



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POLIMORFISMOS GÊNICOS DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE,
CISTATIONINA BETA-SINTETASE E METIONINA
SINTASE: ASSOCIAÇÃO A PERDAS FETAIS
RECORRENTES E NÍVEIS SÉRICOS DE
VITAMINA B12, FOLATOS E HOMOCISTEÍNA**

WENDELL VILAS BOAS SANTOS

**Salvador - Bahia - Brasil
2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

POLIMORFISMOS GÊNICOS DA
METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE,
CISTATIONINA BETA-SINTETASE e METIONINA
SINTASE: ASSOCIAÇÃO A PERDAS FETAIS
RECORRENTES E NÍVEIS SÉRICOS DE
VITAMINA B₁₂, FOLATOS E HOMOCISTEÍNA

WENDELL VILAS BOAS SANTOS

Orientadora: Dr^a Marilda de Souza Gonçalves

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Patologia, área de concentração
em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia
2006

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ
Salvador-Bahia

S237i Santos, Wendell Vilas Boas
Polimorfismos Gênicos da Metilenotetrahidrofolato Redutase, Cistationina Beta-Sintetase e Metionina Sintase: Associação a Perdas Fetais Recorrentes e Níveis Séricos de Vitamina B₁₂, Folatos e Homocisteína [manuscrito] . / Wendell Vilas Boas Santos. - 2006.
86 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Dra.: Marilda de Souza Gonçalves

1. Aborto. 2. Polimorfismos genéticos. 3. Homocisteína. I. Título.

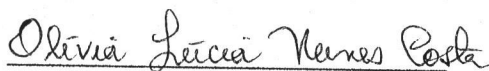
CDU 618.39: 591.15

POLIMORFISMOS GÊNICOS DA MTHFR, CISTATIONINA BETA-SINTETASE E METIONINA
SINTASE: ASSOCIAÇÃO A PERDAS FETAIS RECORRENTES E NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA B12,
FOLATOS E HOMOCISTEÍNA

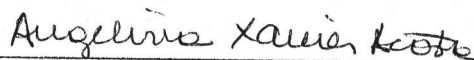
WENDELL VILAS BOAS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

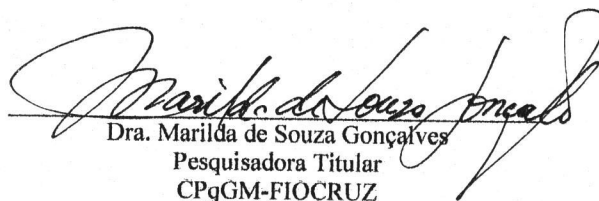
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Olívia Lúcia Nunes Costa
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Angelina Xavier Acosta
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

- A minha mãe;
- A meu irmão;
- A Dra. Marilda de Souza Gonçalves pela excelente orientação e carinho;
- À Dra. Olívia pela fundamental importância e contribuição no trabalho
- À Dra. Angelina Xavier Acosta pela contribuição no trabalho
- Aos amigos de equipe: Cyntia, Bruno, Cynara, José Neto, Joelma, Cristiane, Elisângela, Fábio, Isa, Renato, Elder, Rosane; Mário, Pablo;
- Aos colegas de mestrado;
- Aos Amigos
- Aos professores do curso de patologia experimental;
- Aos funcionários da biblioteca do CPqGM;
- As pacientes que concordaram em participar do estudo;
- Aos funcionários do CPqGM, em especial às meninas da pós-graduação;
- Aos funcionários do laboratório de bioquímica da Maternidade Climério de Oliveira.
- A Dr^o Mitermayer Reis – Chefe do LPBM
- Ao Dr^o Prof. Ajax Atta, Isabela e Gabriel do laboratório de imunologia da Faculdade de Farmácia – UFBA

SUMARIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo do Ácido Fólico e Vitamina B ₁₂	12
1.2 Metabolismo da Homocisteína	14
1.3 Polimorfismos Genéticos, Vitaminas e Hiperhomocisteinemia.....	16
1.3.1 A Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)	16
1.3.3 A Enzima Cistationina Beta Sintetase (CBS)	20
1.3.4 A Enzima Metionina Sintase (MS).....	22
1.4 A Hiperhomocisteinemia	23
1.5 Homocisteína e Gravidez	24
1.6 Perdas Fetais.....	25
1.7 Homocisteína e Aborto Espontâneo Recorrente	28

2. OBJETIVOS

31

3. JUSTIFICATIVA.....

32

4. CASUÍSTICA.....

33

5. MATERIAIS E MÉTODOS

35

5.1 Coleta das Amostras de Sangue

35

5.2 Análise Molecular.....

35

5.3 Dosagem Bioquímica

40

5.4 Coleta dos Dados Clínicos.....

42

5.5 Análise Estatística

42

6. RESULTADOS

43

7. DISCUSSÃO

55

8. CONCLUSÕES.....

65

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

66

10. ANEXOS.....

78

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

α	alfa
χ^2	Teste do Qui-quadrado
CBS	Enzima Cistationina Beta Sintetase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeos Trifosfato
dTMP	Deoxitimidilato
dUMP	Uridilato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Sódico
HDL	<i>High-density Lipoprotein Cholesterol</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
kDA	Kilodaltons
LDL	<i>Low-density Lipoprotein Cholesterol</i>
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mRNA	RNA Mensageiro
MS	Enzima Metionina Sintase
MTHFR	Enzima Metilenotetrahydrofolato Redutase
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-fosfato Reduzido
NO	Óxido Nítrico
pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>p</i> moles	Picomoles
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
TAE	Tris-acetato-EDTA
U	Unidades
μ L	Microlitros

Valores de Referência:

Ácido Fólico	>3 ng/mL
Vitamina B ₁₂	223 a 1132 pg/mL
Homocisteína	4 a 10 μ mol/L

RESUMO

A patogênese dos abortos espontâneos envolve interação complexa de diversos fatores genéticos e ambientais. A homocisteína é um aminoácido envolvido em diversos processos metabólicos incluindo metilação e sulfuração, sendo que as concentrações plasmáticas de homocisteína são determinadas por fatores nutricionais, como a ingestão de folatos e vitamina B₁₂, e de variações na atividade de enzimas decorrentes da presença de polimorfismos gênicos. Atualmente, a elevação da homocisteína plasmática e a deficiência de folatos e vitamina B₁₂ têm sido associadas a problemas obstétricos, incluindo o aborto espontâneo recorrente. O objetivo deste trabalho foi investigar associações entre os polimorfismos presentes em genes responsáveis pela síntese de proteínas envolvidas no metabolismo da homocisteína e seus substratos e ocorrência de aborto espontâneo recorrente. Foram investigados os polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima metilenoetrahidrofolato redutase (MTHFR); o polimorfismo A2756G no gene da enzima metionina sintase (MS) e a inserção 844ins68 no gene da enzima cistationina beta sintetase (CBS), utilizando o técnica de PCR – RFLP. Os níveis séricos de homocisteína, vitamina B₁₂ e folatos foram determinados pela técnica de quimioluminescência. As frequências alélicas dos polimorfismos entre 89 mulheres com história de abortos recorrentes e 150 controles foram de 19,1% e 19,6%, respectivamente, para o polimorfismo C677T da MTHFR; 20,8% e 26,0%, respectivamente, para o polimorfismo A1298C da MTHFR; 14,2% e 21,9%, respectivamente, para o polimorfismo A2756G da MS; e 16,4% e 18,0%, respectivamente, para a inserção 844ins68 da CBS. No presente estudo não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos nos grupos de mulheres investigadas. Porém, foi encontrada frequência elevada do polimorfismo

844ins68 da enzima CBS em mulheres com história de perdas fetais recorrentes no terceiro trimestre de gestação ($p= 0,035$). Os níveis de homocisteína, vitamina B12 e folato não diferiram entre os diversos genótipos dos polimorfismos investigados nos casos e controles. Os polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR, A2756G da MS e 844ins68 da CBS; e níveis séricos de homocisteína, vitamina B12 e folato não foram associados com aborto espontâneo recorrente no grupo investigado, sendo que a associação do polimorfismo 844ins68 da CBS deverá ser confirmada em estudos adicionais, visando estabelecer um provável mecanismo para este evento.

Palavras Chaves: Abortos Recorrentes; Polimorfismos; Homocisteína; Vitamina B₁₂ e Ácido fólico

ABSTRACT

The pathogenesis of spontaneous abortion involves a complex interaction of several genetic and environmental factors. Homocysteine is an amino acid that is involved in several key metabolic processes, including the methylation and sulphuration pathways. The homocysteine serum concentrations are determined by dietary factors, including folic acid and vitamin B₁₂; and variation in the enzyme activity involved in several pathways, as a result of some gene polymorphisms. Currently, raised homocysteine levels and folate and vitamin B₁₂ deficiency had been associated with obstetrics outcome including spontaneous abortion. The aim of this study was to investigate the association between polymorphisms in genes that encode enzymes involved in folate and vitamin B₁₂ – dependent homocysteine metabolism and recurrent spontaneous abortion. We investigated the C677T and A1298C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR), the A2756G polymorphism of the methionine synthase gene (MS) and the 844ins68 insertion of the cystathionine beta synthetase gene (CBS) by PCR followed by RFLP; the serum levels of homocysteine, vitamin B₁₂ and folate were investigated by quimioluminescence technique. The polymorphisms allele frequencies in 89 woman with idiopathic recurrent miscarriage and 150 controls were 19.1% e 19.6%, respectively, for the C677T polymorphism; 20.8% e 26.0%, respectively, for the A1298C polymorphism; 14.2% e 21.9%, respectively, for the A2756G; and 16.4% e 18.0%, respectively, for the 844ins68 insertion. The frequencies of the four polymorphisms investigated were not different between case and control groups. However, the frequency of the 844ins68 insertion in the CBS gene was higher among woman with losses history in third trimester period of pregnancy (p= 0,035). The homocysteine, vitamin B₁₂ and folate serum levels were not

different between the different polymorphisms genotypes described in cases and controls groups. The MTHFR polymorphisms C677T and A1298C; MS A2756G; CBS insertion 844ins68 and homocysteine, vitamin B₁₂ and folate serum levels were not associated with idiopathic recurrent miscarriage in the present study. Further studies need to be conducted in order to confirm the role of the CBS 844ins68 gene polymorphism in the recurrent miscarriage, establishing a probable mechanism to this event.

Key Words: Recurrent miscarriage; polymorphisms; Homocysteine; Vitamin B₁₂ and Folate

1. Introdução

1.1 Metabolismo do Ácido Fólico e Vitamina B₁₂

O ácido fólico e vitamina B₁₂ são vitaminas com estreita inter-relação metabólica, participando na síntese de nucleotídeos púricos e pirimídicos e na metilação da homocisteína com obtenção da metionina (Bender, 1992).

A forma coenzimática do ácido fólico é o ácido tetrahidrofólico, importante no transporte intermediário de um átomo de carbono como grupos hidroxila, formila e metil. O ácido fólico está presente nos alimentos, em sua maioria, como poliglutamatos, que são menos absorvidos que os monoglutamatos. Os monoglutamatos são obtidos a partir da hidrólise do poliglutamato da dieta, pela ação da folato hidrolase (dependente de zinco) na superfície da borda ciliada de células da mucosa intestinal (Burton & Foster, 1988). Os folatos metabolicamente ativos são os poliglutamatos e a glutamilação permitindo a acumulação intracelular destes, uma vez que não são capazes de atravessar as membranas celulares, facilitando as reações intermediárias entre os sítios catalíticos em complexos multienzimáticos e enzimas multifuncionais (Burton & Foster, 1988).

O fígado armazena o folato na sua forma reduzida e conjugada e o converte em metiltetrahidrofolato, que é secretado na biliar e reabsorvido na mucosa intestinal, estando disponível para os tecidos extra-hepáticos. Estes tecidos acumulam folato em concentração acima dos níveis plasmáticos através de desmetilação e formação de poliglutamatos (Bender, 1992).

A ingestão recomendada de folatos varia de acordo com a idade, sendo de 30 a 45ug/dia em lactantes e até 250ug/dia em adolescentes e adultos (Rodríguez, 1998). As fontes de ingestão são amplas, podendo ser obtido de produtos animais como a carne,

fígado, ovos e leite; e produtos vegetais como leguminosas, cereais integrais, raízes, tubérculos, frutas e vegetais (Burton & Foster, 1988).

A deficiência de folato pode causar distúrbios na síntese e reparo do DNA ou alterar a expressão gênica, devido a hipometilação; além de ser fundamental para a síntese de nucleotídeos púricos e pirimídicos. O uridilato (dUMP) é convertido a timidilato (TMP) pela timidilato sintase usando o 5,10-metilenotetrahidrofolato como doador de radicais metil (Narayanan *et al.*, 2004). Caso o aporte de folato esteja limitado, o balanço de precursores de DNA será alterado, levando ao acúmulo e incorporação errônea de uracil no DNA. Em condições normais, a enzima de reparo do DNA remove o uracil da fita causando quebra temporária na molécula de DNA que será reconstituído pela ação da enzima DNA ligase; porém, se a disponibilidade de folato estiver restrita, a incorporação errônea de uracil e o reparo podem ocorrer continuamente em um ciclo de reparo que pode causar danos ao DNA (Narayanan *et al.*, 2004).

A vitamina B₁₂ faz parte de uma família de compostos denominados genericamente de cobalaminas. É uma vitamina hidrossolúvel sintetizada exclusivamente por microorganismos (Gillham *et al.*, 1997). Apesar desta vitamina ser sintetizada por um grande número de bactérias intestinais presentes no organismo humano, seu aproveitamento é mínimo, uma vez que a síntese ocorre em sítios distantes do local de absorção fisiológica da vitamina; como resultado disto, a vitamina B₁₂ é estritamente encontrada nas dietas baseadas em alimentos de origem animal (Barrios *et al.*, 1999).

A liberação da vitamina B₁₂ ocorre através da digestão de proteínas animais, sendo então capturada por uma proteína denominada transcobalamina I, uma proteína R produzida na saliva e no estômago, sendo esse complexo posteriormente degradado

pelas proteases pancreáticas com conseqüente transferência da molécula de vitamina B₁₂ para um fator intrínseco gástrico, uma glicoproteína produzida pelas células parietais do estômago (Paniz *et al.*, 2005). Em humanos, as reservas totais de cobalaminas são muito maiores que os requerimentos diários, sendo apropriado para proteger o indivíduo contra a deficiência vitamínica. Essas reservas são suficientes para suprir os requerimentos diários por um período de 3 a 4 anos após ter se instalado um regime de ingestão diminuída ou má absorção de vitamina B₁₂ (Barrios *et al.*, 1999). Diferindo dos folatos que não possuem reservas tão estáveis, a recomendação de ingestão diária de cobalamina são bem menores, variando de 0,5 a 1,5 ug/dia em lactantes e 3ug/dia em adolescentes e adultos (Rodríguez, 1998).

Para ser útil à célula, a cianocobalamina deve ser convertida a metilcobalamina, a forma coenzimática ativa da cobalamina, através de reações de alquilação dessas formas farmacológicas (Barrios *et al.*, 1999).

1.2 Metabolismo da Homocisteína

A homocisteína é um aminoácido essencial necessário ao crescimento de células e tecidos do corpo humano. A única fonte de homocisteína no organismo vem da metionina, proveniente da ingestão de proteínas da dieta, em sua maior parte de origem animal (de la Calle *et al.*, 2003).

A homocisteína é um aminoácido intermediário formado pela desmetilação da metionina, sendo resultado da transformação da metionina através de reações de transmetilação (Cumming *et al.*, 1999). Seu metabolismo pode ocorrer por duas vias, a primeira denominada via de remetilação, onde a homocisteína é remetilada a metionina, tendo como doador primário de radicais metil, o 5-metiltetrahidrofolato, sendo a reação catalizada pela enzima MS e dependente de vitamina B₁₂. O resíduo metil necessário à

reação é quase inteiramente fornecido pelo metabolismo do ácido tetrahydrofolato (ácido fólico), sendo que esta reação requer a ação da enzima MTHFR. Alternativamente, o catabolismo da betaína é a segunda reação capaz de fornecer o resíduo metil para a homocisteína (Aubard *et al.* 2000). A segunda via é a de transsulfuração, onde a homocisteína é irreversivelmente catabolizada a cistationina pela enzima CBS, reação dependente de vitamina B₆, onde é excretada pelo organismo como sulfato inorgânico (Girelli *et al.* 1998) (Figura 1).

Sendo assim, os níveis séricos de homocisteína irão depender da atividade enzimática das enzimas MTHFR, MS e CBS, bem como da disponibilidade de tetrahydrofolato fornecido pelo metabolismo do ácido fólico (Vitamina B₉). Deve-se também levar em consideração a importância de cofatores enzimáticos, como a vitamina B₁₂ e vitamina B₆, que contribuem para a funcionalidade do ciclo metabólico (Aubard *et al.* 2000).

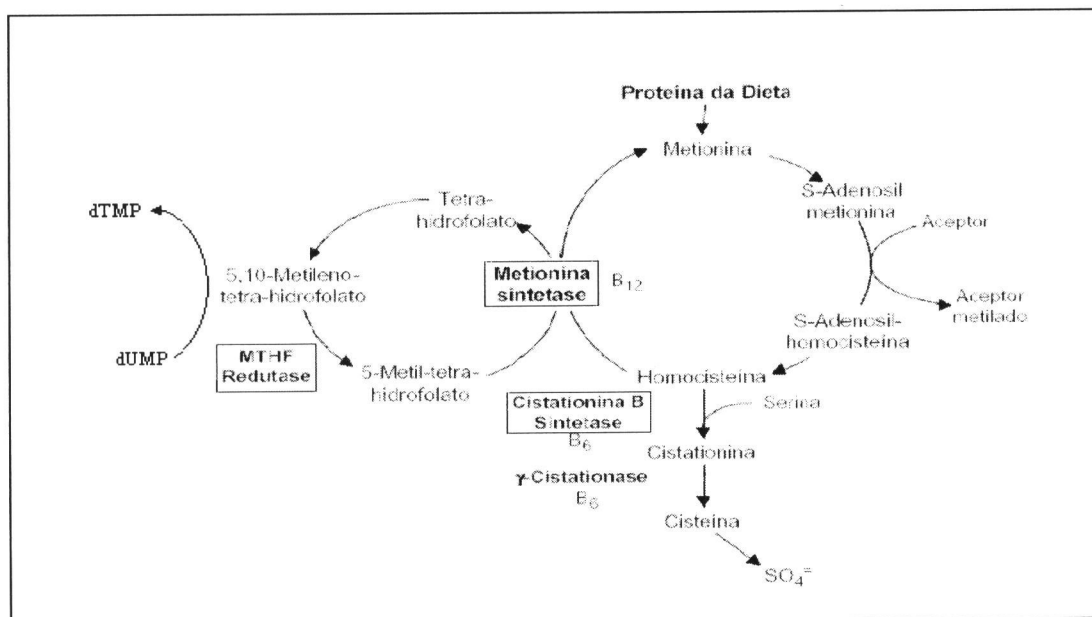


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo da vitamina B₁₂ e ácido fólico e suas participações na formação de homocisteína (adaptado de Zetterberg, 2004).

1.3 Polimorfismos Gênicos, Vitaminas e Hiperhomocisteinemia

1.3.1 A Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase

Dois fatores importantes afetam a concentração de homocisteína em humanos; a dieta, principalmente a ingestão de folato e vitamina B₁₂ e a presença de polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, que é dependente de folato e vitamina B₁₂ (Zetterberg, 2004).

A enzima MTHFR catalisa a redução de N⁵,N¹⁰-metilenotetrahidrofolato a N⁵-metiltetrahidrofolato, que é a forma mais comum de folato plasmático circulante, considerado como importante doador de unidades carbonadas para a remetilação de homocisteína à metionina. O N⁵,N¹⁰-metilenotetrahidrofolato e seu derivado, o formiltetrahidrofolato, são essenciais para a síntese de bases pirimídicas e púricas (Frosst *et al.* 1995). A MTHFR é uma enzima chave que participa do metabolismo de folatos e de homocisteína (Schwahn & Rozen 2001).

O gene que codifica a enzima MTHFR está localizado no cromossomo 1, região p36.3 e a enzima é uma flavoproteína dimérica dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH), possuindo peso molecular de 77 kilodaltons (kDa) (Goyette *et al.* 1994).

Polimorfismos no gene da enzima MTHFR e interações ambientais

O polimorfismo C677T no gene da MTHFR foi primeiro identificado por Frosst *et al.* (1995) ao estudarem pacientes com problemas cardiovasculares prematuros. O polimorfismo C677T é o melhor caracterizado, envolvendo a substituição do tipo

transição, onde uma citosina é substituída por timina na posição 677 do gene da MTHFR, resultando na substituição do resíduo alanina para valina no domínio catalítico da enzima com formação de uma enzima termolábil, fato que reduz a atividade enzimática em 70% e 35% nos indivíduos homozigotos (TT) e heterozigotos (CT), respectivamente (Frosst *et al.* 1995).

O genótipo homozigoto (TT) para o polimorfismo C677T predispõe ao desenvolvimento de hiperhomocisteinemia, fenômeno que é intensificado na condição de insuficiência de folatos (Frosst *et al.* 1995; van der Put *et al.*, 1998).

Quere *et al.* (1998) avaliaram 100 mulheres com história de abortos recorrentes e encontraram a hiperhomocisteinemia em 12%. Destas, 20% apresentavam a mutação C677T da MTHFR, e 15% possuíam concentração diminuída de folato plasmático. Unfried *et al.* (2002) também encontraram associação significativa entre portadores do alelo mutante (T) para o polimorfismo C677T, elevação de homocisteína e abortos recorrentes. Nelen *et al.* (1997) encontraram “Odds Ratio” (OD) de 3 vezes para a ocorrência de aborto espontâneo em mulheres portadoras do genótipo homozigoto (TT) mutante para o polimorfismo C677T, em relação ao grupo controle. Porém, em outros estudos, não foi descrita associação entre antecedentes de abortos recorrentes e o polimorfismo C677T (Foka *et al.*, 2000, Pihusch *et al.*, 2001).

Outro polimorfismo comum no gene da enzima MTHFR é o A1298C. A transição de adenina para citosina na posição 1298 do gene, causa troca do resíduo de glutamato por alanina no domínio regulatório da MTHFR. O alelo 1298C tem sido associado à diminuição da atividade enzimática, embora não seja na mesma intensidade atribuída ao polimorfismo C677T. Porém, indivíduos heterozigotos (AC) e homozigotos (CC) para o polimorfismo A1298C não apresentam elevação nos níveis de homocisteína (Weisberg *et al.*, 1998).

A presença do genótipo portador dos dois alelos em heterozigose (677CT e 1298AC) foi associada à redução ainda maior da atividade enzimática da MTHFR, com conseqüente elevação dos níveis de homocisteína quando comparado à heterozigose de cada variante independente (van der Put *et al.*, 1998).

Vários estudos têm examinado a distribuição desses dois polimorfismos, sendo que van der Put *et al.* (1998) descreveram que portadores do genótipo 677TT sempre têm o genótipo 1298AA e vice-versa, concluindo que os alelos 677T e 1298C estão sempre na configuração trans. Outro estudo envolvendo indivíduos de origem alemã também não detectou indivíduos homozigotos para ambos os polimorfismos ou homozigoto para um e heterozigoto para o outro (Stegmann *et al.*, 1999). Entretanto, Weisberg *et al.* (1998) descreveram um indivíduo com o genótipo 677TT/1298AC em estudo realizado na população do Canadá, demonstrando que os dois alelos, embora raros, podem existir em cis.

Através da determinação dos níveis séricos de homocisteína, tem sido demonstrada uma interação genético-ambiental forte na expressão fenotípica dos polimorfismos no gene da enzima MTHFR (Jacques *et al.*, 1996; Girelli *et al.*, 1998). As enzimas envolvidas no ciclo metabólico da homocisteína precisam de cofatores (vitaminas B₆ e B₁₂) e substratos (ácido fólico) para o funcionamento normal do ciclo, sendo que a ingestão deficiente de vitaminas B₁₂, B₆ e ácido fólico perturba o funcionamento do ciclo da homocisteína causando elevação nas suas concentrações séricas. Em contrapartida, uma dieta rica destes nutrientes pode causar a diminuição de níveis de homocisteína (Aubard *et al.* 2000). Couto *et al.*, (2006) demonstraram uma forte interação ambiental e níveis de folato e homocisteína em estudo desenvolvido em recém nascidos provenientes de hospitais público e privado da cidade de Salvador-Ba,

evidenciando níveis diminuídos de folatos e elevados de homocisteína entre os neonatos oriundos do hospital público, quando comparados aos nascidos no hospital privado.

O folato, na forma 5-metiltetrahidrofolato, é cofator na transformação metabólica da homocisteína em metionina, que por sua vez é metabolizado em SAM (S-adenosilmetionina), importante na metilação do DNA e conseqüentemente no controle da regulação gênica. Em condições de deficiência de folato, o SAM é limitado, o que pode levar à hipometilação do DNA e ativação e transcrição indevida de um proto-oncogene com transformação maligna da célula (Fang *et al.*, 1997).

Thiersch (1952) após observar a indução de óbito fetal pela ação do antagonista do ácido fólico ou ácido 4-aminopteroilglutâmico, sugeriu que os abortos poderiam ser causados por deficiência de ácido fólico. Isso pode ser explicado devido ao requerimento absoluto de folato pelo embrião, ocorrido durante a fase bem precoce da concepção. O folato é adquirido pelo organismo humano exclusivamente através da dieta alimentar (Boxmeer *et al.*, 2006).

Deficiências nutricionais de ácido fólico em gestantes têm sido correlacionadas a defeitos na formação tubo neural (Mattson & Shea, 2003). Apesar dos possíveis eventos moleculares que justificam este processo não serem completamente esclarecidos, a metilação deficiente de metabólitos cruciais ao desenvolvimento do embrião e/ou anormalidades na proliferação celular neural, diferenciação e apoptose, podem ser decorrentes da incorporação errônea de nucleotídeos ao DNA, que acompanha a deficiência de folatos nas células em proliferação (Mattson & Shea, 2003). Parece provável que estes eventos também levem à diminuição da viabilidade fetal, como demonstrado no estudo caso-controle conduzido por George *et al.* (2002) que evidenciaram o aumento no risco de aborto espontâneo entre mulheres com níveis de folato plasmáticos sub-ótimos, concordando com os resultados de Nelen *et al.* (2000)

que encontraram associação entre hiperhomocisteinemia e níveis diminuídos de folato em abortos espontâneos.

Pela sua importância no ciclo metabólico da homocisteína, o folato tem se mostrado eficiente na diminuição dos níveis de homocisteína plasmática, inclusive nos indivíduos com o genótipo homozigoto para o polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR (Jacques *et al.*, 1996). Triagens randômicas estão em progresso para determinar se essa diminuição nos níveis de homocisteína é acompanhada de uma melhoria nos resultados clínicos (Hague, 2003).

Deficiências em vitaminas do complexo B e concentrações elevadas de homocisteína também têm sido relacionadas a perdas fetais (Nelen *et al.*, 2000). O uso efetivo dessas vitaminas é dependente de variações nas seqüências em enzimas envolvidas no seu metabolismo (Boxmeer *et al.*, 2006), uma vez que existe uma interdependência entre os cofatores e enzimas envolvidos neste ciclo (Aubard *et al.* 2000).

1.3.3 A Enzima Cistationina Beta Sintetase

A enzima CBS (dependente de vitamina B₆) catalisa a condensação irreversível de serina com homocisteína para a formação de cistationina, na via da transsulfuração (Girelli *et al.* 1998; Dutta, *et al.*, 2005).

O gene da CBS, em humanos, consiste de 19 exons e está localizado no cromossomo 21, posição 21q22.3. O polipeptídeo de 63 kDA do gene humano da CBS é composto por tetrâmeros idênticos ligados a um grupamento heme e um piridoxal fosfato (Quéré *et al.*, 1999; van der Put *et al.*, 2001). Três diferentes mutações “sem

sentido”, assim como inserção, deleção e variações no “splice” têm sido identificadas, algumas delas bastante polimórficas (Dutta, *et al.*, 2005).

Condições patológicas que alteram a atividade da enzima CBS, podem causar acúmulo de homocisteína, resultando também no acúmulo de SAH, e conseqüentemente na inibição de diversas metiltransferases (Quéré *et al.*, 1999).

A homocistinúria congênita tem como maior causa (80%) as deficiências autossômicas recessivas no gene da CBS. As manifestações clínicas mais freqüentes desta deficiência incluem retardo mental, osteoporose, anormalidades esqueléticas, palidez e queda de cabelo (Quéré *et al.*, 1999).

O alelo variante 844ins68 é uma duplicação exata do intron-exon no limite do exon 8, e foi encontrado sempre associado em cis com uma mutação adicional no gene da CBS, transição de timina para citosina na posição 866 deste gene, que causa substituição de isoleucina para treonina na proteína (Sperandeo *et al.*, 1996). Curiosamente, a inserção 844ins68 cria um sítio de “splice” alternativo que resgata a condição selvagem da seqüência no gene da CBS. Ainda que esta inserção, aparentemente, não cause bloqueio na atividade enzimática, dados relacionados ao mRNA fornecem evidências de que o alelo portador desta inserção é transcrito ineficientemente (Tsai *et al.*, 1996, Sperandeo *et al.*, 1996).

A inserção 844ins68 no gene da enzima CBS tem sido investigada como fator de risco para doença trombótica arterial, apesar de estudos terem sido desenvolvidos em número limitado de pacientes e controles, fornecendo resultados controversos (Franco *et al.*, 1997). Este polimorfismo também foi investigado em pacientes italianos portadores de homocistinúria (Sebastio *et al.*, 1995).

No Brasil, Franco *et al.* (1998) estudando a inserção 844ins68 em pacientes com trombose venosa e controles, descreveram freqüências genotípicas de 19,8% e 16,8% em heterozigose para a mutação em pacientes e controles, respectivamente.

A inserção de um fragmento de 68 pares de base (844ins68) na região codificante do exon 8 do gene da CBS é comum entre indivíduos normais, com freqüências de 11,7% nos Estados Unidos; 7,5% na Itália; 18,8% na Irlanda e 16,8% na Holanda (Tsai *et al.*, 1996, Kluijtmans *et al.*, 1997).

As freqüências mundiais do polimorfismo 844ins68 é altamente heterogênea, sendo prevalente em africanos, europeus e norte americanos (Tsai *et al.*, 1996, Sperandio *et al.*, 1996), e raro na população asiática. Desta forma, tem sido considerado um marcador antropogênico seguro para os dois maiores grupos humanos – Africanos e Asiáticos (Pepe *et al.*, 1999).

1.3.4 A Enzima Metionina Sintase

A enzima MS, que é essencial na manutenção de concentrações adequadas de folato intracelular, catalisa a remetilação de homocisteína para metionina, que é requerida para a produção de SAM e importante nas reações de metilação. Para o funcionamento correto da enzima, ela necessita de vitamina B₁₂ como cofator (Sharp & Little, 2004). O gene da MS está localizado no cromossomo 1, posição 1q43 (Leclerc *et al.*, 1996).

O polimorfismo A2756G no gene da MS causa mudança de ácido aspártico para glicina na região de ligação dessa proteína, causando diminuição de sua atividade (van der Put *et al.*, 1997). Chen *et al.* (2001) encontraram níveis séricos elevados de homocisteína em indivíduos homozigotos para o polimorfismo A2756G, porém as

evidências acerca deste polimorfismo e suas conseqüências no organismo são ainda limitadas.

1.4 A Hiperhomocisteinemia

Níveis elevados de homocisteína plasmática ou hiperhomocisteinemia podem ser decorrentes de distúrbios genéticos ou nutricionais, afetando o metabolismo da homocisteína. Diversos estudos têm demonstrado que níveis elevados de homocisteína plasmática são freqüentemente encontrados em pacientes com arteriosclerose, evento clínico que afeta o cérebro, artérias coronárias e periféricas (Clark *et al.* 1991). Os efeitos da hiperhomocisteinemia em doenças vasculares parecem ser independentes do colesterol total, do LDL (*low-density lipoprotein cholesterol*) e HDL (*High-density lipoprotein cholesterol*), da presença de diabetes, índice de massa corpórea, consumo de cigarro, idade e pressão arterial elevada, sendo considerado um fator de risco independente para doenças vasculares (Boushey *et al.*, 1995). O mecanismo pelo qual a hiperhomocisteinemia favorece o aparecimento de doenças vasculares ainda não está totalmente elucidado. A homocisteína influencia respostas vasculares múltiplas, incluindo alteração na coagulação sanguínea, na função plaquetária, nas respostas relacionadas aos músculos lisos, tais como proliferação em vasos e conseqüentemente na função endotelial (Eberhardt *et al.*, 2000). Níveis elevados de homocisteína danificam a função vasodilatadora endotelial, em parte devido à diminuição da atividade do óxido nítrico (NO), prejudicando a resistência e a condução nos vasos. Esses danos podem ser decorrentes do aumento do estresse oxidativo que contribui para a depleção da bioatividade do NO (Eberhardt *et al.*, 2000).

1.5 Homocisteína e Gravidez

A hiperhomocisteinemia é considerada um fator de risco cardiovascular identificado há vários anos em pacientes com quadro de hiperhomocisteinúria congênita rara e grave (McCully, 1969). O conceito de hiperhomocisteinemia moderada e sua associação como fator de risco cardiovascular é também bastante conhecido e tem ganhado força e aceitação nos últimos 20 anos (Wilcken & Wilcken, 1976). A descoberta que complicações obstétricas podem estar ligadas a hiperhomocisteinemia é bem mais recente e muitas dúvidas ainda permanecem na determinação da contribuição exata deste novo fator de risco obstétrico (Aubard *et al.* 2000).

A concentração normal de homocisteína em mulheres saudáveis, jovens e não-grávidas varia entre 5,8 e 12,8 $\mu\text{mol/L}$ (Vilaseca *et al.*, 1997). Os níveis de homocisteína diminuem no primeiro trimestre de gestação, alcançando valores mínimos durante o segundo semestre, e aumentando discretamente no final da gestação, onde alcança novamente os valores do primeiro trimestre (Walker *et al.*, 1999). Os níveis desse aminoácido são geralmente diminuídos durante a gravidez, devido a resposta fisiológica do próprio estado, com elevação dos níveis de estrógeno, e hemodiluição pelo aumento do volume plasmático ou aumento da demanda de metionina tanto pela mãe quanto pelo feto (López-Quesada *et al.*, 2000).

A Concentração de homocisteína também pode ser determinada no líquido amniótico e apesar dos aminoácidos e proteínas do líquido amniótico serem principalmente de origem materna, o feto também contribui para a biotransformação de alguns dos seus componentes (Kang *et al.*, 1986).

Stegers-Theunissen *et al.* (1997) estudaram as concentrações de metionina e homocisteína no celoma extra-embriônico e no líquido amniótico de fetos com 8 e 12

semanas de gestação, encontrando níveis elevados de metionina e diminuídos de homocisteína nestes dois compartimentos, quando comparados aos níveis maternos. Este fato pode ser justificado pela necessidade de concentrações elevadas de metionina para um bom desenvolvimento fetal, uma vez que a metionina é precursora de S-adenosilmetionina (SAM), principal doador de grupos metil nas reações de transmetilação envolvidas na biotransformação de ácido ribonucléico (RNA) e ácido desoxirribonucléico (DNA), entre outros (Picciano, 2000; Steegers-Theunissen *et al.*; 1997). Conseqüentemente, a concentração de homocisteína no líquido amniótico depende da concentração materna e da quantidade de homocisteína metabolizada e excretada pelo feto (Kang *et al.*, 1986).

1.6 Perdas Fetais

As perdas fetais recorrentes são geralmente definidas pela presença de três ou mais perdas gestacionais consecutivas (Crosignani & Rubin, 1991; Salat-Baroux, 1998). As perdas fetais são consideradas um problema freqüente de saúde, sendo que um a dois por cento das mulheres em idade reprodutiva são afetadas por três ou mais abortos e cinco por cento, por dois ou mais abortos (Regan, 1998). Esta situação, que envolve tanto as mulheres quanto seu companheiro e suas famílias é considerada uma das experiências mais dolorosas de um casal e está associada a morbidades psicológicas como depressão, ansiedade, suicídio, transtorno obsessivo-compulsivo, além de conflitos nas relações conjugais e outras complicações (Hutti, 2005).

Diversos fatores etiológicos têm sido propostos para explicar as perdas fetais. A ciência procura há algum tempo conhecer melhor sua etiologia, buscando alternativas terapêuticas que possam produzir melhores resultados gestacionais. Entretanto, as

causas de abortos recorrentes são conhecidas em somente metade dos casos, sendo que a etiologia dos outros 50% ainda permanece inexplicável (Porter & Scott, 2005).

A progesterona é crítica no desenvolvimento uterino, implantação e manutenção da gravidez (Norwitz *et al.*, 2001; Sunder & Lenton 2000). Durante a fase progestínica, o corpo lúteo que é formado a partir da ruptura do folículo, é a principal fonte de progesterona até a décima segunda semana após a concepção; posterior a esta fase, a produção dominante deste hormônio provém da placenta. Portanto, neste período inicial, caso o corpo lúteo seja removido cirurgicamente, ou haja bloqueio na produção de progesterona, ocorrerá danos na implantação do concepto (Mendizabal *et al.*, 1984).

A idade materna avançada e hábitos de vida, como o uso de cigarros e outras drogas são também fatores etiológicos associados a ocorrência de abortos. A ingestão de doses elevadas de cafeína ou álcool pode constituir um fator de risco adicional para os fenômenos de perdas (Regan & Rai, 2000). Henriksen *et al.* (2004) recentemente observaram evidências associadas ao consumo de doses elevadas de bebidas alcoólicas durante o período de concepção e risco aumentado de perdas fetais.

Estudos de citogenética sugerem que as anormalidades ocorridas no feto podem ser responsáveis por até metade dos casos de abortos espontâneos nas gestações clinicamente reconhecidas (Goddijn & Leschot, 2000). Tho *et al.* (1979), entretanto, estudando 100 casais com história de perdas, descreveram malformações nos abortos de 25 casais. Harger *et al.* (1983) demonstraram que as anomalias cromossômicas estavam presentes em quatro a oito por cento dos casais com antecedentes de aborto espontâneo recorrente. As translocações cromossômicas balanceadas, na qual partes de cromossomos mudam sua posição no genoma, sem perda nem ganho importante de material genético, são consideradas também causa importante de aborto espontâneo, pois uma em cada 500 pessoas é portador deste tipo de translocação e, quando um

membro do casal carrega uma dessas alterações, o risco para ocorrência de aborto espontâneo é duplicado (Kavalier, 2005).

Anomalias na anatomia do útero podem predispor mulheres a dificuldades reprodutivas, inclusive quando as perdas se repetem no primeiro ou segundo trimestres a probabilidade de ter um fator de risco ligado a anatomia uterina é elevada (Propst & Hill, 2000; Patton, 1994). Essas deficiências incluem a incompetência istmo-cervical; os septos intra-uterinos; os miomas que fazem saliência para a cavidade uterina e as sinéquias uterinas (Costa, 1994). A frequência das anomalias no útero nos casos de aborto espontâneo é estimada entre 15% a 27% (Harger *et al.*, 1983).

É tradicional a busca por doenças endócrinas maternas na investigação de possíveis causas de abortos, apesar da frequência dessas doenças não ser maior em mulheres com histórico de aborto em relação à população geral (RCOG, 2003). A associação entre auto-anticorpos e perda gestacional já foi amplamente divulgada. A síndrome antifosfolípide, na qual os anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico estão presentes, está relacionada a perdas gestacionais, e os anticorpos podem ser detectados em 15% das mulheres com história de perdas fetais (Harger *et al.*, 1983). Mecacci *et al.* (2000) avaliaram a incidência de anticorpos anti-tireoidianos em mulheres com abortos espontâneos recorrentes e controles saudáveis e encontraram diferença estatisticamente significativa, confirmando a associação entre auto-imunidade da tireóide e abortos.

A presença de infecções bacterianas, viroses e outros organismos como toxoplasma e listeria no organismo materno podem interferir na gestação, porém esta é uma questão controversa. Segundo o “Royal College of Obstetricians and Gynecologists” de Londres, a triagem para infecções (como toxoplasma, rubéola,

citomegalovirus, herpes, HIV e outros vírus) devem ser abandonadas na investigação de abortos recorrentes (RCOG, 2003).

Doenças maternas como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica e o hipo ou hipertireodismo, embora sejam mais relacionadas como causa de óbito fetal, podem também levar a um quadro de aborto espontâneo (Thomas & Reid, 1987).

1.7 Homocisteína e Aborto Espontâneo Recorrente

Nos últimos anos, a elevação nos níveis de homocisteína tem sido associada a várias complicações durante a gestação, incluindo defeitos no tubo neural; retardo no crescimento do feto intrauterino; pré-eclâmpsia; descolamento de placenta; morte fetal e aborto espontâneo recorrente (de la Calle *et al.*, 2003).

Wouters *et al.* (1993) foram os primeiros a descrever a associação entre hiperhomocisteinemia e abortos recorrentes. Eles notaram que 14% das pacientes que apresentaram perdas repetidas primárias tinham níveis elevados de homocisteína e 33% das pacientes com perdas repetidas secundárias, após terem gestações normais, também apresentavam hiperhomocisteinemia, demonstrando uma influência da hiperhomocisteinemia mesmo em mulheres com antecedentes de gestação normal.

A hiperhomocisteinemia é um fator de risco para danos vasculares que atua favorecendo a trombogênese nos vasos da placenta, artérias e veias, o qual pode reduzir o suprimento de sangue fetal e alterar o processo normal de gestação. Os abortos, principalmente nos primeiros estágios da gestação, podem ser explicados pelos danos que o excesso de homocisteína pode causar nos vasos deciduais e coriônicos, levando a implantação ineficiente do embrião (de la Calle *et al.*, 2003).

Em um estudo da histologia da placenta, foi demonstrado um número elevado de vilosidades avasculares e redução de densidade vascular da placenta em mulheres com história de abortos recorrentes, quando comparado a controles (Meegdes *et al.*, 1988). Nelen *et al.* (2000) estudando um grupo de mulheres com o mesmo problema, também sugeriram a associação direta entre hiperhomocisteinemia e defeitos na vascularização das vilosidades coriônicas, encontrando redução nas medidas das áreas, perímetros e diâmetros dos elementos vasculares do córion.

Por outro lado, tem sido sugerido que a hiperhomocisteinemia materna pode produzir efeito tóxico direto ao feto, como o demonstrado experimentalmente em embriões de ratos, tendo sido observada toxicidade específica a estes embriões, que ao ser produzida em estágios precoces, pode levar a ocorrência de abortos (Aerts *et al.*, 1994). A embriotoxicidade da homocisteína em níveis elevados foi confirmada em estudos experimentais realizados em galinhas (Rosenquist *et al.*, 1996) e ratos, inclusive indicando que em níveis de 15 $\mu\text{mol/L}$ de homocisteína, 75% dos embriões de ratos morreram e os que sobreviveram tiveram anormalidades no septo cardíaco interventricular e fechamento do tubo neural (Vanaerts *et al.*, 1994).

A S-adenosilmetionina, derivado da metionina, e S-adenosilhomocisteína, derivado da homocisteína, componentes do ciclo da metionina, são substratos e produtos das reações essenciais de metilação celular. Após a transferência de um grupo metil, o SAM é convertido em SAH, um potente inibidor de reações de metilação (Caudill *et al.*, 2001), essencial no controle da expressão gênica (Narayanan *et al.*, 2004). A toxicidade da homocisteína no desenvolvimento embrionário pode ser resultado da elevação dos níveis de SAH que pode inibir reações cruciais de metilação (DNA, RNA, proteínas, neurotransmissores, fosfolípidos e histonas) pela diminuição

conseqüente da SAM, causando danos genéticos e funcionais à célula (Vanaerts et al. 1994), podendo impedir a formação do blastocisto (Menezo *et al.*, 1989).

Em porcos, a homocisteína em excesso demonstrou ter efeito teratogênico e pode estar associada a habilidade específica na inibição da conversão do retinol para ácido retinóico que atua na regulação da expressão de alguns genes essenciais para o desenvolvimento rápido do trofoblasto do concepto, como também no crescimento da placenta (Johansson *et al.*, 2001).

A hiperhomocisteinemia também inibe a síntese *de novo* de deoxitimidilato (dTMP). Supõe-se que o 5,10-methilenotetrahidrofolato, um cofator para esta reação, é depletado na presença de excesso de homocisteína devido a elevação na demanda de 5-metiltetrahidrofolato, no sentido de remover o excesso de homocisteína por metilação. Essas condições induzem dano no DNA, através de incorporação errônea de dUMP em lugar de dTMP na fita de DNA, desencadeando reações de excisão e reparo, quebras cromossômicas, parada do ciclo celular e apoptose; ou seja, a homocisteína desempenha um papel fundamental no crescimento celular e conseqüentemente no desenvolvimento embrionário; é também possível que a homocisteína seja responsável pela indução de algumas deficiências no desenvolvimento do feto previamente atribuídas a deficiências em folatos e/ou vitamina B₁₂ (Zetterberg, 2004).

2.OBJETIVOS

Geral

- Investigar polimorfismos gênicos relacionados ao metabolismo da homocisteína, folatos e vitamina B₁₂ em mulheres com história de perdas fetais recorrentes, com a finalidade de estabelecer uma provável influência da presença destes polimorfismos e alteração nos níveis séricos destas moléculas nas perdas.

Para tanto, foram propostos os seguintes objetivos específicos em um grupo de mulheres com histórico de perdas fetais recorrentes:

- Determinar a frequência dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR em um grupo de mulheres com histórico de perdas recorrentes e um grupo controle;
- Investigar a presença da mutação A2756G no gene da enzima MS nesses mesmos grupos;
- Investigar também o polimorfismo 844ins68 no gene da enzima CBS;
- Determinar os níveis séricos de homocisteína, ácido fólico e vitamina B₁₂ nos grupos;
- Investigar uma possível associação através da diferença de frequências alélicas dos polimorfismos gênicos investigados e história de perdas fetais apresentadas pelas mulheres participantes do estudo, em comparação a um grupo controle constituído por mulheres que tiveram pelo menos uma gestação bem sucedida.

3. JUSTIFICATIVA

De acordo com o exposto, julgamos de importância o estudo de fatores que possam conduzir a eventos de perdas gestacionais recorrentes, como os polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR; A2756G no gene da enzima MS; a inserção 844ins68 no gene da enzima CBS e níveis séricos de homocisteína, vitamina B₁₂ e ácido fólico.

Eventos repetidos de abortamento é uma situação delicada e crítica que envolve as mulheres, seu companheiro e suas famílias, levando o casal a uma busca constante de meios e tratamentos para solucionar o problema, ou muitas vezes apenas a uma justificativa para o fato. Esta condição de estresse causa grande desgaste psicológico e outros tipos de problemas, tais como depressão, ansiedade, suicídio, transtorno obsessivo-compulsivo, além de conflitos nas relações conjugais. O fato de que ainda não estejam completamente esclarecidas as principais etiologias associadas às perdas fetais em pelo menos metade dos casos encontrados (Porter & Scott, 2005), e a presença de evidências que relacionam fortemente defeitos enzimáticos e nutricionais a abortos, consideramos importante a realização do presente estudo, no sentido de investigar possíveis associações de polimorfismos em genes de enzimas presentes no metabolismo da homocisteína, vitamina B₁₂ e ácido fólico à alteração bioquímica destas moléculas a perdas fetais na nossa população.

4. CASUÍSTICA

Foi realizado um estudo caso-controle envolvendo 89 mulheres, atendidas no Ambulatório de Aborto Habitual, coordenado pela Dr^a Olívia Lúcia Nunes Costa na Maternidade Pública Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia. Como critério de inclusão dos casos no estudo, foi definido que as mulheres deveriam apresentar antecedentes de perdas fetais recorrentes com pelo menos duas perdas ou mais. A idade máxima estabelecida para a inclusão dos casos foi de 40 anos. As mulheres eram provenientes de diversos bairros da cidade de Salvador e cidades circunvizinhas.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM – FIOCRUZ). As pacientes incluídas no estudo responderam o questionário epidemiológico e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após explicação dos objetivos e finalidades da pesquisa. Foram excluídas do estudo todas as pacientes que não concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; que possuíam idade superior a 40 anos; e que já haviam desenvolvido uma gestação completa e bem sucedida. As pacientes portadoras de anticorpos antifosfolípide também foram excluídas do estudo.

O grupo controle foi composto de 150 mulheres provenientes da Maternidade Pública Tsylla Balbino, Salvador-BA, que tiveram ao menos uma gestação bem sucedida. Os controles foram pareados com os casos, com relação a classe social e idade, situando-se dentro da faixa de idade fértil.

Também foi incluído no estudo um grupo controle constituído por 47 mulheres, provenientes da maternidade IPERBA, pareadas por idade e que serviram para comparação dos níveis séricos de vitamina B₁₂, ácido fólico e homocisteína.

As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM / CPqGM - FIOCRUZ) para realização das análises moleculares; as dosagens de ácido fólico e vitamina B₁₂ foram realizadas no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Farmácia da UFBA e as dosagens de homocisteína no Laboratório Álvaro em Cascavel – PR.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Coleta das Amostras de Sangue

Foram coletados cinco mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sódico), a vácuo, na concentração de 1,5 mg/ml \pm 0,25, e cinco mL sem aditivo para a coleta do soro, em material descartável. As amostras de sangue coletadas foram utilizadas para a extração do DNA genômico e análises bioquímicas de fólico, vitamina B₁₂ e homocisteína.

5.2 Análise Molecular

Extração do DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 200 μ L de sangue total, utilizando-se o *Kit QIAGEN® DNA Blood Mini Kit (Uniscience do Brasil)*, de acordo com as instruções do fabricante.

Determinação dos Polimorfismos Gênicos

Os polimorfismos genéticos foram investigados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos (Quadro 1) para cada região do gene, permitindo a amplificação seletiva dos fragmentos de DNA. Para cada reação de PCR foram utilizados controles negativos e

positivos, visando testar a presença de contaminantes e confirmar a fidelidade da reação, respectivamente.

A reação de PCR foi realizada em ciclador de temperatura (GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer) e o produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA for routine use) a 1% corado com brometo de etídio (0,002%) em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X pH 8,3, e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Para o acompanhamento visual das amostras no gel, foi utilizado o corante azul-de-bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%), na proporção de 1:6.

Os produtos de amplificação da PCR foram submetidos a digestão com enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo, utilizando a técnica de RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição). Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose a 2% ou poliacrilamida a 7% e comparados a marcadores de pares de base padrão, para a identificação dos genótipos.

Quadro 01. Seqüências dos oligonucleotídeos sintéticos, tamanho do fragmento e enzima de restrição utilizados para investigação dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR; A2756G no gene da enzima Metionina Sintase e 844ins68 no gene da Cistationina- β -sintetase

Seqüência dos Oligonucleotídeos Sintéticos 5' → 3'	Mutação	Fragmento (pb)	Enzima de Restrição
TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA - D AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG - R	C677T da MTHFR	198	<i>HinfI</i>
CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C - D CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG - R	A1298C de MTHFR	171	<i>MbolI</i>
ATA GAA TAT CGA GGC ATG TCC AGG CG - D TGG GGC CCA GGG TCA GCC AGG CTC C - R	844ins68 da CBS	257	<i>BsrI</i>
GAA CTA GAA GAC AGA AAT TCT CTA - D CAT GGA AGA ATA TCA AGA TAT TAG A - R	A2756G da MS	189	<i>HaeIII</i>

D = direto; R = reverso

Investigação do Polimorfismo C677T no Gene da Enzima MTHFR

A reação de PCR foi realizada utilizando tampão composto por 200 mM de Tris-HCl; 2,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) na concentração de 200 μM ; 12,5 $\mu moles$ de cada “primer” sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), para um volume final de 50 μL . Para a amplificação, a reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 94°C por 5 minutos; seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 62°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos (Adaptado de FROSST et al., 1995), obtendo-se um produto final de 198 pares de bases (pb).

Protocolo para RFLP para o Polimorfismo C677T

O DNA amplificado foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Hinf I* (*New England BioLabs Inc.*). A reação foi realizada utilizando 3 μl do tampão comercial concentrado 10X (50 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT); 1 U da enzima de restrição; 6,5 μl de água estéril e 20 μl do produto de PCR, seguido de incubação a 37°C por 8 horas. Indivíduos com genótipo selvagem (CC) apresentam o fragmento original de 198pb; o genótipo heterozigoto (CT) apresenta três fragmentos de 198pb, 175pb e 23pb; o genótipo homozigoto (TT) apresenta fragmentos de 175 e 23pb.

Investigação do Polimorfismo A1298C no Gene da Enzima MTHFR

A reação de PCR para esse polimorfismo foi realizada utilizando tampão composto por 200 mM de Tris-HCl; 3,0 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) na concentração de 200 μM ; 12,5 $\mu moles$ de cada primer sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase (Invitrogen)*, em volume final de 50 μL . Para a amplificação do fragmento, a reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 40 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos, obtendo-se um produto final de 163 pares de bases (pb).

Protocolo para RFLP para o Polimorfismo A1298C

A digestão do produto de PCR foi realizada utilizando 3 μl do tampão comercial concentrado 10X; 3 U da enzima de restrição *Mbo II (New England BioLabs Inc.)*; 6,7 μl de água estéril e 20 μl do produto de PCR e incubação a 37°C por 8 horas. Indivíduos com genótipo selvagem (AA) apresentam fragmentos de 56 e 31pb; o genótipo heterozigoto (AC) apresenta fragmentos de 84pb, 56pb e 31pb; o genótipo homozigoto (CC) apresenta fragmentos de 84 e 31pb.

Investigação do Polimorfismo A2756G no Gene da Enzima MS

A reação de PCR foi realizada utilizando tampão composto de 200 mM de Tris-HCl; 2,6 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) na concentração de 200 μM ; 12,5 pmoles de cada oligonucleotídeo sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen*), no volume final de 50 μL . Para a amplificação do fragmento, a reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos, obtendo-se o produto final de 189 pb.

Protocolo para RFLP para o Polimorfismo A2756G

A digestão do produto da reação de PCR foi realizada utilizando-se 2 μl do tampão comercial concentrado 10X (100mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 100mM $MgCl_2$ e 10mM DTT); 2 U da enzima de restrição *Hae* III (PROMEGA); 0,2 μl de BSA 10X; 7,6 μl de água estéril e 10 μl do produto de PCR e incubação de incubação a 37°C por 8 horas. Indivíduos com genótipo selvagem (AA) apresentam fragmento original de 189pb; o genótipo heterozigoto (AG) apresenta fragmentos de 189pb, 159pb e 30pb; o genótipo homozigoto (GG) apresenta fragmentos de 159 e 30pb.

Investigação do Polimorfismo 844ins68 no Gene da Enzima CBS

A técnica de PCR foi realizada utilizando-se tampão composto por 200 mM de Tris-HCl; 2,0 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) na concentração de 200 μM ; 12,5 pmoles de cada primer sintético e 2,5 U da enzima *Taq DNA Polimerase (Invitrogen)*, no volume final de 50 μL . Para a amplificação do fragmento, a reação foi incubada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos, obtendo-se um fragmento de 282 pb nos indivíduos com o genótipo selvagem; dois fragmentos, sendo um de 350 pb e 282 pb nos indivíduos heterozigotos e um fragmento de 350 pb nos indivíduos homozigotos para o polimorfismo.

5.3 Dosagem Bioquímica

Determinação dos Níveis Séricos de Homocisteína

As dosagens de homocisteína foram realizadas pelo método de quimioluminescência através do aparelho IMMULITE 2000, utilizando o kit comercial da DPC. A amostra de soro foi pré-tratada com o S-adenosil-L-homocisteína (SAH) hidrolase e ditriotreitól (DTT) num tubo de reação sem esfera. Após 30 minutos de incubação, a amostra tratada foi transferida para um segundo tubo de reação contendo uma esfera polistireno revestida com SAH e anticorpo específico para SAH marcado com fosfatase alcalina. Durante os 30 minutos de incubação, a SAH convertida na amostra previamente tratada compete com a SAH imobilizada pela ligação ao anticorpo

anti-SAH marcado com fosfatase alcalina. O conjugado enzimático não ligado é removido pela lavagem e após centrifugação foi adicionado o substrato e realizado a leitura óptica.

Determinação dos Níveis Séricos de Vitamina B₁₂

A quantificação da vitamina B₁₂ foi realizada pelo método de imunoenensaio por imunoquimioluminescência de competição. As análises foram realizadas no aparelho *Access 2 Immunoassay System (Beckman Couter, CA – USA)* utilizando o kit comercial para determinação de vitamina B₁₂, em sistema totalmente automático com precisão <12% CV. A amostra de soro foi misturada a solução reagente contendo ditriotreitol (DTT) e solução de hidróxido de sódio com cianeto de sódio; a reação foi incubada a 36,5° C por cinco minutos, para a formação de cianocobalamina. A mistura de reação foi adicionado o tampão de neutralização e micropartículas recobertas com complexos anti-fator intrínseco Mab e conjugado de fosfatase alcalina e fator intrínseco de porco, seguida de incubação a 36,5° C por 20 minutos. Após três lavagens, o substrato foi adicionado e incubado por 5 min, com posterior leitura quantitativa.

Determinação dos Níveis Séricos de Folatos

A quantificação dos níveis de folato foi realizada pelo método de imunoenensaio por imunoquimioluminescência de competição. As análises foram realizadas no aparelho *Access 2 Immunoassay System (Beckman Couter, CA – USA)* utilizando o kit comercial para determinação de folatos, em sistema totalmente automático com precisão <15% CV. A amostra de soro foi misturada a solução de ascorbato de sódio com ácido

hidroclorídrico e o conjugado fosfatase alcalina – ácido fólico; seguido de incubação a 36,5° C por 10 minutos. Após incubação foi adicionada à mistura, solução de K₃PO₄ e proteína ligadora de folato do leite e micropartículas recobertas com complexos anti-fator intrínseco Mab, e incubação a 36,5° C por 15 minutos. Após três lavagens, o substrato foi adicionado e incubado por 5 min, com posterior leitura de reação.

5.4 Coleta dos Dados Clínicos

Os dados clínicos e demográficos das mulheres que formaram o grupo teste o controle foram obtidos a partir de entrevista e análise dos prontuários médicos hospitalares.

5.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas em banco de dados criado no "*software*" EPI-INFO versão 6.04, utilizando os testes do qui-quadrado (χ^2), Kruskal-Wallis e o teste de Fisher, este último quando a amostragem foi menor que cinco. As análises de regressão linear foram realizadas através do programa SPSS 9.0. O valor de *p* considerado como limite de significância estatística foi de $\leq 0,05$ (5%), relativo à probabilidade do erro tipo I (erro α).

6. Resultados

O grupo de pacientes apresentou média de idade de 29,4 (\pm 5,4) anos, com idade mínima de 17 anos e máxima de 40 anos. O grupo controle apresentou média de 23,1 (\pm 5,5) anos, variando de 13 a 38 anos.

O número médio de perdas no grupo foi de 3,25 (\pm 1,9), variando de 2 a 13, sendo que 41 (47,1%) mulheres tiveram duas perdas, 25 (28,7%) tiveram três perdas e 21 (24,2%) tiveram mais de três perdas (Tabela 1). As mulheres do grupo controle não apresentaram história de perdas gestacionais.

Tabela 1. Número de perdas fetais ocorridas no grupo de mulheres com história de perdas recorrentes.

Nº de Perdas	(n)	%
2	41	47,1
3	25	28,7
4	8	9,2
5	3	3,4
6	3	3,4
7	2	2,3
8	3	3,4
10	1	1,1
13	1	1,1
Total	87	100

O período das perdas foi dividido em primeiro, segundo, terceiro trimestres de gestação e misto, quando havia interseção entre os períodos. Vinte e nove mulheres (33,3%) tiveram perdas que aconteceram no 1º trim. de gestação; 22 (25,3%) no segundo; oito (9,2%) no terceiro e 28 (32,3%) apresentaram perdas mistas, como demonstrado na Tabela 2.

A idade média na qual ocorreu a primeira perda foi de 22,9 (\pm 5,2) anos. A frequência mais elevada ocorreu aos 18 anos com 10 (11,5%) mulheres tendo seu primeiro aborto nesta idade, seguido da idade de 22 anos com 9 (10,3%) mulheres. As idades variaram de 15 a 37 anos.

Tabela 2. Distribuição dos períodos de gestação onde ocorreram as perdas.

Período		
	(n)	%
1° Trimestre	29	33,3
2° Trimestre	22	25,3
3° Trimestre	8	9,2
Misto	28	32,2
Total	87	100

Do total de 47 mulheres com história de perdas, 26 (55,3%) estavam grávidas no momento da consulta médica e entrevista.

Foi também investigado no grupo dessas mulheres a presença de patologias obstétricas como pré-eclâmpsia e incompetência istmo-cervical (IIC). Quatro delas (8,5%) já haviam apresentado pré-eclâmpsia alguma vez; cinco (10,6%) apresentavam quadro de IIC e uma (2,1%) já havia apresentado ambos. Dessas mulheres, sete (15,2%) eram hipertensas. No grupo controle, oito (5,3%) mulheres haviam apresentado quadro de pré-eclâmpsia alguma vez.

Quanto aos hábitos, no grupo de mulheres com história de aborto recorrente, uma (2,1%) mulher relatou ser fumante, 20 (42,6%) delas faziam uso de alguma bebida alcoólica, fora da gravidez e em pouca quantidade, uma vez por semana. No grupo controle, das 150 mulheres, 19 (12,6%) relataram ser fumantes, sendo estatisticamente

significante a comparação entre o grupo teste ($p=0,025$); 26 (17,3%) delas faziam uso de bebidas alcoólicas durante a gravidez.

5.1 Investigação dos polimorfismos gênicos da MTHFR, metionina sintase e cistationina beta-sintetase

As Figuras de 2 a 5 apresentam géis de poliacrilamida ou agarose demonstrando a pesquisa dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR, A2756G na MS e 844ins68 na CBS, respectivamente.

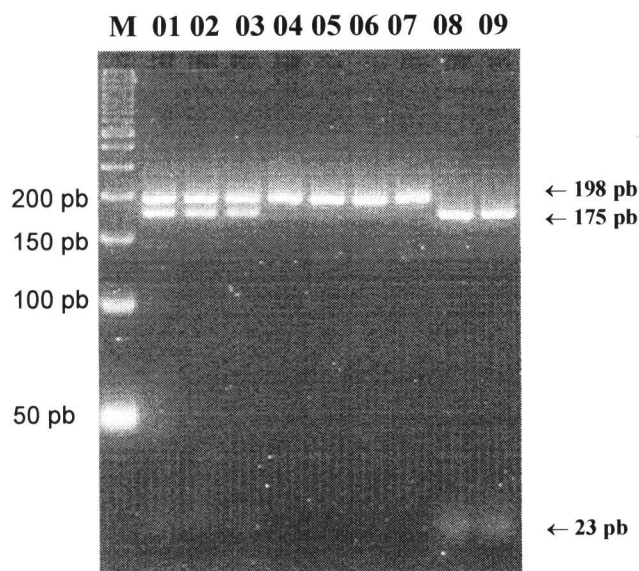


Figura 02. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo C677T no gene da enzima metilenotetrahydrofolato redutase, utilizando a enzima de restrição *Hinf* I. Posições de 01 a 03 – indivíduos heterozigotos (CT); posições de 04 a 07 – indivíduos com genótipo selvagem (CC); e posições 08 e 09 – indivíduos homozigotos (TT). M = marcador de 50pb.

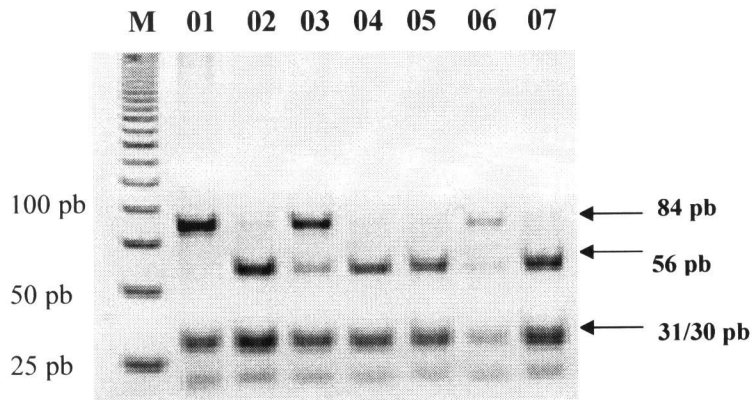


Figura 03. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo A1298C no gene da enzima MTHFR, utilizando a enzima de restrição *Mbo* II. Posição 01 – indivíduo homozigoto (CC); posições 03 e 06 – indivíduos heterozigotos (AC); posições 02, 04, 05, 07 – indivíduos com genótipo selvagem (AA). M= marcador de 25pb.

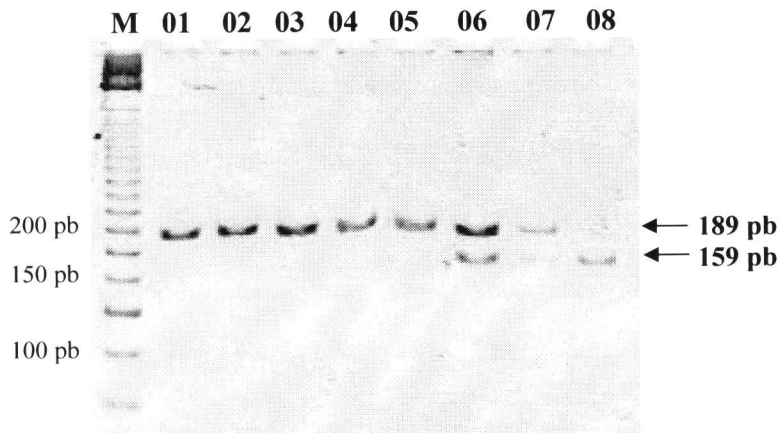


Figura 04. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo A2756G no gene da enzima metionina sintase, utilizando a enzima de restrição *Hae* III. Posições de 01 a 05 – indivíduos com genótipo selvagem (AA); posições 06 e 07 – indivíduos heterozigotos (AG); posição 08 – indivíduo homozigoto (GG). M= marcador de 25pb.

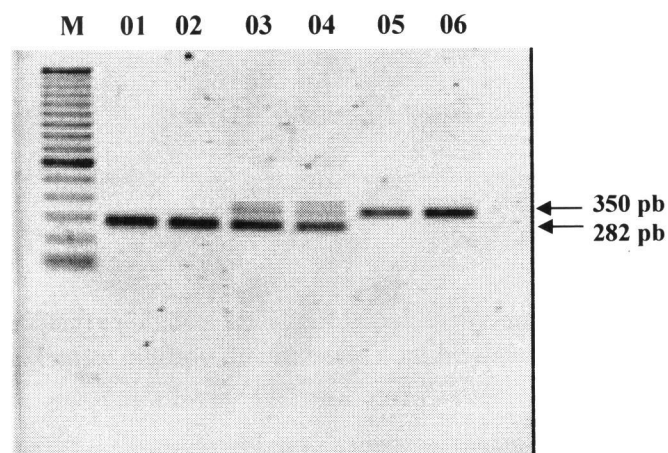


Figura 05. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrando os fragmentos obtidos no PCR para o polimorfismo 844ins68 no gene da enzima cistationina beta-sintetase. Posições de 01 a 02 – indivíduos com genótipo selvagem; posições 03 e 04 – indivíduos heterozigotos; posições 05 e 06 – indivíduos homozigoto. M= marcador de 100pb.

A investigação do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR no grupo de 89 mulheres com história de perdas fetais recorrentes demonstrou freqüência de 66,3 % (59/89) para o genótipo selvagem (CC); 29,2% (26/89) para o genótipo heterozigoto (CT) e 4,5% (4/89) para o genótipo homozigoto (TT), apresentando freqüência do alelo mutante de 19,1%. O grupo composto de 150 indivíduos controle apresentou freqüências de 31,3% (47/150) e 4% (6/150) para os genótipos heterozigotos (CT) e homozigotos (TT), respectivamente, e freqüência alélica de 19,6%.

O polimorfismo A1298C no gene da enzima MTHFR foi investigado no grupo das mulheres com história de perdas, com freqüências de 64% (57/89) para o genótipo selvagem (AA); 30,3% (27/89) para o genótipo heterozigoto (AC) e 5,6% (5/89) para os homozigotos (CC); com freqüência alélica de 20,8%. As freqüências apresentadas pelo

grupo controle foram de 41,3% (62/150) para os heterozigotos e 5,3% (8/150) para os homozigotos, com freqüência alélica de 26%.

A análise estatística da distribuição da freqüência dos alelos mutantes dos polimorfismos C677T e A1298C da MTHFR entre os grupos estudados não demonstrou diferença significativa ($p > 0,899$ e $p > 0,392$, respectivamente), como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição das freqüências alélicas dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR entre o grupo de mulheres com história de perdas recorrentes e controle.

Alelos	Casos		Controles		p
	(n)	%	(n)	%	
<i>C677T</i>					
Mutante (T)	34	19,1	59	19,6	NS
Selvagem (C)	144	80,9	241	80,4	
<i>A1298C</i>					
Mutante (C)	37	20,8	78	26	NS
Selvagem (A)	141	79,2	222	74	
Total	178	100	300	100	

NS – Não significativo

A investigação do polimorfismo A2756G no gene da enzima MS apresentou freqüência de 14,2% para o alelo mutante (G) no grupo de mulheres com história de perdas gestacionais; o genótipo selvagem (AA) foi encontrado em 73,9% (65/88); o heterozigoto (AG) em 23,9% (21/88) e o homozigoto (GG) em 2,3% (2/88). O grupo controle apresentou freqüências de 33,3% (50/150) e 5,3% (8/150) para os genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente, com freqüência de 21,9% para o alelo mutante (G).

O polimorfismo 844ins68 no gene da enzima CBS foi também investigado no grupo das mulheres com história de abortos, apresentando 70,5% (62/88) do genótipo selvagem; 26,1% (23/88) do genótipo heterozigoto; 3,4% (3/88) do genótipo

homozigoto, com frequência alélica de 16,4%. No grupo controle as frequências foram de 26,6% (40/150) para os heterozigotos; 4,7% (7/150) para os homozigotos, com frequência alélica de 18%.

A análise estatística não demonstrou diferença significativa entre as frequências alélicas dos polimorfismos A2756G e 844ins68 entre os dois grupos estudados (Tabela 4)

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos A2756G no gene da enzima MS e 844ins68 no gene da enzima CBS entre os grupos de mulheres com história de perdas recorrentes e controle.

Alelos	Casos		Controles		p
	(n)	%	(n)	%	
<i>A2756G</i>					
Mutante (G)	25	14,2	66	21,9	NS
Normal (A)	151	85,8	110	78,1	
<i>844ins68</i>					
Mutante	29	16,4	54	18	NS
Normal	147	83,6	122	82	
Total	176	100	176	100	

NS – Não significativo

As frequências genóticas dos polimorfismos gênicos investigados no grupo das mulheres com história de perdas gestacionais estão resumidas na Tabela 5, e as frequências para o grupo controle na Tabela 6.

Tabela 5. Distribuição das frequências genóticas dos polimorfismos nos genes das enzimas MTHFR, MS e CBS no grupo de mulheres com história perdas recorrentes.

	Selvagem (%)	Heterozigoto (%)	Homozigoto (%)	Total
C677T – MTHFR	59 (66,3) /CC	26 (29,2) /CT	4 (4,5) /TT	89
A1298C – MTHFR	57 (64) /AA	27 (30,4) /AC	5 (5,6) /CC	89
A2756G – MS	65 (73,9) /AA	21 (23,9) /AG	2 (2,3) /GG	88
844ins68 – CBS	62 (70,5) /SS	23 (26,1) /SI	3 (3,4) /II	88

S= selvagem; I= inserção

Tabela 6. Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes das enzimas MTHFR, MS e CBS no grupo controle composto por mulheres com história de gestação bem sucedida.

	Selvagem (%)	Heterozigoto (%)	Homozigoto (%)	Total
C677T – MTHFR	97 (64,7) /CC	47 (31,3) /CT	6 (4) /TT	150
A1298C – MTHFR	80 (53,4) /AA	62 (41,3) /AC	8 (5,3) /CC	150
A2756G – MS	92 (61,4) /AA	50 (33,3) /AG	8 (5,3) /GG	150
844ins68 – CBS	103 (68,7) /SS	40 (26,6) /SI	7 (4,7) /II	150

S= selvagem; I= inserção

A distribuição das frequências alélicas dos quatro polimorfismos investigados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Apesar de raro na literatura, o heterozigoto duplo para os polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR foi encontrado neste estudo, com frequências de 8% nas pacientes com história de perdas fetais e de 10,3% nos controles. A distribuição das frequências do genótipo heterozigoto duplo não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparados os casos e controles ($p > 7,11$).

Os polimorfismos investigados neste estudo foram associados ao período de gestação, em trimestre, quando ocorreram as perdas fetais. A análise desta associação para o polimorfismo C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR e o polimorfismo A2756G no gene da enzima MS, estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significantes nas análises estatísticas para os três polimorfismos investigados.

Tabela 7. Distribuição das freqüências genótípicas do polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR e período das perdas fetais no grupo de mulheres com história de perdas recorrentes.

Período das perdas	Genótipo do polimorfismo C677T			Total
	Selvagem /CC (%)	Heterozigoto/CT (%)	Homozigoto /TT (%)	
1° Trimestre	17 (58,6)	11(37,9)	1 (3,4)	29
2° Trimestre	15 (68,1)	5 (22,7)	2 (9)	22
3° Trimestre	5 (62,5)	3 (37,5)	0	8
Misto	20 (71,4)	7 (25)	1 (3,5)	28
Total	57 (65,5)	26 (29,8)	4 (4,6)	87

$$\chi^2 = 3,26$$

$$p = 0,775$$

Tabela 8. Distribuição das freqüências genótípicas do polimorfismo A1298C no gene da enzima MTHFR e período das perdas fetais no grupo de mulheres com história de perdas recorrentes

Período das perdas	Genótipo do polimorfismo A1298C			Total
	Selvagem /AA (%)	Heterozigoto /AC (%)	Homozigoto /CC (%)	
1° Trimestre	17(58,3)	12 (41,3)	0	29
2° Trimestre	14 (63,6)	7 (31,8)	1 (4,5)	22
3° Trimestre	6 (75)	0	2 (2,5)	8
Misto	19 (67,8)	7 (25)	2 (7,1)	28
Total	56 (64,3)	26 (29,8)	5 (5,7)	87

$$\chi^2 = 11,24$$

$$p = 0,0811$$

Tabela 9. Distribuição das freqüências genótípicas do polimorfismo A2756G no gene da enzima MS e período das perdas fetais no grupo de mulheres com história de perdas recorrentes

Período das perdas	Genótipo do polimorfismo A2756G			Total
	Selvagem /AA (%)	Heterozigoto /AG (%)	Homozigoto /GG (%)	
1° Trimestre	18 (64,2)	8 (28,5)	2 (7,1)	28
2° Trimestre	16 (72,7)	6 (27,2)	0	22
3° Trimestre	7 (87,5)	1 (12,5)	0	8
Misto	23 (82,1)	5 (17,8)	0	28
Total	64 (74,4)	20 (23,2)	2 (2,3)	86

$$\chi^2 = 6,19$$

$$p = 0,402$$

A análise do polimorfismo 844ins68 no gene da enzima CBS e o período de gestação em que ocorreram as perdas fetais demonstrou diferença significativa (Tabela 10), sugerindo a frequência mais elevada de homozigotos para este polimorfismo entre as mulheres com história de perdas no terceiro trimestre de gestação.

Tabela 10. Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo 844ins68 no gene da enzima CBS e período das perdas fetais no grupo de mulheres com história de perdas recorrentes.

Período das perdas	Genótipo do polimorfismo 844ins68			Total
	Selvagem (%)	Heterozigoto (%)	Homozigoto (%)	
1º Trimestre	22 (78,5)	6 (21,4)	0	28
2º Trimestre	16 (72,2)	6 (27,2)	0	22
3º Trimestre	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25)	8
Misto	19 (67,8)	8 (28,5)	1 (3,5)	28
Total	62 (72)	21 (24,5)	3 (3,5)	86

$$\chi^2 = 13,53$$

$$p = 0,0353$$

Quando avaliamos os indivíduos portadores do genótipo heterozigoto duplo para os polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR e o período de gestação, onde ocorreram os abortos, não foi encontrada associação estatística (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição dos períodos das perdas fetais e a ocorrência de heterozigose dupla dos alelos 677CT / 1298AC no gene da enzima MTHFR no grupo de mulheres com história de perdas recorrentes.

Período das perdas	Dupla Heterozigose (CT/AC)		Total
	Sim (%)	Não (%)	
1º Trimestre	4 (14,2)	24 (85,7)	28
2º Trimestre	1 (4,5)	21 (95,5)	22
3º Trimestre	0	8 (100)	8
Misto	2 (7,2)	26 (92,8)	26
Total	7 (8,2)	79 (91,8)	86

$$\chi^2 = 2,54$$

$$p = 0,467$$

A dosagem bioquímica para a homocisteína foi realizada em 47 mulheres com história de perdas fetais e 47 controles. Os valores de referência para a homocisteína é de 4 a 10 $\mu\text{mol/L}$; >3 ng/mL para folatos e 223 a 1132 pg/mL para a vitamina B_{12} .

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente, não tendo sido encontrada diferença entre os níveis de homocisteína e a presença dos polimorfismos investigados nos dois grupos.

Tabela 12. Níveis séricos de homocisteína (umol/L), no grupo de mulheres com história de perdas fetais, e a distribuição entre os diversos polimorfismos gênicos investigados.

Polimorfismos	Genótipos			
	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	p
<i>MTHFR</i>				
C677T	(35/46) $4,85 \pm 1,53$	(9/46) $4,80 \pm 2,53$	(2/46) $4,65 \pm 0,91$	0,9695*
A1298C	(27/46) $4,77 \pm 1,15$	(15/46) $5,22 \pm 2,04$	(4/46) $3,80 \pm 0,76$	0,235**
<i>MS</i>				
A2756G	(37/46) $4,85 \pm 1,6$	(8/46) $4,55 \pm 0,99$	(1/46) 6,20	0,455*
<i>CBS</i>				
844ins68	(39/46) $4,91 \pm 1,55$	(7/46) $4,35 \pm 1,15$	-	0,443*

* Kruskal-Wallis

**Anova

Tabela 13. Níveis séricos de homocisteína (umol/L), no grupo controle constituído por mulheres sem história de perdas fetais, e a distribuição entre os diversos polimorfismos gênicos investigados.

Polimorfismos	Genótipos			
	Selvagem	Heterozigoto	Homozigoto	p
<i>MTHFR</i>				
C677T	(29/47) $6,25 \pm 2,38$	(17/47) $5,76 \pm 2,15$	(1/47) 11,2	0,227*
A1298C	(31/47) $6,14 \pm 2,36$	(14/47) $6,36 \pm 2,6$	(2/47) $5,60 \pm 2,26$	0,898*
<i>MS</i>				
A2756G	(32/47) $6,24 \pm 2,48$	(14/47) $6,25 \pm 2,21$	(1/47) 3,7	0,350*
<i>CBS</i>				
844ins68	(29/47) $6,01 \pm 2,24$	(16/47) $6,36 \pm 2,39$	(2/47) $7,21 \pm 5,65$	0,8671*

* Kruskal-Wallis

Os níveis séricos de vitamina B₁₂ e folatos foram investigados no grupo de mulheres com história de perdas fetais. A análise dos níveis destes nutrientes entre os diversos genótipos encontrados entre os polimorfismos investigados não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂ e folatos entre os diferentes genótipos encontrados nos polimorfismos gênicos das enzimas investigadas no grupo de mulheres com história de perdas fetais.

Polimorfismos	Níveis Séricos	
	Vitamina B12 (pg/mL)	Folato (ng/mL)
C677T		
<i>Selvagem</i>	(35/46) 520,65 ± 279,74	(35/46) 9,84 ± 3,42
<i>Heterozigoto</i>	(9/46) 467,88 ± 351,61	(9/46) 8,52 ± 2,47
<i>Homozigoto</i>	(2/46) 436,50 ± 294,86	(2/46) 15,18 ± 6,8
	<i>p</i> = 0,672*	<i>p</i> = 0,052**
A1298C		
<i>Selvagem</i>	(27/46) 557,70 ± 314,57	(27/46) 10,06 ± 3,70
<i>Heterozigoto</i>	(16/46) 458,87 ± 244,41	(16/46) 9,32 ± 3,49
<i>Homozigoto</i>	(3/46) 302,33 ± 181,47	(3/46) 10,27 ± 3,09
	<i>p</i> = 0,288*	<i>p</i> = 0,789*
A2756G		
<i>Selvagem</i>	(36/46) 511,35 ± 298,53	(36/46) 9,79 ± 3,34
<i>Heterozigoto</i>	(9/46) 433,11 ± 210,58	(9/46) 10,47 ± 4,29
<i>Homozigoto</i>	(1/46) 999,9	(1/46) 4,89
	<i>p</i> = 0,30*	<i>p</i> = 0,218*
844ins68		
<i>Selvagem</i>	(38/46) 503,20 ± 297,86	(38/46) 9,79 ± 3,67
<i>Heterozigoto</i>	(8/46) 523,12 ± 262,30	(8/46) 9,92 ± 3,06
<i>Homozigoto</i>	-	-
	<i>p</i> = 0,673*	<i>p</i> = 0,093**

* Kruskal-Wallis

** Anova

A análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e homocisteína mostrou uma correlação negativa entre esses nutrientes, $p=0,036$ (Figura 2). A regressão linear não foi estatisticamente significativa quando comparados os níveis vitamina B₁₂ e homocisteína, $p=0,584$ (Figura 3).

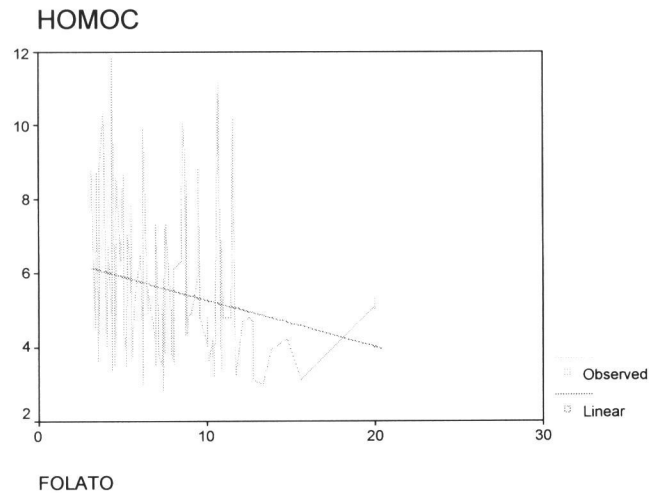


Figura 2. Análise de regressão linear dos níveis séricos de folato e homocisteína nos grupos de estudo e controle ($p=0,036$).

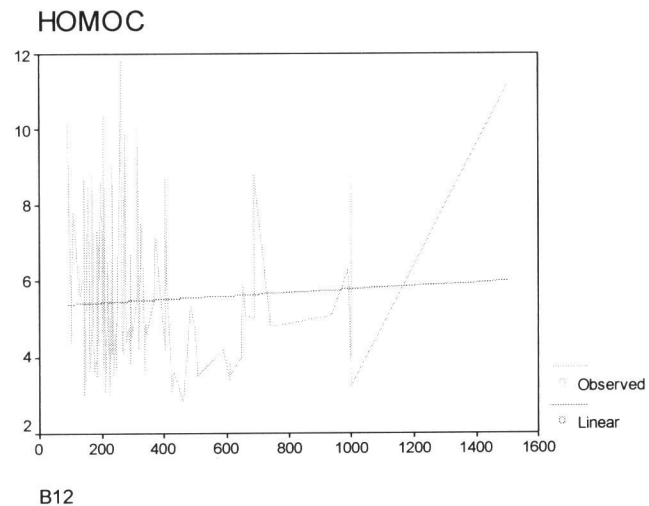


Figura 3. Análise de regressão linear dos níveis séricos de vitamina B₁₂ e homocisteína nos grupos de estudo e controle ($p=0,584$).

7. DISCUSSÃO

A investigação de fatores de risco para a ocorrência de perdas fetais recorrentes é de grande valor para a melhor compreensão acerca deste problema, uma vez que não há comprovação científica da etiologia em 50% dos casos. Este estudo foi realizado no sentido de avaliar uma possível influência dos polimorfismos em genes responsáveis pela síntese de enzimas envolvidas no metabolismo da homocisteína, vitamina B₁₂ e ácido fólico e antecedentes de perdas fetais recorrentes.

O grupo de pacientes com história de perdas fetais foi composto de mulheres com no mínimo duas ocorrências de interrupção espontânea em várias fases da gestação. Essas mulheres apesar de terem um acompanhamento médico constante e realizarem exames específicos, elas não conseguiram sucesso na gravidez, até o momento. Não foram excluídas as mulheres com outros fatores de risco já conhecidos, como hipertensão, incompetência istmo-cervical, pré-eclâmpsia; esta escolha foi realizada para evitar possíveis tendências nos resultados. Porém, todas as pacientes foram pesquisadas quanto a existência de anticorpos antifosfolípides, com ausência desta patologia em todas. Não foram incluídos como perdas fetais, gravidez ectópica ou molar.

A definição clássica de perdas fetais recorrentes pela literatura é a história de três ou mais perdas gestacionais (Salat-Baroux, 1998). No nosso estudo, optamos pela seleção de mulheres com no mínimo duas perdas em qualquer período de gestação. Seguimos este critério no sentido de aumentar a confiabilidade do estudo com um maior número de participantes e podermos investigar a influência dos polimorfismos em todo o período da gestação. Outros trabalhos também adotaram o mínimo de dois abortos espontâneos como critério de inclusão (Nelen *et al.*, 1997; Nelen *et al.*, 2000).

O grupo controle foi composto por 150 mulheres que tiveram pelo menos uma gestação bem sucedida e que não possuíam histórico de perdas fetais. Os grupos de pacientes e controles foram pareados quanto a classe social, os indivíduos de ambos foram provenientes de hospitais públicos, e dentro de uma mesma faixa etária em idade fértil. A média de idade do grupo das pacientes e controles foi de 29,4 e 23,1 anos, respectivamente. Essas medidas de adequação dos grupos são importantes pois minimizam as interferências ambientais, uma vez que neste estudo, existe um foco nutricional que pode estar fortemente ligado a razões sociais; além de minimizar resultados alterados devido a idade das pacientes, já que a idade é um fator importante na fertilidade das mulheres.

O polimorfismo C677T no gene da enzima MTHFR predispõe ao desenvolvimento de hiperhomocisteinemia e foi primeiramente relacionado com problemas cardiovasculares prematuros (Frosst *et al.*, 1995). Alguns trabalhos têm demonstrado associação deste polimorfismo a história de abortos recorrentes, mostrando inclusive um risco de três vezes para a ocorrência de aborto em portadoras deste polimorfismo quando comparada a um grupo controle (Nelen *et al.*, 1997; Unfried *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Mtiraoui *et al.*, 2006). Neste estudo, não encontramos diferença estatisticamente significativa para a frequência alélica do polimorfismo C677T entre as pacientes e os controles, sendo que estes resultados concordam com Foka *et al.* (2000) e Pihusch *et al.* (2001). As frequências da mutação C677T descritas para o grupo de mulheres com história de perdas fetais, neste estudo, foram de 66,3% para o genótipo selvagem; 29,2% para os heterozigotos e 4,5% para os homozigotos, sendo que estas frequências diferem de trabalhos como o de Nelen *et al.* (1997) que encontraram 43% e 16% dos genótipos heterozigotos e homozigotos, respectivamente, em um grupo de 185 mulheres com história de perdas fetais provenientes da Holanda. Unfried *et al.* (2002)

encontraram 34,6% de heterozigotos e 17,3% de homozigotos em 133 mulheres na Áustria. Vale ressaltar que a diferença entre a presença do alelo T e genótipo homozigoto mutante encontrado no presente trabalho, em relação aos estudos citados, pode está relacionado à variação mundial deste polimorfismo nas diferentes populações em grupos raciais, uma vez que este polimorfismo é mais freqüente em caucasóides e diminuída em populações afro-descendentes (Fletcher & Kessling, 1998). A população de Salvador – BA tem um componente genético negróide dominante, principalmente nas classes sociais menos favorecidas, o que pode explicar a freqüência diminuída deste polimorfismo na população e a não associação com a patogênese das perdas fetais. Couto *et al.* (2004) em estudo que investigou a freqüência do polimorfismo C677T em 843 recém-nascidos da cidade de Salvador, o que corresponde a uma amostra populacional, descreveram a freqüência alélica de 23,4% para o alelo T, sendo 36,2% dos indivíduos heterozigotos e 5,3% homozigotos, ratificando a freqüência diminuída deste polimorfismo em relação a populações caucasóides.

O outro polimorfismo no gene da MTHFR investigada foi a A1298C. Este polimorfismo é responsável pela troca de um resíduo de glutamato para alanina no domínio regulatório da enzima e está relacionada à diminuição da atividade enzimática, porém, isoladamente, não parece elevar os níveis de homocisteína (Weisberg *et al.*, 1998). Mtiraoui *et al.* (2006) encontraram associação entre o polimorfismo A1298C e perdas fetais recorrentes, independente dos níveis de homocisteína. O nosso estudo não demonstrou tal associação, não encontrando significância estatística para a freqüência deste polimorfismo entre as pacientes e controles. Nosso estudo está de acordo com Hohlagschwandtner *et al.* (2003), que também não encontraram associação entre aborto e o alelo A1298C. Por não estar associado a elevação significativa de homocisteína

plasmática, o alelo A1298C por si só pode não estar relacionado à patogênese dos abortos, apesar de Mtiraoui *et al.* (2006) terem descrito a associação.

A ocorrência de heterozigose dupla para os alelos C677T e A1298C, produzindo o genótipo 677CT / 1298AC no gene da enzima MTHFR, está relacionada com a elevação nos níveis de homocisteína plasmática em comparação com cada alelo independente em heterozigose (van der Put *et al.*, 1998). As frequências de 8% nas pacientes com história de perdas fetais e de 10,3% nos controles, descritas neste estudo, não mostraram diferenças estatisticamente significantes quando realizada a comparação entre os casos e controles. Apesar de terem encontrado associação entre o polimorfismo A1298C da MTHFR em seu estudo, Mtiraoui *et al.* (2006) não demonstraram associação da presença de heterozigose dupla e aborto recorrente. Os dados da literatura referentes a esta associação são bastante escassos.

A maioria dos trabalhos na literatura tenta mostrar as conseqüências da hiperhomocisteinemia nos problemas relacionados a gravidez, nos quais, as perdas recorrentes estão incluídas. A pesquisa para os polimorfismos no gene da enzima MTHFR é bem conhecido e freqüente quando o assunto é metabolismo da homocisteína, porém outros polimorfismos presentes em genes responsáveis pela síntese de outras enzimas envolvidas no metabolismo são bem menos freqüentes em trabalhos relacionados a este tema. É o caso do polimorfismo A2756G no gene da enzima MS e 844ins68 no gene da enzima CBS. A pesquisa de deficiências em outras enzimas do ciclo, tais como a MS e CBS, é inteiramente justificada pelo fato de que o quadro de hiperhomocisteinemia pode ser originado também pela deficiência destas enzimas, podendo estar envolvidas como causa de abortos. Uma vez que esta associação está sendo aceita cada vez mais na literatura científica, a falta de informações sobre estes polimorfismos e sua associação como fatores de risco para a causa dos abortos

recorrentes, faz com que este estudo seja relevante para o entendimento mais detalhado deste problema em nossa população.

Nossa investigação para o polimorfismo A2756G não demonstrou associação significativa entre as frequências alélicas descritas para o grupo de pacientes e o grupo controle. As pacientes apresentaram frequências de 23,9% para heterozigose e 2,3% para homozigose. Em trabalho recente não relacionado a perdas fetais, Gemmati *et al.* (2004) descreveram frequências de 34,6% e 3,9% para os genótipos heterozigoto e homozigoto, respectivamente, em 257 indivíduos saudáveis da população italiana; no japão foram encontradas frequências de 26,5% para heterozigotos e 5,3% para homozigotos entre 132 indivíduos saudáveis (Ishikawa *et al.*, 2006).

Oitenta por cento das causas de homocisteinúria congênita (80%) são causadas por deficiências autossômicas recessivas no gene da CBS. As manifestações clínicas mais freqüentes desta deficiência incluem retardo mental, osteoporose, anormalidades esqueléticas, palidez e queda de cabelo (Quéré *et al.*, 1999). Pesquisamos o polimorfismo 844ins68 no gene desta enzima como um possível fator de risco genético para as perdas fetais, no entanto não houve diferença nas frequências gênicas entre casos e controle. Foram encontradas frequências de 26,1% e 3,4% para a heterozigose e homozigose, respectivamente, nas pacientes; e 26,6% e 4,7% para heterozigose e homozigose, respectivamente, nos controles, para este polimorfismo.

Franco *et al.* (1997), em São Paulo – Brasil, encontraram 16,8% de heterozigotos e 3% de homozigoto para o polimorfismo 844ins68 no gene da enzima CBS, considerando esta frequência elevada. As frequências alélicas na nossa população foram ainda maiores, confirmando o componente genético negróide, uma vez que este polimorfismo foi considerado por Pepe *et al.* (1999) um marcador antropogênico seguro para os dois maiores grupos humanos – Africanos e Asiáticos, sendo mais prevalente

em africanos, onde alcança frequência de 66,6% em heterozigose; e raro em asiáticos, não sendo encontrado no Japão, China e Indonésia (Pepe *et al.*, 1999). A inserção 844ins68 foi investigada como fator de risco para trombose arterial, com resultados controversos (Tsai *et al.*, 1996; Franco *et al.* 1997; Kluijtmans *et al.*, 1997); estudos relacionando perdas fetais com a inserção 844ins68 são raros na literatura, uma vez que estudos deste tipo não foram encontrados em nossa pesquisa bibliográfica.

A estratificação dos períodos de gravidez, nos quais ocorreram as perdas, nos permitiu observar uma possível associação entre a frequência dos polimorfismos em cada trimestre de gravidez. Neste estudo, encontramos uma diferença significativa na distribuição dos genótipos para a inserção 844ins68 no gene da enzima CBS, sendo que o encontro deste polimorfismo em homozigose ocorreu com mais frequência quando as perdas aconteceram no terceiro trimestre de gestação ($p= 0,035$), não sendo encontrado no primeiro nem o segundo trimestre. Devido à escassez de trabalhos na literatura acerca desta inserção em associação com perdas fetais recorrentes, não existem dados que possam estar em acordo ou desacordo com o encontrado. Porém, a influência da inserção 844ins68 que pode estar causando uma inviabilidade fetal e conseqüente óbito nos momentos finais da gestação, pode estar de acordo como o trabalho de Lindblad *et al.* (2005), que demonstraram uma associação significativa entre distúrbios no metabolismo da homocisteína, como a diminuição dos níveis de folato na circulação materno-fetal, com retardo no crescimento fetal intrauterino, no terceiro trimestre de gestação. Investigações a esse respeito devem ser conduzidas a fim de esclarecer estas questões.

As análises dos polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR e A2756G no gene da MS não demonstraram associação com os períodos gestacionais, onde ocorreram as perdas.

Em nosso estudo, foi estatisticamente significativa a maior frequência de mulheres que relataram ser fumantes no grupo controle em relação às mulheres com perdas fetais. Estas mulheres com história de abortos recorrentes são determinadas a terem uma gestação a termo, o que implica em maiores cuidados com a saúde, justificando a menor proporção de fumantes neste grupo.

Tendo em vista a gama enorme de fatores de riscos que podem estar envolvidos em história de abortos, é esperada a dificuldade em estudos de associação de fatores de riscos desconhecidos e sua relação com a ocorrência deste problema. Apesar das inúmeras causas já estabelecidas, caracterizando um problema multifatorial; cinquenta por cento dos abortos não têm causa definida, o que leva a um desgaste do médico e da paciente na tentativa de solucionar do caso.

A patogênese das perdas gestacionais recorrentes é complexa, visto que existe um envolvimento de diversos fatores genéticos e ambientais. Distúrbios no ciclo da homocisteína também podem ser causados pelo envolvimento de fatores genéticos e ambientais. Os níveis séricos deste aminoácido irão depender da atividade enzimática das enzimas MTHFR, MS e CBS, bem como da disponibilidade de tetrahydrofolato fornecido pelo metabolismo do ácido fólico, além da importância dos cofatores enzimáticos, vitamina B₁₂ e vitamina B₆, na funcionalidade do ciclo metabólico (Aubard *et al.* 2000). Essas interações levam a uma expressão fenotípica diferenciada dos polimorfismos genéticos nos genes das enzimas responsáveis pelo ciclo da homocisteína, podendo influenciar de forma diferenciada na ocorrência dos abortos.

Nos últimos anos, tem ganhado força a idéia de que a hiperhomocisteinemia está associada a complicações na gravidez, incluindo episódios de aborto espontâneo, (de la Calle *et al.*, 2003). No entanto, não existe um consenso quanto ao modo de ação da homocisteína em excesso e sua interferência nas perdas fetais. É sabido dos danos

vasculares causados por este aminoácido quando em excesso no organismo, tanto que a hiperhomocisteinemia foi primeiro relacionada a problemas cardiovasculares. A gestação em si depende de um conjunto vascular intrincado e voltado para o suprimento fetal, com troca de substâncias e gases, sendo que o feto depende integralmente destas trocas, e qualquer que seja o dano nesse sistema, afetará radicalmente a viabilidade da gestação. Estudos têm mostrado que danos nos vasos da placenta, causados pelo excesso de homocisteína, podem causar uma implantação ineficiente do embrião e estar associado a abortos, principalmente nos primeiros estágios da gestação (Nelen *et al.*, 2000; de la Calle *et al.*, 2003). Os danos vasculares causados pela hiperhomocisteinemia também podem ser mediados pela inativação do óxido nítrico, um potente vasodilatador (Lindblad *et al.*, 2005).

Por outro lado, o excesso de homocisteína materna também é citado como tendo um possível efeito tóxico direto ao feto, como demonstram alguns trabalhos experimentais (Aerts *et al.*, 1994; Rosenquist *et al.*, 1996), resultando em anormalidades e morte dos embriões. Essas anormalidades podem estar relacionadas à importância do metabolismo da homocisteína na síntese de nucleotídeos e metilação de compostos orgânicos. Uma vez que a elevação patológica dos níveis de homocisteína causa diminuição dos níveis de S-adenosilmetionina com conseqüente alteração no padrão de metilação no organismo, podemos imaginar as conseqüências disto para um embrião em processo de crescimento, onde genes são ativamente transcritos e outros bloqueados, expressando-se em outra fase do desenvolvimento, em processos minuciosamente coordenados pelo padrão de metilação, sendo que alterações nesta fase podem ter conseqüências catastróficas para o embrião. Além disso, outro fator patológico nos distúrbios do metabolismo da homocisteína pode ser a inibição da síntese de timina, um processo que utiliza o folato (5,10-metilenotetrahidrofolato) como cofator para esta

reação, que é depletado na presença de excesso de homocisteína devido a elevação na demanda de 5-metiltetrahydrofolato (Zetterberg, 2004). Este processo pode induzir uma incorporação de uracil, ao invés de timina, no DNA, o que pode causar danos genéticos como quebras cromossômicas, reações de excisão e reparo, e alterações no ciclo celular, conduzindo a ocorrência de apoptose e comprometendo o desenvolvimento celular do embrião.

Os níveis séricos de homocisteína no grupo teste e controle deste estudo não diferiram entre si quanto à presença dos polimorfismos investigados, inclusive quanto ao polimorfismo C677T no gene da MTHFR que está relacionado com a elevação nos níveis de homocisteína em portadores do genótipo homozigoto (TT). As mulheres com história de aborto recorrente investigadas no presente estudo não apresentaram deficiência de vitamina B₁₂ e folato, com médias acima dos valores de referência, sendo >3 ng/mL para folatos e 223 a 1132 pg/mL para a vitamina B₁₂. Os níveis de homocisteína são dependentes da disponibilidade de vitamina B₁₂ e folato. Tem sido proposto que a região alterada da enzima MTHFR pela mutação C677T é responsável pela ligação do folato, e que na presença deste substrato, a enzima pode ser estabilizada (Unfried *et al.*, 2002). O fato da não deficiência vitamínica nas pacientes do estudo, pode ter influenciado nos níveis de homocisteína, sem diferença significativa entre os portadores e não portadores das mutações.

A análise de regressão linear mostrou correlação significativa negativa entre os níveis séricos de folato e homocisteína, sugerindo que quanto mais elevados os níveis séricos de folato, menores serão os níveis de homocisteína. Este fato indica a dependência do folato na manutenção dos níveis séricos de homocisteína. O estudo realizado por Couto *et al.* (2006) também mostrou uma correlação negativa entre níveis

séricos de folato e homocisteína na população de Salvador-BA, confirmando nossos resultados.

Este trabalho teve o objetivo de investigar uma possível relação entre fatores envolvidos no metabolismo da homocisteína, vitamina B₁₂ e folato e perdas fetais recorrentes. Em nosso estudo, não houve diferença significativa na frequência dos polimorfismos investigados e níveis séricos de homocisteína, vitamina B₁₂ e folato entre mulheres com história de perdas e as do grupo controle. Deve-se levar em consideração o fato de que as diferenças culturais, sociais e nutricionais presentes em diferentes populações podem interferir em doenças cuja contribuição pode ser também nutricional. Isso explica o fato de alguns estudos demonstrarem associação entre os polimorfismos que levam a hiperhomocisteinemia e perdas fetais recorrentes, e outros falharem em demonstrar tal associação. Entretanto, dentro do grupo de pacientes, foi encontrado uma frequência elevada para a homozigose do polimorfismo 844ins68 em perdas ocorridas no terceiro trimestre de gestação. Estudos adicionais são necessários para a confirmação deste evento.

Torna-se importante a busca do conhecimento a respeito dos abortos recorrentes, uma vez que este problema pode afetar seriamente a saúde física e psicológica de mulheres que não conseguem levar uma gravidez a termo. Quanto maiores os esclarecimentos acerca deste problema, maior a possibilidade destas mulheres realizarem-se através da maternidade.

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, chegamos às seguintes conclusões:

- Os polimorfismos C677T e A1298C no gene da enzima MTHFR não foram associados a perdas fetais recorrentes no grupo de mulheres investigado;
- O polimorfismo A2756G no gene da enzima MS não apresentou associação a perdas fetais recorrentes no grupo de mulheres investigado;
- O polimorfismo 844ins68 no gene da enzima CBS não apresentou associação a perdas fetais recorrentes no grupo de mulheres investigado. Entretanto, foi encontrada associação ($p= 0,035$) do polimorfismo quando avaliado no grupo de mulheres com perdas fetais ocorridas no terceiro trimestre de gestação. Desta forma, estudos adicionais devem ser desenvolvidos, visando a confirmação deste achado;
- Os níveis séricos de homocisteína, vitamina B₁₂ e folatos não foram associados aos polimorfismos no grupo de mulheres investigado;
- Os níveis séricos de homocisteína são dependentes dos níveis de folato.

9. Referências

Aerts, L. A. G. J. M.; van Klaasboer, H. H.; Postma, N. S.; Pertijs, J. C. L. M.; Copius Peereboom, J. H. J.; Eskes T. K. A. B. Stereospecific in vitro embryotoxicity of L-homocysteine in pre and post-implantation rodent embryos. **Toxicol In Vitro**, **56**:154-7,1994.

Aubard, Y.; Darodes, N.; Cantaloube, M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy--review of our present understanding and therapeutic implications. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, **93**(2):157-65, 2000.

Barrios, M. F.; Hernández, I. G.; Gautier H. Vitamina B₁₂: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. Ver Cubana **Hematol Inmunol Hemoter.**, **15**: 159-74, 1999.

Bender D. A. Folic acid and others pterins and vitamins B₁₂. In: **Nutritional biochemistry of vitamins**. Cambridge University Press: 269-313, 1992.

Boushey, C. J.; Beresford, S. A.; Omenn, G. S.; Motulsky, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA.**, **274**(13):1049-57, 1995.

Boxmeer, J. C; Fauser, B. C; Macklon, N. S. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation. **Lancet** **368**(9531):200, 2006.

Burton, B. T.; Foster, W. R. The vitamins II: water soluble. In Human nutrition. **Formerly the Heinz Handbook of nutrition**. 4 ed. New York: McGraw!Hill Book Company: 122-31, 1988.

Caudill, M. A.; Wang, J. C.; Melnyk, S.; Pogribny, I. P.; Jernigan, S.; Collins, M. D.; Santos-Guzman, J.; Swendseid ME; Cogger, E.A.; James, S. J. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues

of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. **J Nutr.** **131**(11):2811-8, 2001.

Chen, J.; Stampfer, M. J.; Ma, J.; Selhub, J.; Malinow, M. R.; Hennekens, C. H.; Hunter, D. J. . Influence of a methionine synthase (D919G) polymorphism on plasma homocysteine and folate levels and relation to risk of myocardial infarction. **Atherosclerosis**, **154**:667-72, 2001.

Clarke, R.; Daly, L.; Robinson, K.; Naughten, E.; Cahalane, S.; Fowler, B.; Graham, I. 1991. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. **N Engl J Med.**; **324**(17):1149-55, 1991.

Costa, H.L.F.F. **Autoimunidade e perda conceptual**. Ribeirão Preto, 1994. [Tese - Doutorado - Universidade de São Paulo].

Couto, F. D.; Adorno, E. V.; Menezes, J. F.; Moura Neto, J. P.; Rego, M. A.; Reis, M. G.; Gonçalves, M. S. C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. **Cad Saude Publica.** **20**(2):529-33. 2004.

Couto, F. D.; Moreira, L. M.; dos Santos, D. B.; Reis, M. G.; Goncalves, M. S. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brazil. **Eur J Clin Nutr.** 2006. [in press] <http://www.nature.com/ejcn/index.html>

Crosignani, P. G.; Rubin, B .L. Recurrent spontaneous abortion. **Hum Reprod.**, **6**(4):609-10, 1991.

Cumming, A. M.; Olujohungbe, A.; Keeney, S.; Singh, H.; Hay, C.R.; Serjeant, G.R. The methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism in patients with homozygous sickle cell disease and stroke. **Br J Haematol.**, **107**(3):569-71, 1999.

de la Calle, M.; Usandizaga, R.; Sancha, M.; Magdaleno, F.; Herranz, A.; Cabrillo, E. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, **107**(2):125-34, 2003.

Dutta, S.; Sinha, S.; Chattopadhyay, A.; Gangopadhyay, P. K.; Mukhopadhyay, J.; Singh, M.; Mukhopadhyay, K. Cystathionine beta-synthase T833C/844INS68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children. **Behav Brain Funct.**, **1**:25, 2005.

Eberhardt, R. T.; Forgione, M. A.; Cap, A.; Leopold, J. A.; Rudd, M. A.; Trolliet, M.; Heydrick, S.; Stark R.; Klings, E. S.; Moldovan, N. I.; Yaghoubi, M.; Goldschmidt-Clermont, P. J.; Farber, H. W.; Cohen, R.; Loscalzo, J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. **J Clin Invest**;**106**(4):483-91, 2000.

Fang, J. Y.; Xiao, S. D.; Zhu, S. S.; Yuan, J. M.; Qiu, D. K.; Jiang, S. J. Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. **Gastroenterol.**, **32**(2):171-5, 1997.

Fletcher, O.; Kessling, A. M. MTHFR Association with arteriosclerotic vascular disease. **Hum. Genet.**, **103**: 11-21, 1998.

Foka, Z. J.; Lambropoulos, A. F.; Saravelos, H.; Karas, G. B.; Karavida, A.; Agorastos, T.; Zournatzi, V.; Makris, P. E.; Bontis, J. A. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. **Hum Reprod.** **15**(2):458-62, 2000.

Franco, R.; Maffei, F.; Lourenco, D.; Piccinato, C.; Morelli, V.; Thomazini, I.; Zago, M. The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine beta-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis. **Haematologica.**, **83**(11):1006-8, 1998.

Franco, R. F.; Trip, M. D.; ten Cate, H.; Prins, M. H.; Kastelein, J. J. P.; Reitsma, P. H. The prevalence of the 68-bp insertion in the cystathionine b-synthase gene in patients with premature arterial vascular disease: correlation with homocysteine levels and vitamin status. **Blood**, **671**:153a, 1997.

Frosst, P.; Blom, H. J.; Milos, R.. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.**, **10**: 111-113, 1995

Gemmati, D.; Ongaro, A.; Scapoli, GL.; Della Porta, M.; Tognazzo, S.; Serino, M. L.; Di Bona, E.; Rodeghiero, F.; Gilli, G.; Reverberi, R.; Caruso, A.; Pasello, M.; Pellati, A.; De Mattei, M. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, **13**(5):787-94, 2004.

George, L.; Mills, J. L.; Johansson, A. L.; Nordmark, A.; Olander, B.; Granath, F.; Cnattingius, S. Plasma folate levels and risk of spontaneous abortion. **JAMA**, **288**(15):1867-73, 2002.

Gillham, B.; Papachristodoulou, D. K.; Thomas, J. H. Wills': biochemical basis of medicine. 3. ed. Oxford: Reed Educational and Professional Publishing Ltd., Cap. 22, 196-202, 1997.

Girelli, D.; Frisco, S.; Trabetti, E.; Oliveiro, O.; Russo, C.; Pessetto, R.; Faccini, G.; Pignatti, P. F.; Mazzuco, A.; Corrocher, R. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary athero-sclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. **Blood**, **91**: 4158-4163, 1998.

Goddijn, M.; Leschot, N. J. Genetic aspects of miscarriage. **Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, **14**(5):855-65, 2000.

Goyette, P.; Sumner, J. S.; Milos, R.; Duncan, A. M.; Rosenblatt, D. S.; Matthews, R. G.; Rozen, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nat Genet.**, **7**(4):551, 1994.

Hague, W. M. Homocysteine and pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** 17(3):459-69, 2003.

Harger, J. H.; Archer, D. F.; Marchese, S. G.; Muracca-Clements, M.; Garver, K. L. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. **Obstet. Gynecol.**, 62:574-81, 1983.

Henriksen, T. B ; Hjollund, N. H.; Jensen, T. K.; Bonde, J. P.; Andersson, A. M.; Kolstad, H.; Ernst, E.; Giwercman, A.; Skakkebaek, N. E.; Olsen J. Alcohol consumption at the time of conception and spontaneous abortion. **Am J Epidemiol.**, 160(7):661-7, 2004.

Hohlagschwandtner, M.; Unfried, G.; Heinze, G.; Huber, J.C.; Nagele, F.; Tempfer, C. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. **Fertil Steril.** 79(5):1141-8, 2003.

Hutti, M. H. Social and professional support needs of families after perinatal loss. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.**; 34(5):630-8. 2005.

Ishikawa, H.; Ishikawa, T.; Miyatsu, Y.; Kurihara, K.; Fukao, A.; Yokoyama, K. A polymorphism of the methionine synthase reductase gene increases chromosomal damage in peripheral lymphocytes in smokers. **Mutat Res.**, 25:599(1-2):135-43, 2006.

Jacques, P. F.; Bostom, A. G.; Williams, R. R.; Ellison, R. C.; Eckfeldt, J. H.; Rosenberg, I. H.; Selhub, J.; Rozen, R.. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. **Circulation.**, 93(1):7-9, 1996.

Johansson, S.; Dencker, L.; Dantzer, V. Immunohistochemical localization of retinoid binding proteins at the materno-fetal interface of the porcine epitheliochorial placenta. **Biol Reprod.**, 64(1):60-8, 2001.

Kang, S. S.; Wong, P. W.; Zhou, J. M.; Cook, H. Y. Total homocyst(e)ine in plasma and amniotic fluid of pregnant women. **Metabolism.**, 35(10):889-91, 1986.

Kavalier, F. Investigation of recurrent miscarriages. **BMJ**, **331**:121–2, 2005.

Kim, N. K.; Choi, Y. K.; Kang, M. S.; Choi, D. H.; Cha, S. H.; An, M. O.; Lee, S.; Jeung, M.; Ko, J. J.; Oh D. 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, 2006.

Kluijtmans, L. A. J.; Boers, G. H. J.; Trijbels, F. J. M.; van Lith-Zanders, H. M. A.; van den Heuvel, L. P. W. J.; Blom H. J. A common 844ins68 insertion variant in the cystathionine b-synthase gene. **Biochem Mol Med.**, **62**:23-5, 1997.

Leclerc, D.; Campeau, E.; Goyette, P.; Adjalla, C. E.; Christensen, B.; Ross, M.; Eydoux, P.; Rosenblatt, D. S.; Rozen, R.; Gravel, R. A. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. **Hum Mol Genet.**, **5**(12):1867-74, 1996.

Lindblad, B.; Zaman, S.; Malik, A.; Martin, H.; Ekstrom, A. M.; Amu, S.; Holmgren, A.; Norman, M. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded fetuses. **Acta Obstet Gynecol Scand.**, **84**(11):1055-61, 2005.

Lopez-Quesada E. L.; Vilaseca, M. A.; Gonzalez, S. Homocysteine and pregnancy. **Med Clin (Barc).**, **115**(9):352-6, 2000.

Mattson, M. P.; Shea, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends Neurosci.**, **26**(3):137-46, 2003.

McCully, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol.**, **56**(1):111-28. 1969.

Mecacci, F.; Parretti, E.; Cioni, R.; Lucchetti, R.; Magrini, A.; La Torre, P.; Mignosa, M.; Acanfora, L.; Mello, G. Thyroid autoimmunity and its association with non-organ-

specific antibodies and subclinical alterations of thyroid function in women with a history of pregnancy loss or preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.**, **46**:39-50, 2000.

Meegdes, B. H.; Ingenhoes, R.; Peeters, L. L.; Exalto, N. Early pregnancy wastage: relationship between chorionic vascularization and embryonic development. **Fertil Steril.** **49**(2):216-20, 1988.

Mendizabal, A. F.; Quiroga, S.; Farinati, Z.; Lahoz, M.; Nagle, C. Hormonal monitoring of early pregnancy by a direct radioimmunoassay of steroid glucuronides in first morning urine. **Fertil Steril.**, **42**(5):737-40, 1984.

Menezes, Y.; Khatchadourian, C.; Gharib, A.; Hamidi, J.; Greenland, T.; Sarda, N. Regulation of S-adenosyl methionine synthesis in the mouse embryo. **Life Sci.**, **44**(21):1601-9, 1989.

Mtiraoui, N.; Zammiti, W.; Ghazouani, L.; Braham, N. J.; Saidi, S.; Finan, R. R.; Almawi, W. Y.; Mahjoub, T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. **Reproduction.**, **131**(2):395-401, 2006.

Narayanan, S.; McConnell, J.; Little, J.; Sharp, L.; Piyathilake, C. J.; Powers, H.; Basten, G.; Duthie, S. J. Associations between two common variants C677T and A1298C in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and measures of folate metabolism and DNA stability (strand breaks, misincorporated uracil, and DNA methylation status) in human lymphocytes in vivo. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** **13**(9):1436-43, 2004.

Nelen, W. L.; Blom, H. J.; Steegers, E. A.; den Heijer, M.; Thomas, C. M.; Eskes, T. K. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. **Obstet Gynecol.**, **95**(4):519-24, 2000.

Nelen, W. L.; Bulten, J.; Steegers, E. A.; Blom, H. J.; Hanselaar, A. G.; Eskes, T. K. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. **Hum Reprod.** **15**(4):954-60, 2000.

Nelen, W. L.; Steegers, E. A.; Eskes, T. K.; Blom, H. J. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. **Lancet**, **350**(9081):861, 1997.

Norwitz, E. R.; Schust, D. J.; Fisher, S. J. Implantation and the survival of early pregnancy. **N Engl J Med.**, **345**(19):1400-8, 2001.

Paniz, C.; Grotto, D.; Schmitt, G. C.; Valentini J.; Schott K. L.; Pomblum V. J.; Garcia, S. C. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B₁₂ e seu diagnóstico laboratorial. **J Bras Patol Med Lab.**, **41**: 323-34, 2005.

Patton, P. E. Anatomic uterine defects. **Clin Obstet Gynecol.**, **37**(3):705-21.1994.

Pepe, G.; Vanegas, O. C.; Rickards, O.; Giusti, B.; Comeglio, P.; Brunelli, T.; Marcucci, R.; Prisco, D.; Gensini, G. F.; Abbate, R. World distribution of the T833C/844ins68 CBS in cis double mutation: a reliable anthropological marker. **Hum Genet.**, **104**(2):126-9, 1999.

Picciano, M. F. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? **Am J Clin Nutr.** **71**(4):857-8. 2000.

Pihusch, R.; Buchholz, T.; Lohse, P.; Rubsamen, H.; Rogenhofer, N.; Hasbargen, U.; Hiller, E.; Thaler, C. J. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. **Am J Reprod Immunol.**, **46**(2):124-31, 2001.

Porter, T.F.; Scott J.R. Evidence-based care of recurrent miscarriage. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**; **19**(1):85-101, 2005.

Propst, A. M. Hill JA 3rd. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. **Semin Reprod Med.**; **18**(4):341-50. 2000.

Quere, I.; Bellet, H.; Hoffet, M.; Janbon, C.; Mares, P.; Gris, J. C. A woman with five consecutive fetal deaths: case report and retrospective analysis of

hyperhomocysteinemia prevalence in 100 consecutive women with recurrent miscarriages. **Fertil Steril.** **69**(1):152-4. 1998.

Quere, I.; Paul V; Rouillac, C.; Janbon, C.; London, J.; Demaille, J.; Kamoun, P.; Dufier, J. L.; Abitbol, M.; Chasse, J. F. Spatial and temporal expression of the cystathionine beta-synthase gene during early human development. **Biochem Biophys Res Commun.**, **254**(1):127-37, 1999.

Regan, L. Overview of recurrent miscarriage. *Gynaecology Forum.* 3. 3-7 Salat-Baroux, J. Recurrent spontaneous miscarriages. **Reprod. Nutr.**, **28**, 1555-1568. 1998.

Regan, L.; Rai, R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. **Bailliere's Clin Obstet Gynaecol.**, **14**:839-54, 2000.

Rodríguez, G. P. Ácido fólico y vitamina B₁₂ en la nutrición humana. *Revista Cubana Nutr.*, **12**: 107-19, 1998.

Rosenquist, T. H.; Ratashak, S. A.; Selhub, J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. **Proc Natl Acad Sci.**, **93**(26):15227-32. 1996.

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The investigation and treatment of recurrent miscarriage. Guideline No 17. London: **RCOG Press**, 2003.

Salat-Baroux, J. Recurrent spontaneous miscarriages. **Reprod. Nutr. Dev.**, **28**, 1555-1568. 1998

Sebastio, G.; Sperandio, M. P.; Panico, M.; de Franchis, R.; Kraus J. P.; Andria, G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. **Am J Hum Genet.** **56**(6):1324-33, 1995.

Schwahn, B.; Rozen, R. Polymorphisms in the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene, Clinical Consequences. **Am J Pharmacogenomics**; **1** (3): 189-201, 2001.

Sharp, L.; Little, J. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. **Am J Epidemiol.**, **159**:423–443, 2004.

Sperandeo, M. P.; de Franchis, R.; Andria, G.; Sebastio, G. A 68-bp insertion found in a homocystinuric patient is a common variant and is skipped by alternative splicing of the cystathionine b-synthase mRNA. **Am J Hum Genet.**, **59**:1391-3, 1996.

Stegers-Theunissen, R. P.; Wathen, N. C.; Eskes, T. K.; van Raaij-Selten, B.; Chard, T. Maternal and fetal levels of methionine and homocysteine in early human pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol.** **104**(1):20-4. 1997.

Stegmann, K.; Ziegler, A.; Ngo, E. T.; Kohlschmidt, N.; Schroter, B.; Ermert A.; Koch MC. Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). **Am J Med Genet.**, **87**(1):23-9. 1999.

Sunder, S; Lenton, E. A. Endocrinology of the peri-implantation period. **Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.**, **14**(5):789-800, 2000.

Thiersch, J. B. Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (4-amino P.G.A) administered by the oral route. **Am J Obstet Gynecol.** **63**(6):1298-304. 1952.

Tho, P.T.; Byrd, J.R.; McDnough, P.G. Etiologies and subsequent reproductive performance of 100 couples with recurrent abortion. **Fertil. Steril.**, **32**:389-95, 1979.

Thomas, R. & Reid, R.L. - Thyroid disease and preproductive dysfunction: a review. **Obstet. Gynecol.**, **70**:789-98, 1987.

Tsai, M.Y; Bignell M; Schwichtenberg K; Hanson, N. Q. High prevalence of a mutation in the cystathionine b-synthase gene. **Am J Hum Genet**; **59**:1262-7, 1996.

Unfried, G.; Griesmacher, A.; Weismuller, W.; Nagele, F.; Huber, J. C.; Tempfer, C. B. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. **Obstet Gynecol.**, **99**(4):614-9, 2002.

van der Put N. M.; van der Molen, E. F.; Kluijtmans, L. A.; Heil, S. G.; Trijbels, J. M.; Eskes, T. K.; Van Oppenraaij-Emmerzaal, D.; Banerjee, R.; Blom, H. J. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. **QJM.** **90**(8): 511-7, 1997.

van der Put, N. M.; Gabreels, F.; Stevens, E. M.; Smeitink, J. A.; Trijbels, F. J.; Eskes, T. K.; van den Heuvel, L. P.; Blom, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? **Am J Hum Genet.** **62**(5):1044-51. 1998.

van der Put, N. M.; van Straaten, H. W.; Trijbels, F. J.; Blom, H. J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. **Exp Biol Med (Maywood)**, **226**(4):243-70, 2001.

Vanaerts, L. A.; Blom, H. J.; Deabreu, R. A.; Trijbels, F. J.; Eskes, T. K.; Copius Peereboom-Stegeman, J. H.; Noordhoek, J. Prevention of neural tube defects by and toxicity of L-homocysteine in cultured postimplantation rat embryos. **Teratology.** **50**(5):348-60. 1994.

Vilaseca, M. A.; Moyano, D.; Ferrer, I.; Artuch, R. Total homocysteine in pediatric patients. **Clin Chem.**; **43**(4):690-2, 1997.

Walker M. C.; Smith G. N.; Perkins S. L.; Keely E. J.; Garner P. R. Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. **Am J Obstet Gynecol.** **180**:660-4. 1999.

Weisberg, I.; Tran, P.; Chrstensen, B.; Sibani, S.; Rozen, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metab.**, **64**(3):169-72, 1998.

Wilcken D. E.; Wilcken, B. The pathogenesis of coronary artery disease. A possible role for methionine metabolism. **J Clin Invest.**, 57(4):1079-82. 1976.

Wouters, M. G.; Boers G. H.; Blom H. J.; Trijbels, F. J.; Thomas, C. M.; Borm, G. F.; Steegers-Theunissen R. P.; Eskes, T. K. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss., **Fertil Steril.** 60(5):820-5. 1993.

Zetterberg, H. Methylene tetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reprod Biol Endocrinol**; 2: 7, 2004.

10. ANEXOS

QUESTIONÁRIO

Identificação

Número:

Data:

Nome:

Nascimento: ___/___/___

Tel:

Idade:

End:

Cor: Negra Parda Amarela Outras _____

Profissão:

Perdas

Número de perdas: _____

Período gestacional das perdas

Idade quando aconteceu a 1ª perda _____ Sugere algum motivo? _____

Hábitos

Fumante? _____

Quantos cigarros / dia? _____

Consome bebida alcoólica? _____

Com que frequência? _____

Faz atividade física? Qual? _____

Com que frequência? _____

Medicamentos

Faz uso de medicamentos? _____

Faz uso de suplementação vitamínica? _____

Alimentação

Quantas refeições diárias? 1 2 3 4 5 6

Qual o tipo de alimentação mais consumida? _____

Costuma comer Gordura? _____

Com que frequência?

Todos os dias 1 a 2x/Sem

3 a 4x/sem 5 a 6x/sem

Costuma comer salada? _____

Com que frequência?

Todos os dias 1 a 2x/Sem 3 a 4x/sem 5 a 6x/sem

Vegetais mais consumidos:

	Todos os dias	1 a 2x / sem	3 a 4x / sem	5 a 6x / sem
Alface	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acelga	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agrião	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brócolis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Couve	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hortelã	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Espinafre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Repolho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, concordo em

(nome ou responsável legal)

participar como voluntário do estudo denominado **“Polimorfismos Gênicos da MTHFR, Cistationina Beta-Sintetase e Metionina Sintase: Associação a Perdas Fetais Recorrentes e Níveis Séricos de Vitamina B₁₂, Folatos e Homocisteína”**, sob a coordenação da Dra. Marilda de Souza Gonçalves. Tenho conhecimento de que este estudo é importante, uma vez que poderá apontar informações sobre uma possível associação entre os polimorfismos investigados e perdas fetais. As implicações relativas a minha participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais o estudo deve ser conduzido foram explicados por

(nome do investigador)

No (a) _____

(nome da Instituição)

Entendo também que eu tenho permissão para a qualquer momento revogar o meu consentimento e me retirar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de direitos. Entretanto, poderei ser solicitado a realizar exames, caso o médico que me assiste, julgue-os necessários para minha saúde e bem estar.

Assinatura do responsável _____

Data ___ / ___ / ___ Número de identidade _____

Endereço _____

Eu presenciei a explicação acima descrita, confirmando a oportunidade concedida de formular perguntas e testemunho a assinatura neste documento.

Assinatura da testemunha(1) _____

Nome da testemunha (1) _____

Assinatura da testemunha(2) _____

Nome da testemunha (2) _____

Assinatura do investigador _____

Explicação do Termo de Consentimento

Título do estudo

“Polimorfismos Gênicos da MTHFR, Cistationina Beta-Sintetase e Metionina Sintase: Associação a Perdas Fetais Recorrentes e Níveis Séricos de Vitamina B₁₂, Folatos e Homocisteína”

Pesquisador Responsável

Dra. Marilda de Souza Gonçalves

- Professora Adjunto FAR - UFBA;
- Pesquisador Associado - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – (CPqGM/FIOCRUZ-BA);
- Pesquisador Nível II-B - CNPq.

Informações Sobre a Pesquisa

Este estudo propõe investigar a prevalência de mutação em genes que são responsáveis pelo metabolismo da Homocisteína, correlacionando-as aos níveis plasmáticos de ácido fólico e vitaminas B6 e B12 em mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes atendidas na Maternidade Climério de Oliveira na cidade de Salvador-BA. O estudo é importante para esta população visto que a presença destes polimorfismos têm sido correlacionados como fator de risco para perdas fetais recorrentes. O estabelecimento das principais etiologias dos abortos permitirá às pacientes realizar o acompanhamento médico/nutricional adequado minimizando possíveis problemas no desenvolvimento da gravidez.

Duração do Projeto de Pesquisa

O tempo previsto para a realização desta pesquisa será de aproximadamente dois anos.

Riscos, danos e desconfortos

O sangue será coletado através da utilização de materiais novos, estéreis e descartáveis, proporcionando ao voluntário conforto e segurança maiores. As amostras para análises moleculares e bioquímicas serão retiradas das mesmas amostras coletadas para o diagnóstico e acompanhamento do paciente, sem a realização de coletas extras.

Benefícios

Este trabalho trará como benefícios para os participantes a determinação de polimorfismos envolvidos no metabolismo da homocisteína e dos níveis plasmáticos de ácido fólico, vitaminas B6 e B12 e homocisteína em mulheres com história de abortos espontâneos recorrentes. A análise da associação destes polimorfismos e marcadores bioquímicos com abortos recorrentes poderá indicar possíveis etiologias para estas perdas fetais, as quais poderão ser tratadas no sentido de favorecer uma gestação bem sucedida. Os resultados serão fornecidos aos participantes pelo hospital em forma de exames adicionais.

Compromisso com a confidencialidade da identidade do voluntário

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento somente do médico e dos participantes do projeto.

Novos achados significativos

Qualquer informação importante que surgir durante a sua participação no estudo, e que possa contribuir para a elucidação que possa associar fatores de riscos às perdas fetais, será imediatamente comunicada ao seu médico.

Pessoas e locais a serem contactadas para a obtenção de maiores informações sobre o estudo

Dra. Marilda de Souza Gonçalves – Coordenadora do projeto – Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ
356-8783 r-226 ou r-265

Obs: Caso você não tenha entendido alguma parte deste documento/explicação, pergunte ao investigador antes de assinar.

Atesto o recebimento da cópia deste acordo, constituído pelos termos de explicação e de consentimento livre e esclarecido.

Assinatura do paciente _____

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha(1) _____

Data ____ / ____ / ____

Nome da testemunha (1) _____

Assinatura da testemunha(2) _____

Data ____ / ____ / ____

Nome da testemunha (2) _____

