, entretanto previne o excessivo crescimento do trombo (PEREZ-PUJOL *et al.*, 2012).

A clivagem do FV também irá permitir a inativação do fator VIIIa, outra proteína essencial para o processo. APC é incapaz de inativar o FV quando ocorre variação nessa proteína: uma única troca em um aminoácido na posição 506, uma arginina é substituída por uma glutamina (Figura 2) (PEREZ-PUJOL *et al.*, 2012).

O FVL é o fator de risco herdável mais prevalente para tromboembolismo venoso (TEV) (COPPOLA *et al.*, 2009). Portadores heterozigotos tem um risco aproximado 3-5x maior para TEV, enquanto que o risco em portadores homozigotos é estimado sendo 80x maior que em indivíduos sem FVL. É o fator de risco trombótico mais prevalente na população caucasiana, estando presente em 3-7% dos indivíduos, mas é raro em Asiáticos e Africanos (FAVAROLO *et al.*, 2012).

A incidência absoluta de TEV em pacientes com mutação no FVL varia de 0,19% a 0,45% por ano, comparada a 0,10% em indivíduos sem a mutação (ROSENDAAL *et al.*, 2009). FVL está presente em heterozigose em aproximadamente 15-20% dos pacientes com TEV (FAVAROLO *et al.*, 2012).

Figura 2 – Representação esquemática do Gene do FV. O Gene do FV é localizado no braço longo do cromossomo 1 na posição 23.



Fonte: Adaptado de PEREZ-PUJOL *et al.*, 2012.

TEV e o risco absoluto de trombose irá depender da interação com outros fatores tais como: idade, gravidez, imobilização, viagem prolongada, cirurgias maiores ou ortopédicas, câncer, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal (FRANCHINI, 2012).

Além disto, FVL aumenta o risco de abortamento recorrente, possivelmente devido à trombose na placenta, e também tem sido associado com aumento no risco de pré-eclampsia, ruptura de placenta, natimortos e restrição de crescimento fetal intrauterino sem etiologia (FRANCHINI, 2012).

Assim, conforme o Colégio Americano de Genética Médica, o FVL deve ser testado nas seguintes circunstâncias: 1º TEV antes dos 50 anos, 1º TEV após 50 anos na ausência de malignidades, trombose venosa em sítios incomuns (tais como veias hepáticas, mesentéricas e cerebrais), TEV recorrente, 1º TEV com história familiar, TEV durante gravidez, período pós-parto ou em mulheres tomando contraceptivo oral ou sob terapia de reposição hormonal, mulheres com perda gestacional inexplicada e familiares de pacientes com FVL (FRANCHINI, 2012).

Testar o FVL nesses casos é muito útil e pode beneficiar de alvos de tromboprofilaxia em situações de alto risco e para evitar fatores de risco adquiridos (FRANCHINI, 2012).

O diagnóstico do FVL pode ser realizado por técnicas de análise gênica baseadas em amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) do éxon 10 do fator V.

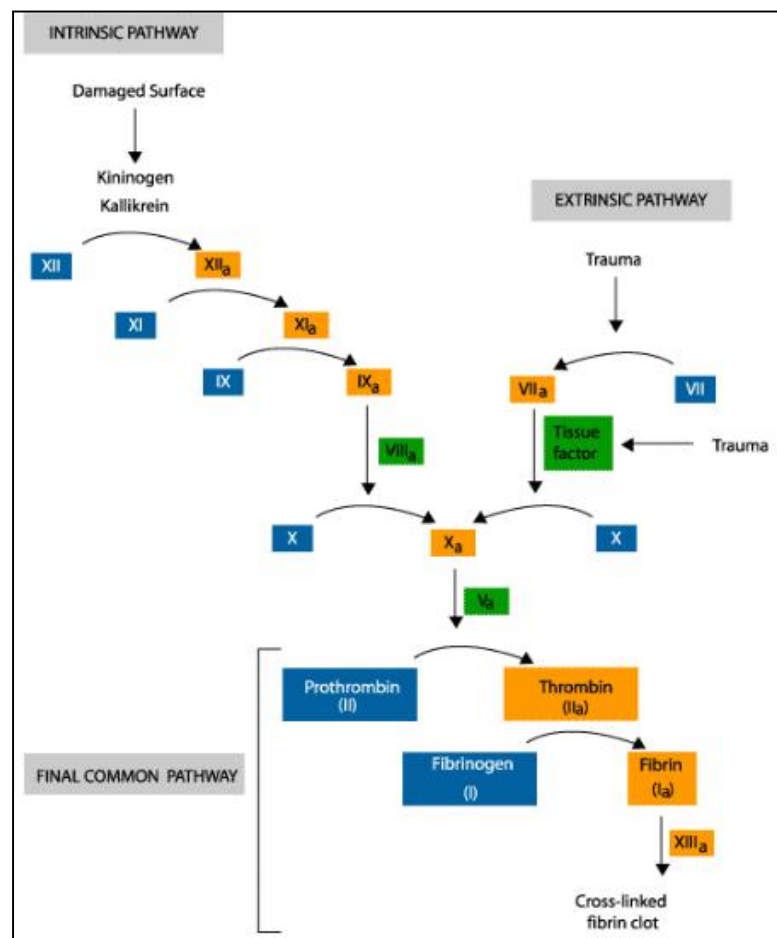
2.5. VARIANTE DO *FATOR II*

A protrombina ou fator II de coagulação, é uma proteína sanguínea sintetizada no fígado na presença de vitamina K. É precursora da trombina, que ao final da cascata de coagulação induz a formação de fibrina (Figura 3). Participando também dos mecanismos de controle de coagulação, ligando-se à trombomodulina e ativando o sistema da proteína C, tem papel fundamental no equilíbrio anticoagulante (POORT, 1996). O gene responsável pela protrombina contém aproximadamente 21.000 pb, composto de 14 éxons e 13 íntrons, localizado próximo ao centrômero no cromossomo 11 (ZIVELIN, 1998).

Em 1996, uma variante alélica foi descrita nesse gene, associando-a a etiologia do TEV. A alteração consiste em uma mutação pontual, em que ocorre a transição de uma guanina (G) por uma adenina (A) na posição 20210 na região 3' UTR do gene do *fator II (FII)*. Essa mutação induz um ganho de função, associado a hiperprotrombinemia, o que aumenta a formação de trombina e predispõe à ocorrência de trombose (POORT, 1996; FRANCO *et al.*, 1999; JADAON, 2011).

É considerada a segunda anormalidade genética mais frequentemente associada às trombofilias e sua descrição veio reforçar o conceito de que fatores genéticos determinam o risco de TEV. Esta mutação é encontrada em 1-3% de indivíduos da população geral, e em 6-18% dos pacientes com TEV (POORT, 1996). Pesquisas realizadas na população em geral mostraram frequência de 2% para o genótipo heterozigoto (ROSENDAAL, 1998). Esta mutação encontra-se com maior frequência na população caucasiana e ainda não foi encontrada em pacientes negros e asiáticos (HIRA, 2003). No sul do Brasil, uma pesquisa sobre a variante do gene de *FII* apresentou frequências genótípicas em heterozigose de 15.2% em Santa Catarina e 7.3% no Paraná (HERKENHOFF, 2012).

Figura 3 - Cascata de Coagulação. Sequência de reações químicas que possui duas vias: intrínseca (via da ativação de contato) e extrínseca (via do fator tissular). Ambas vias têm grande importância e acabam se juntando para formação do coágulo de fibrina. Os fatores de coagulação são numerados por algarismos romanos e a adição da letra “a” indica que eles estão em sua forma ativada. Os fatores de coagulação são geralmente enzimas com exceção dos fatores V e VIII que são glicoproteínas e do fator XIII que é uma transglutaminase.



Fonte: Anaesthesia UK (Coagulation - classical model)

2.6. VARIANTES DO *MTHFR*

A enzima *MTHFR* catalisa a redução de NADPH ligada a redução de 5,10-metilenotetrahidrofolato para 5-metiltetrafolato, que serve como um cofator na metilação da homocisteína para metionina. O gene *MTHFR* tem pelo menos duas variantes, g.677C>T e g.1298A>C e ambas estão associadas a redução da atividade enzimática. O alelo T para

MTHFR g.677C>T está associado a redução da atividade enzimática, diminuição das concentrações de folato no soro, plasma e glóbulos vermelhos, e levemente aumentaram as concentrações plasmáticas de homocisteína total (tHcy), já o alelo C para MTHFR g.1298A>C não apresenta alterações bioquímicas (FROSST *et al.*, 1995; HESSNER *et al.*, 1999).

Duplo heterozigoto para as variantes g.677C>T e g.1298A>C resulta em menor atividade da enzima MTHFR, em comparação com a heterozigosidade para qualquer uma das variantes de *MTHFR* separadamente (VAN DER PUT *et al.*, 1998). A variante g.677C>T gera uma enzima termoestável com aproximadamente 50% da atividade normal (FROSST *et al.*, 1995).

Em caucasianos, a frequência de indivíduos homozigotos varia de 5 a 16% (HESSNER *et al.*, 1999). Em 2015, Niewiadonski e colaboradores, encontraram em seu estudo com doadores de sangue de São Paulo, a frequência de 9.8% de homozigotos para a variante g.677C>T e 6.1% de homozigotos para g.1298A>C (NIEWIADONSKI *et al.*, 2015).

A atividade normal da enzima *MTHFR* é crucial para manter o pool de folato e metionina circulante e prevenir acúmulo de Hcy. As variantes no gene *MTHFR*, que causam moderada hiperhomocisteinemia, apesar de resultados controversos, podem ser consideradas fatores de risco para doença coronariana, trombose venosa, infarto e complicações gestacionais, dentre elas AR (HERMANN *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

A caracterização de fatores de risco para os AR tem grande importância clínica e representa uma etapa fundamental na compreensão da patogênese desta condição., uma vez que apenas cerca de 50% dos casos têm sua etiologia identificada. Assim, buscamos verificar a importância de realizar, ou não, a análise de variantes genéticas relacionadas à trombofilias hereditárias em mulheres que pretendem engravidar ou mulheres em início de gestação, buscando reduzir as chances de abortos espontâneos.

Além disto, considerando também que no Sul do Brasil possuímos uma influência genética européia devido a questões de imigração de colonização local, ainda dispomos de poucos dados na literatura especializada com relação à prevalência destas alterações genéticas, tornando-se evidente a importância de se conhecer essa população, uma vez que estes dados poderiam ser úteis para a estimativa do risco para algumas doenças, como o tromboembolismo venoso.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a prevalência de variantes em genes de predisposição à trombofilias hereditárias numa amostra da população do estado do Rio Grande do Sul, representada por doadores do banco de sangue do HCPA e em mulheres com abortamentos recorrentes.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência alélica e genotípica das variantes *FV* g.1691G>A, *FII* g.2021G>A, *MTHFR* g.677C>T e *MTHFR* g.1298A>C em amostra de doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Avaliar a frequência alélica e genotípica das variantes *FV* g.1691G>A, *FII* g.2021G>A, *MTHFR* g.677C>T e *MTHFR* g.1298A>C em um grupo de mulheres com abortamentos recorrentes provenientes do ambulatório de Diagnóstico Pré-natal do Serviço de Genética Médica do HCPA.
- Avaliar se há associação entre os abortamentos recorrentes e a presença das variantes genéticas em questão, através da comparação com um grupo controle pareado por idade.

5. METODOLOGIA

5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo Observacional - Transversal e Caso-Controle

5.2. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

5.2.1. Doadores de sangue

Durante o período de 18 de outubro de 2017 até dia 10 de julho de 2018 foram coletadas amostras de sangue em papel filtro de doadores de sangue, desde que este estivesse disposto a participar da pesquisa após explanação do projeto, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE- Anexo 1) e preenchendo o Questionário para Doadores de Sangue (Anexo 2).

A coleta foi realizada no mesmo momento da análise de hemoglobina, que faz parte do processo triagem para doação de sangue. Assim, nem todos os participantes da pesquisa doaram sangue efetivamente. Todos participantes da pesquisa foram cadastrados em um banco, por meio de numeração, onde as informações foram registradas.

Os critérios de exclusão deste grupo foram os seguintes:

- Doadores que não compreenderam o objetivo do estudo devido a sua condição clínica ou que não apresentarem condições de exercerem sua autonomia;
- Doadores acompanhados de algum familiar que já havia sido incluído como participante desta pesquisa.

5.2.2. Mulheres com casos de abortamentos recorrentes

Buscamos junto ao Ambulatório de Genética Pré-Natal do HCPA as mulheres que haviam consultado, durante o início do ano de 2014 até o final do ano de 2018, com casos de abortamento de repetição. Essas mulheres já tinham seu DNA extraído e armazenado em biorrepositório do Serviços de Genética Médica (SGM), bem como já possuíam diagnóstico para as variantes do *fator V* (g.1691G>A) e do *fator II* (g.20210G>A).

Para a análise das variantes de *MTHFR* realizamos o diagnóstico com o DNA já existente, de forma anônima, solicitando dispensa de TCLE devido ao fato das variantes g.677C>T e g.1298A>C serem bastante comuns na população saudável.

5.3. GRUPO DE PESQUISA

Este projeto está vinculado ao Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Genética Médica e ao Banco de Sangue do Serviço de Hemoterapia, ambos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5.4. PROCEDIMENTOS

5.4.1. Extração do DNA de SIPF

Após a coleta da amostra de sangue impregnado em papel-filtro (SIPF) elas foram secas em temperatura ambiente (25-27°C) e em seguida armazenadas em embalagens plásticas, com sílica, previamente identificadas.

Para execução da extração de DNA utilizamos 3 picotes em discos de 3mm de diâmetro, de cada amostra. Os discos foram lavados com água de injeção por 2 vezes, ocorrendo o descarte do sobrenadante após cada lavagem. Por fim, os picotes de cada amostra foram transferidos para poços de placas e incubados em termociclador a 95°C por 30 minutos, conforme protocolo adaptado de KATO *et al.*, 2014.

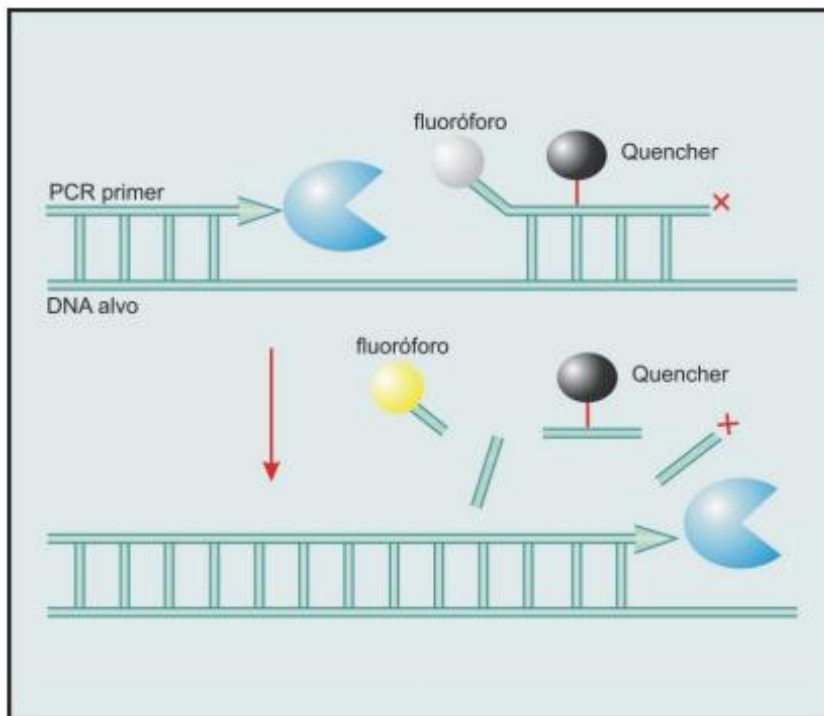
Em seguida, as amostras já estavam prontas para genotipagem ou para serem armazenadas em geladeira por até 1 mês.

5.4.2. Genotipagem

Utilizamos a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real, com sondas TaqMan® (Life Technologies) disponíveis comercialmente e utilizadas para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. A reação com TaqMan® é considerada um método sensível para determinar a presença ou ausência de sequências específicas (HOLLAND *et al.*, 1991). Estas sondas apresentam na extremidade 5' um fluoróforo marcado com VIC ou FAM (que emite luz captada pelo sistema óptico do

equipamento) e na extremidade 3' um quencher (molécula que aceita energia do fluoróforo, impedindo que o sistema capte luz) (Figura 4). A sonda TaqMan® hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após atividade exonuclease 5' - 3' da Taq DNA polimerase.

Figura 4 – Mecanismo TaqMan. Ilustração da técnica TaqMan®, que por meio da Taq Polimerase libera o fluoróforo, permitindo que o sistema óptico do equipamento Step One capte luz.



Para a reação de PCR foi preparado um MIX contendo: 6µL de Master Mix (TaqMan™ Genotyping Master Mix), 0.3µL de sonda TaqMan® (de acordo com a variante analisada), 2.7µL de água ultrapura e 3µL de DNA. A genotipagem ocorreu de acordo com as instruções do fabricante. Um controle negativo (sem DNA), foi adicionado a cada placa para garantir isenção de contaminação. O equipamento Step One (Applied Biosystems, Life Technologies) foi programado com o seguinte ciclo de PCR: estágio de pré-leitura a 60°C por 30", estágio de preparação a 95°C por 10", estágio de PCR que consiste em duas etapas de 60

ciclos - etapa I a 95°C por 15'' / etapa II a 60°C por 01' - e, finalmente a estágio pós-leitura a 60°C por 30''.

A leitura dos resultados da genotipagem de SNPs por PCR em tempo real (“endpoint”) avalia a emissão de fluorescência das sondas no final da termociclagem. Assim, para cada uma das quatro variantes analisadas três grupos diferentes podem ser observados (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto mutado), de acordo com o tipo de fluorescência emitida (Figura 5).

Figura 5 – Gráfico de Discriminação Alélica da variante g.677C>T. Gráfico com o resultado final da reação de uma das análises realizadas para o gene *MTHFR* g.677C>T.



Azul = homozigoto mutado / Verde = heterozigoto / Vermelho = homozigoto selvagem

5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 25.0 (IBM SPSS Inc., Chicago 2011), com nível de significância estabelecido em 5% e IC=95% (p-value <0.05). As variáveis contínuas foram descritas como média (+/- desvio padrão), as proporções foram expressas como porcentagens e as comparações entre os grupos caso e controle foram realizadas por teste qui-quadrado de Pearson.

5.6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo seguiu as condições estabelecidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA (projeto nº 17-0207). O TCLE (Anexo 1) foi entregue aos participantes da pesquisa do banco de sangue do HCPA e assinado. Solicitamos dispensa de TCLE apenas para as mulheres que já haviam realizado os diagnósticos durante os anos de 2014 a 2018, sendo estas avaliadas de forma anônima no estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTINA R.M., Koeleman R.P.C., Koster T., et al., (1994). Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369: 64-67.

BERTINA R.M. (2001). Genetic approach to thrombophilia. *Thromband Haemost* 86(1):92-103.

BOMBELL, S. & MCGUIRE, W. (2008). Citokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology* 48:147-154.

BOTTOMLEY C., BOURNE T. (2009) Diagnosing miscarriage. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 23(4):463-77

BREZINA P.R., KUTTEH W.H. (2014). Classic and Cutting-Edge Strategies for the Management of Early Pregnancy Loss. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 41(1):1-18.

CAO Y., XU J., ZHANG Z., et al., (2013). Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene* 514(2):105-11

COPPOLA A., TUFANO A., CERBONE A.M., et al., (2009). Inherited thrombophilia: implications for prevention and treatment of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 35:683-694.

CROWTHER M.A., KELTON J.G. (2003). Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 138:128e134.

DAHLBACK B., CARLSSON M., SVENSSON P.J. (1993). Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1004-1008.

D'UVA M., MICCO P.D., STRINA I., *et al.*, (2010). Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. *Journal of clinical medicine research* 2(1):18-22.

FAVAROLO E.J., MCDONALD D. (2012). Futility of testing for factor V Leiden. *Blood Transfusion* 10:260-263.

FINAN R.R., AL-IRHAYIM Z., MUSTAFA F.E., AL-ZAMAN I., MOHAMMED F.A., AL-KHATEEB G.M., *et al.*, (2010). Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology* 84:186-192.

FIROUZABADI R.D., GHASEMI, N., ROZBAHANI M.A., TABIBNEJAD N. (2009). Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 49:216-219.

FRAGA L.R., DUTRA C.G., BOQUETT J.A., VIANNA F.S.L., GONÇALVES R.O., PASKULIN D.D., *et al.*, (2014). p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Molecular Biology Reports* 41:1871-1877.

FRANCHINI M. (2012). Utility of testing factor V Leiden. *Blood Transfusion* 10:257-259.

FRANCHINI M., MANNUCCI P.M. (2014). ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost* 112:1103–1109.

FRANCO R.F., MORELLIV., LOURENÇO D., *et al.*, (1999). A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. *Br J Haematol* 105:556-559.

FRANCO R.F., REITSMA P.H. (2001). Genetic risk factors of venous thrombosis. *Human Genetics* 109:369-384.

FROSST P., BLOM H.J., MILOS R., *et al.*, (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics* 10:111-113.

HERRMANN F.H., SALAZAR-SANCHEZ L., SCHRÖDER W., *et al.*, (2001). Prevalence of Molecular Risk Factors FV Leiden, FV HR2, FII 20210G>A and MTHFR 655C>T in different populations and ethnic groups of Germany, Costa Rica and India. *IJHG* 1(1):33-39.

HERKENHOFF M.E., GAULKE R., SOUZA J.G., THOMÉ N.S., PITLOVANCIV A.K., REMUALDO V.R., *et al.*, (2012). Análise da mutação G20210A no gene da protrombina (fator II) em pacientes com suspeita de trombofilia no sul do Brasil. *J Bras Patol Med Lab* 48(2):85-89.

HESSNER J.M., DINAUER D.M., LUHM R.A., *et al.*, (1999). Contribution of the glycoprotein Ia 807TT, methylene tetrahydrofolate reductase 677TT and prothrombin 20210GA genotypes to prothrombotic risk among factor V 1691GA (Leiden) carriers. *British Journal of Haematology* 106:237-239.

HIMABINDU G., RAJASEKHAR D., LATHHEEF K., *et al.*, (2012). Factor V Leiden mutation is not a predisposing factor for acute coronary syndromes. *Indian Heart Journal* 64:570-575

HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R., *et al.*, (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(16):7276–7280.

JADAON M.M. (2011). Epidemiology of Prothrombin G20210A mutation in the Mediterranean Region. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 3:1-7.

KATO N., SA'ADAH N., AR ROCHMAH M., *et al.*, (2014). SMA screening system using dried blood spots on filter paper: application of COP-PCR to the SMN1 deletion test. *Kobe J Med Sci*, 60:78-85.

KIM N.K., CHOI Y.K., KANG M.S., *et al.*, (2006). Influence of combined methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and thymidylate synthase enhancer region (TSER) polymorphisms to plasma homocysteine levels in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Thromb Res* 117(6):653-8.

KIWI R. (2006). Recurrent pregnancy loss: evaluation and discussion of the causes and their management. *Cleveland Clinic journal of medicine* 73(10):913-21.

LOCKWOOD C., WENDEL G (2011); Committee on Practise Bulletins – Obstetrics. Practice Bulletin No. 124: Inherited thrombophilias in pregnancy. *Obstet Gynecol*; 118:730-740.

MAKRIS M. (2012). Factor V Leiden: to test or not to test, that is the debate. *Blood transfusion* 10:255-256.

MEIJERS D.C., TEKELENBURG W.L., BOUMA B.N., *et al.*, (2000). High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 342:696-701.

MILANI C., CONSTANTINOU M., BERZ D., *et al.*, (2008). Left sided inferior vena cava duplication and venous thromboembolism: case report and review of literature. *Journal of Hematology & Oncology* 1:24-27.

MTIRAOUI N., BORGI L., HIZEM S., *et al.*, (2005). Prevalence of antiphospholipid antibodies, factor V G1691A (Leiden) and prothrombin G20210A mutations in early and late recurrent pregnancy loss. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 119(2):164-70.

NICOLAES G.A.F., DAHLBACK B. (2002). Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:530-538.

NIEWIADONSKI V.D.T., SANTOS B.J.V., ALMEIDA-NETO C., GABURO N.Jr., SABINO E.C., (2015). Evaluation of a High Throughput Method for the Detection of Mutations Associated with Thrombosis and Hereditary Hemochromatosis in Brazilian Blood Donors. *Plos One* 10(5):e0125460.

NORSTROM E., THORELLI E., DAHLBACK B., *et al.*, (2002). Functional characterization of recombinant FV Hong Kong and FV Cambridge. *Bood* 100:524-530.

PLATTEAU P., STAESSEN C., MICHIELS A., *et al.*, (2006). Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening? *Reproductive biomedicine online* 12(3):334-9

PEREZ-PUJOL S., ARAS O., ESCOLAR G. (2012). Factor V Leiden and Inflammation. *Thrombosis* 2012:1-10.

POORT S.R., (1996). A common genetic variation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated prothrombin levels and a increase in venous thrombosis. *Blood Journal* 88(10):3698-3703.

RAY, R. & REGAN, L. (2006). Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601-611.

REGAN L., RAY R. (2000). Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Bailliere's best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 14(5):839-54.

RENAUD C., TARDY-PONCET B., PRESLES E., *et al.*, (2010). Low prevalence of coagulation F2 and F5 polymorphisms in mothers and children in a large cohort of patients with neonatal arterial ischemic stroke. *Br J Haematol* 150:709-712.

ROSENDAAL F.R. (1999). Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353:1167-1173.

ROSENDAAL F.R., REITSMA P.H. (2009). Genetics of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 7(Supplement. 1): 301-304.

SARAVELLOS S.H., REGAN L. (2014). Unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 41(1):157-66

SHAPIRA E., RATZON R., SHOHAM-VARDI I., *et al.*, (2012). Primary vs. secondary recurrent pregnancy loss--epidemiological characteristics, etiology, and next pregnancy outcome. *J Perinat Med* 40(4):389-96.

SU M.T., LIN S.H., CHEN Y.C., *et al.*, (2013). Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost* 109(1):8-15.

TEKLENBURG G., SALKER M., HEIJNEN C., *et al.*, (2010). The molecular basis of recurrent pregnancy loss: impaired natural embryo selection. *Molecular human reproduction* 16:886-95.

TRAINA E., DRAHER S., MORON A.F., SUN S.Y., FRANCHIM C.S., MATTAR R. (2001). Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *Journal of Reproductive Immunology* 88:53-57.

VAN DEN BERG M.M., VISSENBERG R., GODDIJN M. (2014). Recurrent miscarriage clinics. *Obstetrics and gynecology clinics of North America* 41(1):145-55.

VAN DER PUT N.M., GABREELS F., STEVENS E.M., *et al.*, (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 62(5):1044–1051.

VATIN M., BOUVIER S., BELLAZI L., *et al.*, (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *The American journal of pathology* 184(2):362-8.

WARHURST D.C., AWAD EL KARIEM F.M., MILES M.A. (1991). Simplified preparation of malarial blood samples for polymerase chain reaction. *Lancet* 337(8736):303-4.

WU O., *et al.*, (2008). ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 6:62–69.

7. ARTIGOS ORIGINAIS

7.1. THE IMPACT OF HEREDITARY THROMBOPHILIAS IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE: A CASE-CONTROL STUDY

Submitted to Obstetrics and Gynecology International in 15/04/2019

THE IMPACT OF HEREDITARY THROMBOPHILIAS IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE: A CASE-CONTROL STUDY.

Jéssica Dick Guareschi^{a,b}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^a, Lucas Fraga^a, Tor Gunnar Hugo Onsten^c,
Sandra Leistner-Segal^{a,b}

^aServiço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre/RS – Brazil

^b Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPGSCA), UFRGS, Porto Alegre/RS, Brazil

^cServiço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre/RS – Brazil

Corresponding author: Sandra Leistner-Segal: ssegal@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Objective: To evaluate the prevalence of thrombophilic factors in the *FV* (g.1691G>A), *FII* (g.20210G>A) and *MTHFR* (g.677C>T and g.1298A>C) genes among the group of women with cases of 2 or more recurrent miscarriages (RM) and the control group, verifying existence of some association between the groups.

Methods: A case-control study was conducted to investigate *FV* (g.1691G>A), *FII* (g.20210G>A) and *MTHFR* (g.677C>T and g.1298A>C) variants in two groups. The case group contained 33 women with 2 or more RM cases, attended between 2014 and 2018 at the HCPA Prenatal Outpatient Clinic. This group was matched for age and sex with a control group of 99 healthy, non-RM, HCPA blood donors. Genotyping of these groups was performed by qPCR with commercially available TaqMan probes for each genetic variant.

Results: The mean age of women in both groups was 35 years. The prevalence of *FVL* and *FII* variants genes was exactly the same in the two groups, with no homozygous results for the variants. In the case group of women with RM the allele frequencies for the *MTHFR* variants were g.677C> T 76% (C), 24% (T); *MTHFR* g.1298A> C 80% (A), 20% (C). And in the control group the allele frequencies for *MTHFR* were g.677C> T 67% (C), 33% (T); *MTHFR* g.1298A> C 73% (A), 27% (C). However, although the *MTHFR* variants differ in prevalence (CI 95%), we did not find a significant association between the case and control groups.

Conclusion: Although screening for hereditary thrombophilia is one of the strategies to recognize possible reasons for RM, our data does not suggest a relationship between genetic variants and abortions. However, due to divergences in other studies worldwide, it would be necessary to extend this study involving a greater number of cases, to try to clarify such interpretations.

1. Introduction

Recurrent miscarriages (RM) are common pregnancy complications that affects 15-20% of couples [1] and around 5% of women at the reproductive age [2,3]. According to the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), recurrent abortion syndrome is defined by two or more gestational losses, up to the 20th week of gestation [4,5]. The risk of recurrence increases with the maternal age and number of successive losses [6,7].

Major factors of RM are structural and numerical chromosomal abnormalities, inflammatory and autoimmune disorders, and allelic variants of some pro-thrombophilic genes. Although the etiology of these miscarriages remains poorly understood [8-12], evidence supports that hereditary prothrombotic factors play a pathogenic role at the beginning and at the end of pregnancy, promoting a thrombogenic physiological state [3].

Throughout life, women are exposed to several factors that favor a state of hypercoagulability, such as hormonal contraceptive agents, gestation, puerperium, hormone replacement therapy and immobility of later life [13-15]. In the gestational state, there are studies showing that hereditary thrombophilia are significant risk factors for RM [16-18]. Changes in *Factor V* (Factor V Leiden) and *Factor II* (prothrombin) genes stimulate blood coagulation, while variants in the *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* gene results in elevation in the homocysteine levels; such variants, have been identified as risk factors for

thrombosis leading to inadequate fetomaternal circulation, and affecting the process of placentation in the developing embryo, which may further explain RM results [19-22].

Hyperhomocysteinemia is a risk factor for vascular damage, favoring thrombogenesis in placental vessels, arteries and veins, reducing the fetal blood supply and altering the normal gestation process. Abortions, in the early stages of gestation, can be explained by the damage that excess homocysteine can cause in the decidua and chorionic vessels, leading to inefficient implantation of the embryo [23]. Therefore, polymorphisms g.C677C> T and g.1298A> C in the *MTHFR* gene may affect the level and activity of this enzyme in blood [23,24].

In this study we proposed to identify some hereditary prothrombophilic genetic variants comparing their frequency in a group of women with RM and in a matched control group. We hypothesized that the presence of such variants could be a susceptibility to gestational losses.

2. Material and Methods

Sample: This case-control study was designed to investigate the association between idiopathic recurrent miscarriage and four thrombophilic variants: *FV* g.1691G>A, *FII* g.20210G>A, *MTHFR* g.677C>T and *MTHFR* g.1298A>C. The case group was comprised of 33 women with two or more consecutive miscarriages until the 20th week, who were attended at the Genetics Prenatal Outpatient Clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, from 2014 to 2018. The control group consisted of 99 healthy women from the HCPA blood bank with no history of gestational loss, matched by age to the case group.

DNA Extraction: Deoxyribonucleic acid (DNA) from the control group was extracted from capillary blood on filter paper (FP) about 2 days after collection. We adapted the protocol of Kato et al., 2014 [25] and used 3 FP punches of 3mm each that were washed 2x with ultrapure water and vortexed for about 1 minute between each wash. Following the washes the supernatant was discarded and 75µL of 10x TE Buffer was added, and incubated in a thermocycler (Applied Biosystems, Veriti), for 30 'at 95°C. These samples were stored at 4 ° C and used within 1 month. DNA from the case group was already extracted from venous blood and stored in the lab biorepository. The analysis of *FV* and *FII* variants had already been

performed previously and to access these results we consulted the medical records. Genotyping was performed in these samples for the *MTHFR* variants only.

Genotyping: Genotyping of all variants was performed using the real-time polymerase chain reaction (qPCR) with Taqman (Applied Biosystems-Life Technologies) assays as described in Table 1, composed of probes labeled with VIC and FAM fluorophores. The qPCR protocol using Step One equipment (Applied Biosystems - Life Technologies) consisted of an initial step of 60°C for 30" and 95°C for 10'; followed by 60 cycles of 95°C for 15" and 60°C for 1'; and a final step of 60° C for 30'. Reactions were performed according to the manufactures' protocol.

Gene	SNP	rs number	Life Technologies Assay ID
<i>Factor V</i>	g.1691G>A	rs6025	C__11975250_10
<i>Factor II</i>	g.20210G>A	rs1799963	C__8726802_20
<i>MTHFR</i>	g.677C>T	rs1801133	C__1202883_20
<i>MTHFR</i>	g.1298A>C	rs1801131	C__850486_20

Statistical analysis: The quantitative variable - age - was expressed as mean \pm standard deviation and the qualitative variables were expressed as frequency (percent). As the variable age was controlled and paired, the results were the same for the case and control group. To compare the g.20210G>A, g.1691G>A, g.677C>T and g.1298A>C genetic variants between the group of women with RM and the control group, chi-square test of independence was used. All analyzes were performed with the Statistical Package for Social Sciences version 25 software, with a level of statistical significance set at 5% (p-value <0.05), CI=95%.

Ethical Approval: Consent form (CF) was signed by the participants. We requested exemption from CF only for women who had already performed the diagnoses during the years 2014 to 2016, and these were being evaluated anonymously in the study. The protocol was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (registration number 17-0207) and was conducted according to guidelines of the Good Clinical Practice.

3. Results

The population of the present study consisted of 66 women, divided into two groups: case (n = 33) and control (n = 99). The mean age of both groups was 35 (sd \pm 5.7) years, considering that the groups were paired by age. All women in the case and control groups were evaluated for the four genetic variants described before (Table 2) and the population is in Hardy-Weinberg equilibrium.

Among cases and controls, none of them presented the *FV* g.1691G>A variant, neither in homozygosis or in heterozygosis. In the analysis of the *FII* g.20210G>A variant, only 3% of women heterozygous genotype in each group, as they aren't hedged changes, thus maintaining a same proportion in both groups (Table 2).

Table 2: Prevalence of *FV* (g.1691G>A), *FII* (g.20210G>A) and *MTHFR* (g.677C>T and g.1298A>C) in women with recurrent pregnancy loss and normal controls and comparison of the case group regarding the four genetic variants analyzed

Genotype/Allele	Case (n=33)	Control (n=99)	P-Value
<i>FV</i> – g.1691G>A			
WT Genotype (G/G)	33 (100%)	99 (100%)	-
HET Genotype (G/A)	0 (0%)	0 (0%)	-
MUT Genotype (A/A)	0 (0%)	0 (0%)	-
WT Allelic (G)	66 (100%)	198 (100%)	-
MUT Allelic (A)	0 (0%)	0 (0%)	-
<i>FII</i> – g.20210G>A			
WT Genotype (G/G)	32 (97%)	32 (97%)	-
HET Genotype (G/A)	1 (3%)	1 (3%)	-
MUT Genotype (A/A)	0 (0%)	0 (0%)	-
WT Allelic (G)	65 (98.5%)	195 (98.5%)	-
MUT Allelic (A)	1 (1.5%)	3 (1.5%)	-
<i>MTHFR</i> – g.677C>T			
WT Genotype (C/C)	19 (58%)	45 (45%)	0.228
HET Genotype (C/T)	12 (36%)	42 (43%)	0.540
MUT Genotype (T/T)	2 (6%)	12 (12%)	0,327
WT Allelic (C)	50 (76%)	132 (67%)	0.167
MUT Allelic (T)	16 (24%)	66 (33%)	0.167
<i>MTHFR</i> – g.1298A>C			
WT Genotype (A/A)	22 (67%)	51 (52%)	0.129
HET Genotype (A/C)	9 (27%)	43 (43%)	0.100
MUT Genotype (C/C)	2 (6%)	5 (5%)	0.823
WT Allelic (A)	53 (80%)	145 (73%)	0.251
MUT Allelic (C)	13 (20%)	53 (27%)	0.251
g.677C>T+g.1298A>C			
HET Genotype (C/T + A/C)	4 (12%)	22 (22%)	0.865
WT – wild-type; HET – heterozygous; MUT – genetic variant (mutation)			

Analysis of variants g.677C> T and g.1298A> C presented different frequencies between the case and control groups, as we can see in the allelic frequencies, whereas the wild - type allele was more frequent in the case group - g.677C>T (C) - case 76% vs. control 67% and g.1298A>C (A) - Case 80% vs. Control 73%. However, when we evaluated by the chi-

square statistical test, we verified that there is no significant association of any of the genetic variants (Table 2). When we analyzed in a composite manner, associating SNPs in heterozygosis of the *MTHFR* gene (g.677C>T + g.1298A>C), as can be seen in some studies [34,35] where it was possible to see an expressive increase in frequency C/T + A/C in groups with RM cases, we verified that it doesn't apply to our sample, since in this group the control group presents a higher composite frequency (22%) than the case group (12%) (Table 2).

4. Discussion

RM has a multifactorial etiology and in some cases it is not possible to identify its cause, being a large number of gestational losses considered idiopathic. It is known that gestation is a state of hypercoagulability and thus, factors that increase thrombotic risk, impairing fetal circulation or causing placental thrombotic vasculopathy may result in fetal loss [3,26]. Opposite from the *FV* and *FII* variants, the frequencies of the *MTHFR* variants presented differently among our control groups, although no association was significant ($P < 0.05$).

The genotypic frequencies of the prothrombotic factors *FV* g.1691G>A and *FII* g.20210G>A observed in the RM group (0% and 3%, respectively) were consistent with the frequencies reported in a review of several RM populations [27]. The frequencies of these two factors were exactly the same in both groups, not reporting statistically significant differences, which is in line with that presented by Quintero-Ramos et al., [28] in a Mexican population, composed of couples. In contrast, a recent study in Saudi Arabia confirmed the involvement of variants in these two specific genes (*FV* g.1691G>A and *FII* g.20210G>A) in increasing the incidence of RM [29]. In addition, these two genetic factors have also been associated with obstetric complications, including miscarriages, placental abruption, fetal growth restriction intrauterine or stillbirth [30-33].

High levels of homocysteine due to variants in *MTHFR* were reported as risk factors for the pathogenesis of spontaneous abortion, however, there was no consensus on the association between polymorphisms in *MTHFR* and RA [19]. Some studies report that there are only gestational risks when these changes appear in homozygousness and associated with altered levels of homocysteine [23,41,42]. In our study, for the g.677C> T variant the homozygous genotype (T / T) was found in 6% of the cases and 12% of the controls. For the g.1298A> C

polymorphism, the homozygous genotype (C/C) had a frequency of 6% in the case group and 5% in the control group.

Allelic frequencies of all genetic variants also resemble each other in both groups, and when they differ, the variant allele is more present in the control group, that is, in the sample that represents the healthy population, and therefore can't be related to the cases of RM in this study.

Sample size is not sufficient, being a limiting factor of this study, considering that "n" and ethnicity are important because the rate of these variants may differ across populations. In Brazil, *FV* g.1691G>A and *FII* g.20210G>A variants are present in about 2% of the population with European ancestry [36]. The frequency of the *MTHFR* g.677C>T mutation has high geographical and ethnic variability worldwide. The prevalence of the homozygous genotype g.677C>T (T/T) in Brazil ranges from 2.7 to 17.5% [37, 38]. Thus, when comparing the frequencies found in our study, they are in line with what has already been described in the population, and it is not observed more frequently in the group of women with RM.

Another factor to be considered in our case group is maternal age, with an average age of 35 years, as female fertility begins to drop by the age of 35 and has a significant decline after the age of 35. Although age alone cannot constitute a risk factor, pregnant women aged 35 or older are considered late or elderly, and are more likely to develop complications during pregnancy, including miscarriages [39, 40].

5. Conclusion

Despite several studies worldwide have approached the relationship between RM and genetic thrombophilic factors, the results are, especially within caucasian populations, inconclusive and contradictory. This is probably due to the low number of individuals, with studies frequently investigating less than 100 cases. Thus, RM remains a challenge for gynecologists and so far no treatment has been described for this problem. Screening for thrombophilic variants is one of the few ways to recognize the reasons for RM, nevertheless our data does not suggest a relationship between the genetic variants analyzed and abortions. Other studies involving a greater number of cases could be necessary to clarify such discrepancies, mainly seeking more responses on the *MTHFR* polymorphisms, since these are

found in 30-50% of the population and apparently aren't associated with the increased risk of AR.

Abbreviations

CF	Consent Form
FII	Factor II
FV	Factor V
FVL	Factor V Leiden
MTHFR	Methylene Tetrahydrofolate Reductase
RM	Recurrent Miscarriage

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors have no potential conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

To the Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), to the Serviço de Hemoterapia do HCPA and to the Programa de Pós-Graduação em Medicina: Saúde da Criança e do Adolescente of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. The study was supported by Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE-HCPA, Brazil, project number 2017-0207). Sandra Leistner-Segal is a researcher from CNPq (Brazil).

References

- [1] ASRM, "Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion," *Fertility and Sterility*, vol. 98, no 5, pp. 1103-1111, 2012.

- [2] A.W. Horne AW and I. Alexander, "Recurrent miscarriage," *The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care. Royal Colege of Obstetrician & Gynaecologists*, vol. 21, no 2, pp. 103-107, 2005.
- [3] S.A. Bennett, C.N. Bagot, and R. Arya, "Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link," *British Journal of Haematology*, vol. 157, no 5, pp. 529-542, 2012.
- [4] S.H. Saravelos, L. Regan L, "Unexplained recurrent pregnancy loss" *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, vol. 41, no 1, pp. 157-166, 2014.
- [5] E. Shapira, R. Ratzon, I. Shoham-Vardi, R. Serjienki, M. Mazor, A. Bashiri, "Primary vs. secondary recurrent pregnancy loss--epidemiological characteristics, etiology, and next pregnancy outcome," *Journal of Perinatal Medicine*, vol. 40, no. 4, pp. 389-396, 2012.
- [6] S. Brigham, C. Conlon, and R.G. Farquharson, "A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage," *Human Reproduction*, vol. 14, pp. 2868-2871, 1999.
- [7] A.M.N. Andersen, J. Wohlfahrt, P. Christens, and M. Melbye, "Maternal age and fetal loss:populationsbased register linkge study," *British Medical Journal*, vol. 320, pp. 1708-1712, 2000.
- [8] E.C. Larsen, O.B. Christiansen, A.M. Kolte, N. Macklon, "New insights into mechanisms behind miscarriage," *BioMed Central Medicine*, vol. 11, pp. 154, 2013.
- [9] M.T.M. Franssen, J.C. Korevaar, F. van der Veen, N.J. Leschot, P.M.M. Bossuyt, and M. Goddijn, "Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: na index-control study," *British Medical Journal*, vol. 332, no 7548, pp. 1012, 2006.
- [10] O.B.Christiansen, R. Steffensen, H.S. Nielsen, and K. Varming, "Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications," *Gynecologic and Obstetric Investigation*, vol. 66, no 4, pp. 257-267, 2008.
- [11] C. Rubio, "Update on preimplantation genetic diagnosis for chromosomal Abnormalities," *Expert Review of Molecular Diagnostics*, vol. 10, no 8, pp. 973-976, 2010.
- [12] S. Brow, "Miscarriage and its associations," *Seminars in Reproductive Medicine*, vol. 26, no 5, pp.391-400, 2008.
- [13] ACOG Practice Bulletin N° 138, "Inherited thrombophilias in pregnancy," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 122, pp. 706-717, 2013.

- [14] I. Blickstein, "Thrombophilia and women's health: an overview," *Obstetrics & Gynecology Clinics of North America*, vol. 33, pp. 347-356, 2006.
- [15] M.J. Kupferminc, A. Many, and J.B. Lessing, "Thrombophilia polymorphisms and intrauterin growth restriction," *New England Journal of Medicine*, vol. 347, pp. 1530-1531, 2002.
- [16] M. Kupferminc, A. Eldor, N. Steinman, A. Many, A. Bar-Am, A. Jaffa, et al., "Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy", *New England Journal of Medicine*, vol. 340, pp. 9-13.
- [17] M.J. Kupferminc, G. Fait, A. Many, D. Gordon, A. Eldor, and J. Lessing, "Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 96, pp. 45-49, 2000.
- [18] V.H.W. Dissanayake, N.D. Sirisena, L.Y. Weerasekera, G. Gammulla, H.R. Seneviratne, and R.W. Jayasekara, "Candidate gene study of genetic thrombophilic polymorphisms in pre-eclampsia and recurrent pregnancy loss in Sinhalese women," *Journal Obstetrics & Gynecology Research*, vol. 38, pp. 1168-1176, 2012.
- [19] Y. Cao, J. Xu, Z. Zhang, X. Huang, et al., "Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis," *Gene*, vol. 514, pp. 105-111, 2013.
- [20] Y. Cao, Z. Zhang, Y. Zheng, W. Yuan, et al., "The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes," *Genes & Nutrition*, vol. 9, pp. 402, 2014.
- [21] M. Creus, R. Deulofeu, J. Peñarrubia, F. Carmona, et al., "Plasma homocysteine and vitamin B12 serum levels, red blood cells folate concentrations, C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and risk of recurrent miscarriage: a case-control study in Spain," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 51, pp. 693-699, 2013.
- [22] S. Madjunkova, M. Volk, B. Peterlin, D. Plaseska-Karanfilska, "Detection of thrombophilic mutations related to spontaneous acortions by a multiplex SNaPshot method," *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, vol. 16, pp. 259-264, 2012.
- [23] M. De La Calle, R. Usandizaga, M. Sancha, F. Magdaleno, et al., "Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology," *European Journal of Obstetrics & Gynecology Reproductive Biology*, vol. 107, no 2, pp. 125-234, 2003.

- [24] P. Yanez, C.J. Vasquez, L. Rodas, et al., "Erythrocyte folate content and serum folic acid and homocysteine levels in preeclamptic primigravidae teenagers living at high altitude," *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 288, no 5, pp. 1011-1015, 2013.
- [25] N. Kato, N. Sa'Adah, M. Ar Rochmah, et al., "SMA screening system using dried blood spots on filter paper: application of COP-PCR to the SMN1 deletion test," *Kobe Journal of Medical Sciences*, vol. 60, no 4, pp. 78-85, 2014.
- [26] M.T. Su, S.H. Lin, Y.C. Chen, and P.L. Kuo, "Genetic association studies of ACE and PAI-1 genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 109, pp.8-15, 2013.
- [27] L.A. Bradley, G.E. Palomaki, J. Bienstock, E. Varga, 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," *Genetics in Medicine*, vol. 14, pp. 39-50, 2012.
- [28] A. Quintero-Ramos, L.L Valdez-Vélázquez, G. Hernández, L.M. Baltazar, et al., "Assessment of five thrombophilic genetic polymorphisms among couples with habitual abortion," *Gaceta Mededica do Mexico*, vol. 142, pp. 95-98, 2006.
- [29] G. Gawish, "The Prevalence of Inherited Thrombophilic Polymorphisms in Saudi Females with Recurrent Pregnancy Loss Confirmed using Different Screening Protocols of PCR," *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, vol. 9, no 156, pp. 1747, 2015.
- [30] M. De Santis, A.F. Cavaliere, G. Straface, E. Di Gianantonio, and A. Caruso, "Inherited and acquired thrombophilia: pregnancy outcome and treatment," *Reproductive Toxicology*, vol. 22, no 2, pp. 227-233, 2006.
- [31] L. Robertson, O. Wu, P. Langhorne, S. Twaddle, P. Clark, G.D. Lowe, I.D. Walker, M. Greaves, I. Brenkel, L. Regan, et al., "Thrombophilia in pregnancy: a systematic review," *British Journal of Haematology*, vol. 132, no 2, pp. 171-196, 2006.
- [32] R. Vormittag, and I. Pabinger, "Thrombophilia and pregnancy complications," *Hamostaseologie*, vol. 26, no 1, pp. 59-62, 2006.
- [33] G. Kovalevsky, C.R. Gracia, J.A.Berlin, M.D. Sammel, and K.T. Barnhart, "Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis," *Archive of Internal Medicine*, vol. 162, no 5, pp. 558-563, 2004.

- [34] H. Zetterberg, B. Regland, M. Palmér, A. Ricksten, et al., "Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos," *European Journal of Human Genetics*, vol. 10, pp. 113-118, 2002.
- [35] N. Mtiraoui, W. Zammiti, L. Ghazouani, N.J. Braham, et al., "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses," *Reproduction*, vol. 131, pp. 395-401, 2006.
- [36] F.R. Rosendaal, C.J. Doggen, A. Zivelin, V.R. Arruda, et al., "Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 79, pp. 706-708, 1998.
- [37] L. Sharp, and J. Little, "Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review," *American Journal of Epidemiology*, vol. 159, pp. 423-443, 2004.
- [38] H. Ferreira-Fernandes, P.N. Costa, H.F. Fernandes, A.P. Araújo-Neto, et al., "Prevalence of variants that confer risk for venous thromboembolism in an elderly population of northeastern Brazil," *Genetics and Molecular Research*, vol. 12, pp. 3698-3707, 2013.
- [39] G.H.N. Santos, M.G. Martins, M.S. Sousa, and S.J.C. Batalha, "Impacto da idade materna sobre os resultados perinatais e via de parto," *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, vol. 31, no 7, pp. 326-334, 2009.
- [40] R. Lampinen, K. Vehviläinen-Julkunen, and P. Kankkunen, "A review of pregnancy in women over 35 years of age," *The Open Nursing Journal*, vol. 3, pp. 33-38, 2009.
- [41] E.M. Guerra-Shinohara, A.A. Paiva, P.H.C. Rondó, K. Yamasaki, et al., "Relationship between total homocysteine and folate levels in pregnant women and their newborn babies according to maternal serum levels of vitamin B12," *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, vol 109, no 7, pp. 784-791, 2004.
- [42] P.R. Barbosa, S.P. Stabler, R.D.C. Hirata, M.H. Hirata. "Determinants of MMA levels in Brazilian mother and newborns". *Haematologica Reports*, vol 1, no 3, pp. 45, 2005.

7.2. PREVALENCE OF HEREDITARY TROMBOFILIAS IN BLOOD DONORS OF THE HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Submitted to Reports in Public Health in 15.04.2019

PREVALENCE OF HEREDITARY THROMBOPHILIAS IN BLOOD DONORS OF A REGIONAL HOSPITAL AT THE SOUTH OF BRAZIL

Jéssica Dick-Guareschi^{1,2}, Maria Teresa Vieira Sanseverino^{1,3}, Francyne Kubaski^{1,4}, Tor Gunnar Hugo Onsten⁵, Sandra Leistner-Segal^{1,2}

¹ Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre/RS – Brasil

² Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (PPGSCA), UFRGS, Porto Alegre/RS, Brasil

³ Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre

⁴ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

⁵ Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre/RS – Brasil

Corresponding author: Jéssica Dick-Guareschi: jessicadick.ufrgs@gmail.com

Contribution:

Leistner-Segal S., Dick-Guareschi J. and Kubaski F. conceived the study. Dick-Guareschi J. performed the experiments, data analysis and writing of the manuscript. Leistner-Segal S., Sanseverino M. T. V., Kubaski F. and Onsten T. G. H contributed to the interpretation of the data and critical review of the content. All authors reviewed the final version of the manuscript and declare themselves responsible for the work.

ABSTRACT

Introduction: Thromboembolic events occur due to imbalance of homeostasis and, some factors associated with this condition can be inherited. In order to evaluate the frequency of common hereditary risk factors for thrombophilia associated with venous thrombosis (g.1691G>A and g.20210G>A) and hyperhomocysteinemia (g.677C>T, g.1298A>C) voluntary healthy blood

donors of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre were tested. **Methods:** We examined 325 blood samples from blood donors collected from October 2017 to July 2018. Blood was collected on filter paper and the DNA was extracted for single nucleotide polymorphism analysis using Qualitative Real Time polymerase chain reaction. **Results:** The calculated frequencies of each genetic variant in homozygosity were 4% for the *FV* (g.1691G>A); 4% for the *FII* (g.20210G>A); 14% and 6% for the *MTHFR* (g.677C>T, g.1298A>C, respectively). **Discussion and Conclusions:** Taken together, these results describe the frequencies of genetic variants associated with venous thrombosis and hyperhomocysteinemia and are important to enhance our current knowledge about the genetic profiles of Brazilian blood donors.

KEYWORDS: prothrombin; factor V Leiden; methylenetetrahydrofolate reductase; blood donors; thrombophilia; hereditary thrombophilia; g.677C>T; g.1298A>C; g.20210G>A; g.1691G>A.

INTRODUCTION

Thromboembolic events occur as a result of the disruption of the balance between fibrinolysis and thrombosis. Factors associated with coagulation abnormalities can be acquired (obesity, smoking, immobility) or inherited (variations in the: Factor V Leiden, Prothrombin, Methylenetetrahydrofolate Reductase). Thus, in the last five decades, the molecular bases of coagulation and anticoagulation pathways have been well studied and some hereditary risk factors were considered responsible for venous thromboembolism (VTE) ^{1,2}. *Factor V (FV)* (g.1691G>A), *factor II (FII)* (g.20210G>A) and *methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)* (g.677C>T, g.1298A>C) variants are the most common molecular biomarkers used to evaluate a possible tendency to venous thromboembolism ¹.

Variant in the *factor V (FV)* (rs 6025) ^{3,4}, also known as Factor V Leiden (FVL), is the leading cause of genetic thrombophilia ⁵ and is observed in 5% of the European population worldwide ⁶. The relative risk for venous thrombosis is 3–10 times higher for heterozygotes and 50–100 times higher for homozygotes when compared to wild type subjects ^{5,7}. It is characterized by poor anticoagulant response to activated protein C (APC) due to the substitution of glutamine by arginine at codon 506, which leads to the loss of the cleavage site of the protein raising the risk of VTE by increasing the production of thrombin ⁸. The second

most frequent genetic prothrombotic factor in humans is a variant in the prothrombin or coagulation factor II (rs1799963) ^{3,4,9}. Its prevalence in the European population is approximately 1 to 4%, and the frequency of this variant among patients with venous thrombosis is 5 to 7% ⁹. In addition, previous studies have indicated that the recurrence of venous thrombosis is higher for heterozygous individuals with mutations in *FV* and *FII* ¹⁰.

MTHFR is a key enzyme in folate metabolism that catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methylenetetrahydrofolate, being the predominant form of circulatory folate responsible for remethylation of homocysteine (Hcy) to methionine ¹¹. Variants (rs1801133 and rs1801131) in the gene encoding *MTHFR* cause enzyme thermolability and decrease its activity by up to 40% ¹² which leads to low folate levels and increased plasma Hcy (hyperhomocysteinemia) ¹³. An increased level of homocysteine in plasma (hyperhomocysteinemia) also leads to prothrombotic events and is related to the presence of g.677C>T (rs1801133) and g.1298A>C (rs1801131) variants ¹⁴⁻¹⁶. Previous studies have reported an association between hemorrhagic (677TT and 677TT/1298AA genotypes) and ischemic stroke (1298CC and 677TT/1298CC genotypes) in cases of homozygosity or heterozygosity ¹⁷.

In Brazil, genotypic frequency of the variants in the *FV* (g.1691G>A), *FII* (g.20210G>A) and *MTHFR* (g.677C>T) described in the general population ranges from 0,7–4,8%, 0,7–3,6% and 35%–44%, respectively ¹⁸⁻²⁵. Robust evidence also exists on the association between non-O blood groups (e.g.: A, B and AB) and a higher risk of VTE ^{26,27}, so that ABO blood groups are frequently included in the panel of first-level laboratory tests for thrombophilia screening.

The objective of this study was to evaluate the prevalence of these variants in a healthy Brazilian population, represented by voluntary blood donors of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

METHODS

Sample

A total of 325 blood samples were collected from October 2017 to July 2018, from blood donors of the Blood Bank of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The participants were self-classified as European-descendants and Afro-descendants. The study was approved by the

Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (IBR approval: 17-0207) and all participants provided written informed consent.

DNA Extraction

The protocol for DNA extraction was adapted from the protocol of Kato et al., 2014 [27]. DNA was isolated from capillary blood collected on filter paper (FP), and 3 disks of 3mm were used. Samples were washed twice with ultrapure distilled water and vortexed for about 1 minute each wash. The supernatant was discarded, 75µL of 10x TE Buffer was added, followed by incubation for 30 sec at 95°C in the thermocycler (Applied Biosystems, Veriti). The amount and quality of the DNA were determined by spectrophotometry using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). All samples were diluted to a final concentration of 5ng/µl, stored in a refrigerator at 4°C and used within 1 month.

Genotyping

Genotyping was performed using TaqMan assays commercially available from Life Technologies. The rs numbers - accession number used by researchers and databases to refer to specific SNPs -, variant, gene and assay numbers for the selected SNPs are described in Table 1.

Table 1

SNPs identification and Assay ID for Real Time PCR testing.			
Gene	SNP	rs number	Life Technologies Assay ID
<i>Factor V</i>	g.1691G>A	rs6025	C__11975250_10
<i>Factor II</i>	g.20210G>A	rs1799963	C__8726802_20
<i>MTHFR</i>	g.677C>T	rs1801133	C__1202883_20
<i>MTHFR</i>	g.1298A>C	rs1801131	C__850486_20

Assays included primers and probes labeled with VIC and FAM dyes, and each probe designed for a particular type of allele. Genotyping was performed according to the

manufacturer's instructions. TaqMan reactions were performed with Step One (Applied Biosystems, Life Technologies) following the PCR cycle: Pre-Read Stage at 60°C for 30", Hold Stage at 95°C for 10', PCR Stage consisting of two steps of 60 cycles - step I at 95°C for 15" / step II at 60°C for 01' – and finally Post-Reading Stage at 60°C for 30". The genotypic and allelic frequencies of each single nucleotide polymorphism (SNP) tested in the blood donor population were calculated using the IBM® SPSS v.25 analysis software

RESULTS

There were 131 males (40%) and 194 females (60%). The mean age was 38.5 years of age (ranging from: 18 age to 76 years of age, standard deviation \pm 11.4). 97% of donors were self-classified as European-descendants (315) and 3% as Afro-descendants (10). Blood type O was the most common with 40% (130), followed by 29% type A (95), 9% type AB (28) and 4% type B (13). 18% (59) did not pass the screening and thus did not have blood typing performed. The genotypic and allelic frequencies are shown in Table 2, considering that the population is in Hardy-Weinberg equilibrium for the four variants evaluated. The most frequent variants found among the SNPs studied were g.677C>T and g.1298A>C in the *MTHFR* gene. Heterozygous genotypes were present in 42% (137/325) and 39% (127/325) of blood donor samples tested for g.677C>T and g.1298A>C, respectively, while homozygous mutant genotypes were present in 13.5% (44/325) and 5.5% (18/325) of the samples, respectively. However, less frequent variants were observed in the *FV* (g.1691G>A) and in the *FII* (g.20210G>A), and these variants were present only in heterozygous state (4% for both variants - 12/325 for g.1691G>A and 14/325 for g.20210G>A).

Table 2

Genotypic and allelic frequencies observed in the population studied using Real Time PCR method				
	<i>FV</i> g.1691G>A	<i>FII</i> g.20210G>A	<i>MTHFR</i> g.677C>T	<i>MTHFR</i> g.1298A>C
<u>Genotypic Frequencies</u>				
WT	96% (G/G)	96% (G/G)	44% (C/C)	55% (A/A)
HET	4% (G/A)	4% (G/A)	42% (C/T)	39% (A/C)
MUT	0% (A/A)	0% (A/A)	14% (T/T)	6% (C/C)
<u>Allelic Frequencies</u>				
Allele 1	98.2% (G)	97.8% (G)	65.5% (C)	75% (A)
Allele 2	1.8% (G)	2.2% (A)	35.5% (T)	25% (C)

Genotype = WT – Wild Type; HET – Heterozygous; MUT – Homozygous for the variant

Table 3

Distribution of the genotype O and non-O blood groups (A, B and AB) for the studied population.			
	WT	HET	MUT
<i>FV</i> g.1691G>A			
A	91 (35%)	4 (50%)	0 (0%)
B	13 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
AB	28 (11%)	0 (0%)	0 (0%)
O	126 (49%)	4 (50%)	0 (0%)
	Type Non-O 51%	Type Non-O 50%	Type Non-O 0%
	Type O 49%	Type O 50%	Type O 0%
<i>FII</i> g.20210G>A			
A	90 (35%)	5 (55.5%)	0 (0%)
B	13 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
AB	28 (11%)	0 (0%)	0 (0%)
O	126 (49%)	4 (44.5%)	0 (0%)
	Type Non-O 51%	Type Non-O 55.5%	Type Non-O 0%
	Type O 49%	Type O 44.5%	Type O 0%
<i>MTHFR</i> g.677C>T			
A	35 (29%)	48 (44%)	12 (30%)
B	6 (5%)	6 (5%)	1 (3%)
AB	14 (12%)	11 (10%)	3 (7%)
O	65 (54%)	45 (41%)	25 (60%)
	Type Non-O 46%	Type Non-O 59%	Type Non-O 39%
	Type O 54%	Type O 41%	Type O 60%
<i>MTHFR</i> g.1298A>C			
A	59 (40%)	31 (30%)	5 (31%)
B	4 (3%)	8 (8%)	1 (6%)
AB	16 (11%)	10 (10%)	2 (13%)
O	69 (46%)	53 (52%)	8 (50%)
	Type Non-O 54%	Type Non-O 48%	Type Non-O 50%
	Type O 46%	Type O 52%	Type O 50%

Genotype = WT – Wild Type; HET – Heterozygous; MUT – Homozygous for the variant

Previous studies have shown evidence that non-O blood groups (A, B and AB) could be associated to higher risk of VTE ²⁶; thus, we analyzed 266 blood donors from the study

population who had their blood typing available. We performed the distribution of genotyping between two groups: blood type O and non-O blood type (including types A, B and AB), as presented in Table 3.

Analyzing the distribution in blood groups, we observed that the proportions between O and non-O blood groups remained very similar, not statistically significant, except for the heterozygote group of the g.677C> T variant ($p = 0.040$ for IC = 95% and $p < 0.05$). However, our sample does not have sufficient power to ascertain whether blood typing is related to the heterozygosity of the g.677C> T variant.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Available literature on the prevalence of carriers for g.1691G> A and g.20210G>A variants are strongly associated with geographic location. Prothrombotic mutations are extremely rare among non-Europeans (African descendants, Chinese, Japanese, Native Americans of the North and South, or Inuit of Greenland). In general, Brazilian prevalence of heterozygotes for *FII* variant g.20210G>A is 0.8% on average (0.7-1.6%)³⁶, and heterozygosity for the Leiden factor V variant occurs in 3-8% of the USA and European population in general³⁷. Niewiadonski and cols. observed a heterozygous frequency of 1.2% for *FV* variant and 0.5% for *FII* variant in blood donors from São Paulo³⁸.

One of the striking characteristics of the Southern region of Brazil concerns its colonization, which began in the mid-seventeenth century by the Portuguese. The south of Brazil had majority of immigrants from the Azores, Spain, Germany, Italy, Poland, the Netherlands, among other European countries. Nonetheless, this contributed to the formation of the Brazilian society of the 19th century with majority of the European ethnicity³⁹. This region received a small number of African slaves.

A study conducted at Somalia showed that these common genetic risk factors most known for VTE are absent or less frequent in this group, when compared to other ethnic populations⁴⁰. Our population had very few individuals with afro-descendant origin (3%) which could explain the higher prevalence of these variants. However, this study was limited by its sample size.

In the present study, we verified that homozygous genotypes for the g.1691G> A and g.20210G> A alterations are completely absent, which is in agreement with the great majority

of studies, however the heterozygous genotypes of both variants were higher than the previous reports in healthy Brazilian individuals¹⁸⁻²⁰, much closer to the prevalence of these variants in studies of the healthy European population, such as Italy (2.3 - 5.7%) and Spain (3.1 - 6.5%)^{28-30,36}. Therefore, we can consider that the origin of colonization still maintains genetic traits in the region.

Although we found that some subjects carry the mutant allele, they may not express the disorder due the reduced (or incomplete) penetrance showed by some autosomal dominant, such as *FV* g.1691G>A. Genotyping studies of apparently healthy individuals may be an approach to understand the penetrance of pathological variants^{34,35}.

The *MTHFR* g.677C>T variant has a relatively high frequency worldwide, and the geographical pattern of allelic frequency supports the hypothesis that it is a risk factor for vascular diseases and neural tube defects. A possible explanation for this high frequency could be a mutant heterozygous or homozygous advantage of the previously unknown type. Prevalences found for *MTHFR* in this study were consistent with the results obtained from previous studies in Brazilian children and other control groups^{18-20,22,31}. A comparison of the results obtained in the present study with those obtained in a recent prevalence study in blood donors in the central-southern region of Italy revealed that the cohort used in this study presented a higher number of healthy individuals heterozygotes for g.677C>T and g.1298A>C³². None of the subjects tested had a 677TT / 1298CC associated genotype.

In conclusion, the screening of a larger sample size is necessary for a more accurate determination of the frequency of alleles in the Souther Brazilian population, since a difference in the frequency of SNPs of our sample was observed when compared with groups of other Brazilian regions, but very similar to the European population.

CONFLICTS OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- [1] Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. Thrombotic risk factors: basic pathophysiology. *Crit Care Med.* 2010; 38 (Suppl 2):S3-S9.

- [2] Tug E, Aydin H, Kaplan E, Doggruer D. Frequency of genetic mutations associated with thromboembolism in the Western Black Sea Region. *Intern Med.* 2011;50:17-21. Bargahi N, Farajzadeh M, Poursadegh-Zonouzi A, Farajzadeh
- [3] Bezemer ID, Bare LA, Doggen CJ, Arellano AR, Tong C, Rowland CM, et al., Gene variants associated with deep vein thrombosis. *JAMA.* 2008; 299(11):1306–14
- [4] Delluc A, Gourhant L, Lacut K, Mercier B, Audrezet MP, Nowak E, et al., Association of common genetic variations and idiopathic venous thromboembolism. Results from EDITH, a hospital-based case-control study. *Thromb Haemost.* 2010; 103(6):1161–9.
- [5] Bauduer F, Lacombe D. Factor V Leiden, prothrombin 20210A, methylenetetrahydrofolate reductase 677T, and population genetics. *Mol Genet Metabol.* 2005; 86(1–2):91–9.
- [6] Endler G, Mannhalter C. Polymorphisms in coagulation factor genes and their impact on arterial and venous thrombosis. *Clin Chim Acta.* 2003; 330(1–2):31–55.
- [7] Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994; 369(6475):64–7.
- [8] Bargahi N, Farajzadeh M, Poursadegh-Zonouzi A, Farajzadeh D. Prevalence of thrombophilic gene polymorphisms in an azari population of Iran. *Hematol Rep.* 2014; 6:5321.
- [9] Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 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(10):3698–703.
- [10] De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Chiusolo P, Casorelli I, et al., The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. *The N Eng J Med.* 1999; 341(11):801–6.
- [11] Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated disorders. *Gene.* 2014; 533:11-20
- [12] Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998; 64:169-72.

- [13] Nakai K, Itoh C, Nakai K, Habano W, Gurwitz D. Correlation between C677T MTHFR gene polymorphism, plasma homocysteine levels and the incidence of CAD. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2001; 1:353-61.
- [14] Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131(6):872–84.
- [15] Vares M, Saetre P, Deng H, Cai G, Liu X, Hansen T, et al., Association between methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and age of onset in schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2010; 153B(2):610–8.
- [16] Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, et al., Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*. 1996; 93(1):7–9.
- [17] Sazci A, Ergul E, Tuncer N, Akpınar G, Kara I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of MTHFR polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Res Bull*. 2006; 71(1–3):45–50.
- [18] Dalmaz CA, Santos KG, Botton MR, Tedoldi CL, Roisenberg I. Relationship between polymorphisms in thrombophilic genes and preeclampsia in a Brazilian population. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 37(2):107–10.
- [19] Paula Sabino A, Guimaraes DA, Ribeiro DD, Paiva SG, Sant'Ana Dusse LM, das Gracias Carvalho M, et al., Increased Factor V Leiden frequency is associated with venous thrombotic events amongb Thrombosis and Hereditary Hemochromatosis Mutations young Brazilian patients. *J Throm Thrombolysis*. 2007; 24(3):261–6.
- [20] Dusse LM, Carvalho M, Braganca WF, Paiva SG, Godoi LC, Guimaraes DA, et al., Inherited thrombophilias and pre-eclampsia in Brazilian women. *Eur J Obstet Gyn R B*. 2007; 134(1):20–3.
- [21] Lima MB, de Oliveira-Filho AB, Campos JF, Melo FC, Neves WB, Melo RA, et al., Increased risk of venous thrombosis by AB alleles of the ABO blood group and Factor V Leiden in a Brazilian population. *Genet Mol Biol*. 2009; 32(2):264–7.
- [22] Stur E, Silveira AN, Selvatici LS, Alves LN, de Vargas Wolfgramm E, Tovar TT, et al., Polymorphism analysis of MTHFR, factor II, and factor V genes in the Pomeranian population of Espirito Santo, Brazil. *Genet Test Mol Bioma*. 2012; 16(3):219–22.

- [23] Filho IL, Leite AC, Moura PG, Ribeiro GS, Cavalcante AC, Azevedo FC, et al., Genetic polymorphisms and cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia from Rio de Janeiro, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011; 69(3):431–5.
- [24] Ramos CPS, Campos JF, Neves WB, Santos ME, Araujo FA, Melo RAM. Frequency of factor V Leiden in individuals under thrombophilia investigation, Recife, Pernambuco, Brazil. *Rev bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(2):131–4.
- [25] Ramos CPS, Campos JF, Neves WB, Santos ME, Araujo FA, Melo RAM. Mutant prothrombin in individuals under thrombophilia investigation. *J Bras Patol Med Lab.* 2008; 44(2):79–82.
- [26] Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO(H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:62–69.
- [27] Kato N, Sa'Adah N, Ar Rochmah M, Harahap NI, Nurputra DK, et al., SMA screening system using dried bloodspots on filter paper: application of COP-PCR to the SMN1 deletion test. *Kobe J Med Sci.* 2014; 60(4):78-85.
- [28] Franchini M, Mannucci PM. ABO blood group and thrombotic vascular disease. *Thromb Haemost.* 2014; 112:1103–1109.
- [29] Kvasnicka J, Hajkova J, Bobcikova P, Kvasnicka T, Duskova D, Poletinova S, et al., Prevalence of thrombophilic mutations of FV Leiden, prothrombin G20210A and PAI-1 4G/5G and their combinations in a group of 1450 healthy middle-aged individuals in the Prague and Central Bohemian regions (results of FRET real-time PCR assay). *Cas Lek Cesk.* 2012; 151(2):76–82.
- [30] Lee DH, Henderson PA, Blajchman MA. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. *CMAJ.* 1996; 155(3):285–9.
- [31] Sottilotta G, Mammi C, Furlo G, Oriana V, Latella C, Trapani Lombardo V. High incidence of factor V Leiden and prothrombin G20210A in healthy southern Italians. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009; 15(3):356–9.
- [32] Alessio AC, Annichino-Bizzacchi JM, Bydlowski SP, Eberlin MN, Vellasco AP, Hoehr NF. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase reductase genes and homocysteine levels in Brazilian children. *Am J Med Genet Part A.* 2004; 128A(3):256–60.
- [33] Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, Di Castelnuovo A, Mastroiacovo P, Iacoviello L. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine

- and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochem Func.* 2014; 32(1):1–4.
- [34] Beutler E, Felitti VJ, Koziol JA, Ho NJ, Gelbart T. Penetrance of 845G→A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. *Lancet.* 2002; 359(9302):211–8.
- [35] Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Human Genet.* 2013; 132(10):1077–130.
- [36] Dziadosz M, Baxi LV. Global prevalence of prothrombin gene mutation G20210A and implications in women's health: a systematic review. *Blood Coagul Fibrinol.* 2016; 27(5):481-9.
- [37] Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med.* 2011; 13(1):1-16
- [38] Niewiadonski VDT, Bianchi JVS, Neto CA, Gaburo N, Sabino EC. Evaluation of a High Throughput Method for the Detection of Mutations Associated with Thrombosis and Hereditary Hemochromatosis in Brazilian Blood Donors. *Plos One.* 2015; 10(5):e0125460.
- [39] Arruda JJA, Piletti N. *Toda a História.* 6º Ed. São Paulo: Editora Ática; 1996.
- [40] Abdi AA, Osman A. Prevalence of common hereditary risk factors for thrombophilia in Somalia and identification of a novel Gln544Arg mutation in coagulation factor V. *J Thromb Thrombolysis.* 2017; 44:536-43.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O AR normalmente constitui uma condição difícil tanto para o casal como para o médico envolvido e, é frustrante pensar que em cerca de metade dos casos não haverá identificação da causa subjacente. Afim de validar a investigação causal do AR, a associação de informações provenientes de diversas áreas, dentre elas a genética, a citologia e a genecologia/obstetrícia em si, se faz necessária. Essa associação também parece fundamental para dar seguimento a pesquisas mais robustas buscando uma compreensão mais global desta complicação, que se apresenta de forma multifatorial.

Os objetivos deste estudo foram atendidos plenamente dentro da produção de dois artigos, entretanto, com os passar das análises percebemos que outras informações poderiam ter sido integradas, principalmente em relação às análises citogenéticas e a inclusão do questionamento aos doadores de sangue sobre o fato de já terem tido algum caso de tromboembolismo. Entretanto, não se tornou mais viável alterar durante o decorrer do estudo devido a questões éticas já aprovadas ou por não termos mais acesso aos primeiros doadores. Também nos deparamos com informações de prontuários insuficientes ou incompletas, como aconteceu com doadores que só passaram pela triagem e não puderam seguir até a efetiva doação, impedindo assim o conhecimento de tipagem sanguínea de toda a amostra.

Considerando perspectivas futuras, é válido pensar em um número amostral maior, permitindo assim que os dados possam ser extrapolados para populações de forma mais geral. Além disso, seria importante considerar uma análise de prontuário de forma mais geral para respostas mais completas, buscando inclusive pelas respostas ao questionário que é feito às mulheres com AR antes de terem seu sangue encaminhado para análise das trombofilias hereditárias, acrescentando maiores indícios sobre a fisiopatologia dos abortamentos.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA DOADORES DO BANCO DE SANGUE

Título do Projeto: Análise da prevalência de trombofilias hereditárias em doadores de sangue do HCPA e em mulheres com abortamentos recorrentes

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é analisar a ocorrência de alterações genéticas (no DNA) que aumentam o risco à trombose e outras doenças de coagulação do sangue e sua relação com a ocorrência de abortos espontâneos (não provocados). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa realizaremos uma análise em seu prontuário, ou seja, um histórico seu registrado pelos profissionais que lhe atenderam aqui no HCPA. As informações que serão acessadas estão: idade, quantidade de abortamentos espontâneos, idade em que cada abortamento ocorreu, cidade natal. Além disso, se você autorizar, utilizaremos sua amostra que foi coletada anteriormente para diagnóstico das variações nos genes de Fator V e Protrombina (relacionados à coagulação) e que está armazenada no Serviço de Genética para analisar duas outras variações genéticas relacionadas com o metabolismo, transformação e utilização de aminoácidos e algumas vitaminas, que são substâncias que existem em todas as células. A pesquisa por essas alterações genéticas não alteram seu acompanhamento clínico atual.

Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material.

O possível risco decorrente da participação na pesquisa é de quebra de confidencialidade das informações. No entanto, os pesquisadores utilizarão códigos para identificar os participantes, diminuindo esse risco.

O possível benefício decorrente da sua participação não é direto a você, mas a pesquisa contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, podendo beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Sandra Leistner Segal, pelo telefone (51) 33598011, com a pesquisadora Jéssica Dick, pelo mesmo telefone, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Com relação ao material biológico armazenado:

- () Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
() Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

9.2. ANEXO 2 - QUESTIONÁRIO PARA DOADORES DE SANGUE

Título do Projeto: Análise da prevalência de mutações da cascata de coagulação em doadores de sangue do HCPA e em mulheres com abortos espontâneos de repetição

QUESTIONÁRIO

Nome Completo: _____

Telefone para Contato (com DDD): _(____)_____

Email para Contato (caso tenha e deseje informar): _____

Sexo: _____

Idade: _____

Cor: _____

Local de Nascimento (cidade/estado): _____

Algum familiar veio junto com você doar sangue também? () SIM () NÃO

Já teve algum caso de aborto espontâneo (aborto causado de forma involuntária, por alguma reação do organismo, doença, problema de saúde): () SIM () NÃO

Para preenchimento do coletador/pesquisador:

Tipagem Sanguínea:

Fator RH: