



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM CASAIS COM ANTECEDENTES  
DE ABORTO RECORRENTE NO PRIMEIRO TRIMESTRE DA  
GESTAÇÃO**

**ROZANA OLIVEIRA GONÇALVES**

**Salvador – Bahia - Brasil**  
**2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM MULHERES COM ANTECEDENTES  
DE ABORTO RECORRENTE NO PRIMEIRO TRIMESTRE DA  
GESTAÇÃO**

**ROZANA OLIVEIRA GONÇALVES**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Olívia Lúcia Nunes Costa

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, para obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia - Brasil  
2013

## **AGRADECIMENTOS**

- A minha família.
- A Dra. Olívia Lúcia Nunes Costa, pela orientação e receptividade.
- A Dra. Marilda de Souza Gonçalves, pela fundamental contribuição na execução e desenvolvimento do projeto.
- Ao Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), que colaborou na triagem dos casos.
- Aos colegas de equipe, especialmente, Wendell, Rayra, Camila, Sanzio, Silvana, Magda e Bruno.
- Ao professor Fernando Carvalho, pelo auxílio na análise estatística.
- Aos funcionários do laboratório da Maternidade Climério de Oliveira.
- Aos pacientes que colaboraram na execução do projeto.
- Aos funcionários da biblioteca do CPqGM.
- Aos amigos.

GONÇALVES, Rozana Oliveira. Alterações genéticas em casais com antecedentes de aborto recorrente no primeiro trimestre da gestação. 101 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## RESUMO

O abortamento é considerado um problema multifatorial, cujas principais causas envolvidas na sua etiologia são os fatores ambientais (como exposição a substâncias tóxicas), genéticos, anatômicos, endócrinos, imunológicos, trombofílicos e doenças infecciosas (como toxoplasmose, rubéola). No entanto, os fatores genéticos são atribuídos principalmente aos abortamentos de primeiro trimestre da gestação. As alterações cromossômicas, o polimorfismo C677T, no gene da *metilenotetrahidrofolato redutase* (*MTHFR677C>T*); o polimorfismo G1691A, no gene do *Fator V de Leiden* (*FVL1691G>A*), e o polimorfismo G20210A, no gene da *protrombina* (*PRT20210G>A*), têm sido associados a problemas obstétricos, incluindo aborto recorrente. O objetivo deste trabalho foi investigar associação entre as mutações relacionadas à trombofilia, presença de alterações cromossômicas e a ocorrência de aborto espontâneo recorrente e avaliar possíveis interações entre as referidas mutações e as alterações cromossômicas. A casuística foi composta por 151 mulheres com história de aborto recorrente, 94 parceiros e 100 controles (mulheres sem histórico de aborto). A investigação das mutações foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição. As alterações cromossômicas foram investigadas pela cariotipagem com banda-G. A frequência das alterações cromossômicas foi de 7,3% nas mulheres com abortamento recorrente e 1% nos controles ( $p=0,022$ ), e de 2,1% nos parceiros. No entanto, a frequência dos alelos *MTHFR677C>T* (23% versus 22,5%), *FVL1691G>A* (1,5% versus 1%) e *PRT20210G>A* (1,45% versus 0%) foi similar entre casos e controles, respectivamente. No grupo investigado, foi observada associação entre aborto recorrente e alterações cromossômicas, mas não foi encontrada associação com os polimorfismos gênicos investigados.

**Palavras-chave:** Abortos recorrentes, alterações cromossômicas, polimorfismos gênicos, metilenotetrahidrofolato redutase, Fator V de Leiden e Protrombina.

GONÇALVES, Rozana Oliveira. Genetic alterations in couples with history of recurrent miscarriage in the first trimester of pregnancy. 101 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## ABSTRACT

Abortion is considered a multifactorial problem, the most important causes involved in its etiology are, environmental factors ( as exposure to toxic chemicals), genetic, anatomic, endocrine, immunological, thrombophilic and infectious diseases (such as toxoplasmosis, rubella). However, genetic factors are mainly attributed to abortions of the first trimester of pregnancy. Chromosomal abnormalities, MTHFR 677C>T, factor V Leiden 1691G>A and prothrombin 20210G>A mutations have been associated with obstetric problems, including recurrent miscarriage. The objective of this research was to investigate associations between mutations in three genes commonly associated to thrombophilic events, chromosomal abnormalities and the occurrence of recurrent miscarriage. As well evaluate possible interactions between these mutations and chromosomal abnormalities. The sample was comprised of 151 women with history of recurrent miscarriages, 94 partners and 100 control (women with no history of abortion). The investigation of the mutations was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR)/ Restriction Fragment Length *Polymorphism* (RFLP). Chromosomal aberrations were investigated by karyotyping with G-banda. The frequency of chromosomal abnormalities was 7.3% in women with recurrent miscarriage and 1% in controls ( $p = 0.022$ ), and 2.1% in the partners. However, the frequency of allele MTHFR677C> T (23% versus 22.5%), FVL1691G> A (1.5% vs. 1%) and PRT20210G> A (1.45% vs. 0%) was similar for cases and controls, respectively. In the investigated group was found association between recurrent miscarriage and chromosomal abnormalities, but no association was found with the genetic polymorphisms investigated.

**Key words:** recurrent miscarriages, chromosomal abnormalities, gene polymorphisms, methylenetetrahydrofolate reductase, Factor V Leiden and Prothrombin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Possíveis gametas de um indivíduo com a translocação robertsoniana t(14,21), adaptada de Thompson e Thompson (1993).....	18
Figura 2.	Representação esquemática da cascata de coagulação, adaptada de Franco (2001) .....	25
Figura 3.	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 MTHFR.....	36
Figura 4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo 1691G-A no gene do Fator V.....	37
Figura 5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo 20210G-A no gene da protrombina.....	38
Figura 6.	Metáfase mostrando trissomia do cromossomo X, observada em uma das mulheres com aborto recorrente (47,XXX) .....	43
Figura 7.	Metáfase mostrando inversão do cromossomo 9, observada em uma mãe do grupo controle.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Frequência individual e combinada dos polimorfismos C677T e A1298C no gene MTHFR em mulheres com aborto recorrente e controles, segundo (Mtiraoui et al., 2006 e Zetterberg et al., 2002) .....	29
Tabela 2.	Número de abortos nas mulheres com história de perdas recorrentes da gravidez .....	42
Tabela 3.	Frequência das alterações cromossômicas no grupo de parceiros, mulheres do grupo caso e mulheres do grupo controle.....	44
Tabela 4.	Alterações cromossômicas no grupo das mulheres com aborto de repetição, parceiros e controles.....	45
Tabela 5.	Frequência das alterações cromossômicas das mulheres com aborto recorrente correlacionada com as idades estratificadas.....	46
Tabela 6.	Variações normais observadas na estrutura dos cromossomos no grupo das mulheres com perdas recorrentes, dos parceiros e dos controles.....	46
Tabela 7.	Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos <i>MTHFR</i> , <i>FVL</i> e <i>Protrombina</i> nas mulheres com aborto de repetição e nos controles.....	49
Tabela 8.	Distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos no gene <i>MTHFR</i> 677C<T, no gene <i>Fator V</i> 1691G<A e no gene <i>Protrombina</i> 2021G<A, no grupo de mulheres com perdas recorrentes e controles.....	50
Tabela 9.	Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes <i>MTHFR</i> , <i>Fator V</i> e <i>protrombina</i> e sua associação com a idade estratificada das mulheres com aborto recorrente.....	51
Tabela 10.	Frequência genotípica dos polimorfismos nos genes <i>MTHFR</i> , <i>Fator V</i> e <i>protrombina</i> e sua associação com o número de abortos.....	52
Tabela 11.	Frequência dos genótipos <i>MTHFR</i> 677C>T, <i>FVL</i> 1691G>-A e <i>PROT</i> 2021G>A correlacionada com as alterações cromossômicas no grupo de mulheres com aborto recorrente.....	53

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Alterações Cromossômicas
AR	Aborto Recorrente
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleosídeos Trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FVL	<i>Fator V de Leiden</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Inv	Inversão
MCO	Maternidade Climério de Oliveira
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MTHFR	Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase
pb	Pares de base
PCa	Proteína C ativada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
<i>Pmoles</i>	Picomoles
RNA <sub>m</sub>	RNA Mensageiro
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
rob	Robertsoniana
RP	Razão de Prevalência
t	Translocação
U	Unidades
UFBA	Universidade Federal da Bahia
µl	Microlitros



## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	<b>Aborto recorrente</b> .....	10
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	14
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
3.1	<b>Alterações obstétricas</b> .....	15
3.2	<b>Mutações genéticas</b> .....	16
3.2.1	Aborto recorrente e alterações cromossômicas nos pais.....	18
3.2.1.2	<i>Translocações cromossômicas</i> .....	19
3.2.1.3	<i>Rearranjo estrutural balanceado do cromossomo 9</i> .....	20
3.2.1.4	<i>Alterações dos cromossomos sexuais</i> .....	20
3.2.2	Aborto recorrente e alterações gênicas nos pais.....	22
3.2.2.1	<i>Polimorfismos nos genes da protrombina e Fator V Leiden</i> .....	22
3.2.2.2	<i>Polimorfismo no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase</i> .....	27
4	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
5	<b>CASUÍSTICA</b> .....	31
5.1	<b>Tipo do estudo</b> .....	31
5.2	<b>População e área do estudo</b> .....	31
6	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
6.1	<b>Coleta das amostras de sangue</b> .....	33
6.2	<b>Análise molecular</b> .....	33
6.3	<b>Investigação dos polimorfismos</b> .....	33
6.4	<b>Estudo das alterações cromossômicas</b> .....	38
6.5	<b>Análise estatística</b> .....	40

7	<b>RESULTADOS</b> .....	41
7.1	<b>Alterações cromossômicas</b> .....	43
7.2	<b>Alterações gênicas</b> .....	47
7.2.1	Investigação dos polimorfismos C677T no gene da MTHFR, 1691G-A no gene do Fator V e 20210G-A no gene da protrombina.....	47
8	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
8.1	<b>Alterações cromossômicas</b> .....	56
8.2	<b>Polimorfismos no gene MTHFR 677C&gt;T, no gene <i>Fator V</i> 1691 G&gt; A e no gene protrombina 20210G&gt;A</b> .....	62
9	<b>CONCLUSÃO</b> .....	67
10	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
	<b>APÊNDICE A</b> .....	81
	<b>ANEXO A</b> .....	83
	<b>APÊNDICE B</b> .....	85

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aborto recorrente

O abortamento é definido como a interrupção da gestação até a 20<sup>a</sup>-22<sup>a</sup> semana ou quando o concepto pesa até 500g (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2003). É considerado precoce quando inferior ou igual a 12 semanas e tardio quando ocorre entre a 13<sup>a</sup> e a 22<sup>a</sup> semana de gestação (NEME *et al.*, 2005).

Os abortamentos podem ser classificados em espontâneos e provocados. Os espontâneos são aqueles que ocorrem de maneira natural, cuja etiologia: fatores genéticos (alterações cromossômicas, mutações gênicas); doenças sistêmicas (diabetes, hipotireoidismo, deficiência de progesterona, hipertensão), fatores imunológicos (Síndrome do Anticorpo-antifosfolípide - SAAF); infecções congênitas causadas por microrganismos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, Rubella virus, Citomegalovirus); defeitos uterinos adquiridos (miomas e sinequias) ou congênitos (útero unicorno, bicorno, septado); uso abusivo de fumo e álcool e intoxicação (chumbo, arsênio, benzeno). Os abortos espontâneos recorrentes ou de repetição são aqueles em que ocorrem três ou mais perdas gestacionais consecutivas. Nos abortamentos provocados, a interrupção da gravidez é induzida com agentes químicos ou mecânicos como o uso de medicamentos abortivos e intervenções cirúrgicas (CAETANO *et al.*, 2006; NEME *et al.*, 2005).

O abortamento espontâneo é frequente, afetando cerca de 10 a 15% das gestações diagnosticadas. Já o abortamento habitual ou recorrente afeta cerca de 0,5 a 3% dos casais em idade reprodutiva. O percentual dos abortamentos espontâneos pode ser ainda maior, uma vez que algumas mulheres podem não

reconhecer que estão grávidas e confundir o abortamento com um atraso menstrual (VAN *et al.*, 2012).

A avaliação etiológica dos casais com história de abortos recorrentes geralmente é iniciada a partir de dois abortos. Geralmente são investigadas causas genéticas, anatômicas, endócrinas, imunológicas, trombofílicas, ambientais (exposição a substâncias tóxicas) e doenças infecciosas (toxoplasmose, sífilis) (BERRY *et al.*, 1995; SERRANO *et al.*, 2011; HOGGE *et al.*, 2003).

O abortamento é considerado um problema multifatorial, sendo que em torno de 50% dos casos a etiologia não é identificada. No entanto, até 60% dos abortamentos esporádicos e entre 29% e 50% dos abortamentos recorrentes podem ser causados por alterações cromossômicas no concepto (HOGGE *et al.*, 2003; CARP *et al.*, 2004; CELEP *et al.*, 2005). É possível que alterações cromossômicas submicroscópicas, não detectáveis por análises citogenéticas convencionais, possam contribuir para uma parcela desses abortos (MEREL *et al.*, 2012).

Entre as alterações cromossômicas observadas nos produtos de abortamentos, a maioria (95%) é causada por alterações numéricas: cerca de 60% são trissomias, principalmente dos cromossomos 16, 18 e 21; 20% são monossomias, mais frequente do X; e 15% têm euploidia, especialmente triploidia (MISKOVIC *et al.*, 2012).

As anormalidades cromossômicas observadas nos fetos abortados espontaneamente geralmente estão associadas à não disjunção cromossômica ou mutações que ocorrem na fase de formação dos gametas ou fertilização e clivagem dos óvulos (KOCHHAR *et al.*, 2012).

Aproximadamente 89% dos abortamentos recorrentes ocorrem no primeiro trimestre, e mais de 50% deles apresentam alterações cromossômicas. Desta forma,

é comum a investigação da constituição cromossômica dos pais, os quais podem apresentar alterações numéricas, como mosaicismo do cromosomo X, ou estrutural equilibrada, como as translocações recíprocas ou robertsonianas, que podem ser herdadas pelos descendentes de forma desequilibrada (CARP *et al.*, 2004; KUO *et al.*, 2004).

Carp e cols. (2004) investigaram 916 casais com 3 a 16 abortos com menos de 20 semanas de gestação e encontraram alterações cromossômicas em 99 indivíduos (10,8%). Foram observados nas mães 31 casos de translocações balanceadas, 18 casos de alteração numérica em mosaico e seis casos de inversão cromossômica; e nos pais, foram encontrados 21 casos de translocações balanceadas, 3 casos de alteração numérica em mosaico e 19 casos de inversão cromossômica.

Os fatores genéticos são considerados como as principais causas dos abortamentos recorrentes de primeiro trimestre, em que se destacam as translocações cromossômicas balanceadas e as mutações relacionadas com a ocorrência de trombofilias: a) 677C>T, no gene da metilenotetrahidrofolato redutase; b) 1691G>A, no gene do Fator V de Leiden; c) 20210G>A, no gene da *protrombina* (MISKOVIC *et al.*, 2011; CASTRO *et al.*, 2006; PARVEEN *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos sugerem que as mutações gênicas relacionadas com as trombofilias são fatores de riscos importantes para as perdas reprodutivas. Eles têm investigado a relação entre trombofilia e abortamento recorrente, sendo observada associação com razão de prevalência (RP) variando de 0,5 a 18 para alterações no gene *FVL* e de 2,5 a 4,6 para mutação 20210G>A no gene da protrombina (MTIRAOUÏ *et al.*, 2006; SETTIN *et al.*, 2011). Nos experimentos de

Unfried e cols. (2002), indivíduos homocigotos para o polimorfismo *MTHFR677C>T* apresentaram risco 3,7 vezes maior de abortamento recorrente.

Outras causas, como a idade materna avançada e hábitos de vida, como uso de cigarros e drogas, são também associadas à ocorrência de abortos. A ingestão de doses elevadas de cafeína ou álcool podem constituir fator de risco adicional para as perdas gestacionais (NEME *et al.*, 2005; SIMPSON *et al.*, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

O Abortamento Recorrente (AR), definido como três ou mais perdas gestacionais consecutivas, ocorre entre 1 a 3% dos casais em idade reprodutiva.

A etiologia do AR é considerada multifatorial e controversa, uma vez que 50% dos casos são atribuídos a alterações cromossômicas, anomalias uterinas, desordens endócrinas, fatores imunológicos, desordens da coagulação, infecções, doenças maternas crônicas e exposição a substâncias tóxicas; e, nos outros 50%, a etiologia não é identificada.

No Ambulatório de Aborto Habitual da Maternidade Climério de Oliveira (UFBA), a expectativa dos casais pelo êxito gestacional é crescente. Fato que os leva a uma busca constante de meios e tratamentos para elucidar o problema, gerando desgaste psicológico e emocional nas suas vidas. Como a etiologia do AR é multifatorial, e os fatores genéticos são considerados a causa principal dos abortamentos de primeiro trimestre, seria importante a realização de um estudo na Bahia que avaliasse conjuntamente a frequência das alterações cromossômicas e das mutações MTHFR C677T, Fator V Leiden e protrombina G20210A nessa população.

A identificação etiológica de fatores genéticos é uma informação clínica importante para o aconselhamento genético e orientação do casal quanto ao risco para gestações futuras e diminuir o número de investigações para elucidar as possíveis causas dos abortamentos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Alterações obstétricas

Diversos fatores etiológicos têm sido propostos para explicar as perdas fetais. A ciência procura conhecer melhor sua etiologia, buscando alternativas terapêuticas que possam produzir melhores resultados gestacionais (CARDONA *et al.*, 2008; HORNE *et al.*, 2005).

A progesterona é fundamental no desenvolvimento uterino, na implantação e manutenção da gravidez. 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 principal desse hormônio provém da placenta. Portanto, a deficiência de progesterona, decorrente de causas maternas ou ovulares, acarretará danos na implantação do concepto (SIMPSON, 2007).

Alterações anatômicas do útero podem predispor mulheres a dificuldades reprodutivas e estão presentes entre 9% a 16% dos casos. A depender da anomalia uterina, o risco de perda pode ser maior no primeiro ou no segundo trimestre e no parto prematuro (JAUNIAUX *et al.*, 2006). As principais anomalias incluem incompetência istmo-cervical, septos intrauterinos, miomas que fazem saliências para a cavidade uterina e as sinequias uterinas (SIMPSON *et al.*, 2007).

Causas hormonais potenciais para o abortamento espontâneo incluem a diabetes mellitus e tireoideopatias. Entretanto, a sua contribuição na perda reprodutiva de repetição não está bem estabelecida (KAVALIER, 2008). Hipotireoidismo ou diabetes *mellitus* não controlados aumentam o risco de perdas no



primeiro trimestre da gestação, no entanto, quando o hipotireoidismo é tratado e o nível de glicose é controlado, não há associação com aborto recorrente (SIMPSON, 2007).

Os fatores imunológicos podem ser importantes na etiologia dos abortos. Os autoanticorpos mais comuns em pacientes com aborto recorrente são antifosfolípide (14%) e anticorpo antinuclear (7%). Na síndrome antifosfolípide, são detectados os anticorpos anticardiolipina e anticoagulante lúpico, cuja frequência encontrada na população em geral é de 2% (HORNE *et al.*, 2005). Os anticorpos antitireoidianos também podem estar elevados em mulheres com aborto recorrente (HORNE *et al.*, 2005).

É conhecido que infecções severas são potenciais causas de abortamentos. A presença de infecções bacterianas, viroses e outros organismos, como toxoplasma e listeria, podem interferir na gestação; no entanto, a sua relevância nos casos de aborto recorrente não é bem definida (KAVALIER, 2008).

### **3.2 Mutações genéticas**

Mutação, que pode ser cromossômica ou gênica (SNUSTAD e SIMMONS, 2001), é definida como qualquer alteração permanente no material genético.

As mutações cromossômicas podem ser classificadas em numéricas, quando ocorre aumento ou diminuição no número de cromossomos (aneuploidia e euploidia), e estruturais, quando ocorrem mudanças na estrutura dos cromossomos, como as deleções, duplicações, translocações e inversões de segmentos cromossômicos (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

A aneuploidia é uma alteração cromossômica que descreve uma mudança numérica no genoma e que, em geral, envolve um ou alguns cromossomos, como as trissomias e monossomias. Já as euploidias são caracterizadas pela presença de todo um conjunto haploide adicional (GRIFFITHS *et al.*, 2004).

As translocações cromossômicas balanceadas ocorrem quando um segmento de um cromossomo é transferido para outro não homólogo, sem perda nem ganho importante de material genético (GRIFFITHS *et al.*, 2004; SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

A translocação robertsoniana (rob) envolve os cromossomos acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22) e ocorre a partir da deleção dos braços curtos de dois desses cromossomos, seguida de fusão dos centrômeros, unindo os braços longos dos cromossomos envolvidos. Na meiose, o pareamento do cromossomo derivado da translocação robertsoniana com seus homólogos normais, assim como na translocação recíproca, resulta na formação de seis tipos possíveis de gametas. A figura 1 mostra um indivíduo com uma translocação entre o cromossomo 14 e o 21 e os seus possíveis gametas: dois normais: (1) apresenta um cromossomo 14 e um 21; (2) tem a mesma translocação balanceada do seu progenitor entre o cromossomo 14 e o 21; quatro desbalanceados: (3) apresenta um cromossomo 21 e a translocação entre o cromossomo 14 e o 21; (4) apresenta um cromossomo 14 e nenhum 21; (5) apresenta um cromossomo 14 e a translocação entre o cromossomo 14 e o 21; (6) apresenta apenas o cromossomo 21 (MALUF, *et al.*, 2012).



Figura1. Possíveis gametas de um indivíduo com a translocação robertsoniana t(14,21), adaptada de Thompson e Thompson (1993).

As mutações gênicas são alterações na estrutura do DNA e correspondem a substituição, inserção ou deleção de um ou alguns nucleotídeos (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

### 3.2.1 Aborto recorrente e alterações cromossômicas nos pais

Nos últimos anos, com o surgimento de novas técnicas de análise citogenética, observou-se que as anomalias cromossômicas estão presentes em 50% dos abortos de primeiro trimestre, em 15% dos abortos de segundo trimestre e em 5% nos de terceiro trimestre. As principais alterações cromossômicas encontradas são trissomias, triploidias, tetraploidias, translocações e mosaïcismo. Os defeitos cromossômicos podem ser decorrentes de gametas geneticamente anormais e de irregularidades na divisão do embrião (REZENDE, 1995).

Estudos sugerem maior frequência de alterações relacionadas com o gameta feminino, o que pode ser pelo fato de que os óvulos têm a idade cronológica da mulher e os espermatozoides são renovados a cada dois meses. Por outro lado, os gametas masculinos devem ser considerados, uma vez que 2% dos

espermatozoides são geneticamente anormais (REZENDE, 1995; MAKINO *et al.*, 1990).

### 3.2.1.2 *Translocações cromossômicas*

As translocações cromossômicas são a principal alteração encontrada nos pais relacionadas com as perdas gestacionais de repetição e que estão presentes em aproximadamente 3 a 5% dos casais. Esta taxa é cerca de cinco vezes maior do que aquela observada na população em geral, que é de 0,2% (HORNE *et al.*, 2005).

Os pais portadores de uma translocação balanceada são fenotipicamente normais, mas podem apresentar fertilidade reduzida, aborto recorrente ou filhos com fenótipo alterado, decorrente de erro na meiose. Segundo Ozawa e cols. (2008), o risco reprodutivo para os portadores de translocações balanceadas depende do tamanho delas, do local da quebra e do número de cromossomos envolvidos.

Outras alterações estruturais observadas em casais com aborto recorrente são as translocações robertsonianas, as inversões e as deleções cromossômicas (HORNE *et al.*, 2005; OZAWA *et al.*, 2008).

Saxena e cols. (2012) analisaram o cariótipo de 2.000 casais na Índia com aborto recorrente no primeiro trimestre e encontraram prevalência de 1,4% para as translocações recíprocas; 0,4% para translocações robertsonianas e 0,2% para inversões. Ozawa e cols. (2008) investigaram 2.324 casais japoneses com duas ou mais perdas reprodutivas recorrentes e encontraram as seguintes frequências: 3,18% para as translocações recíprocas, 0,99% para as translocações robertsoniana e 0,43% para as inversões.

### 3.2.1.3 Rearranjo estrutural balanceado do cromossomo 9

As inversões pericêntricas do cromossomo 9 [inv(9)] são os rearranjos estruturais mais comuns no cariótipo humano e são consideradas variantes do cariótipo normal. A região invertida contém apenas heterocromatina centromérica e o centrômero, por isso raramente resulta em alterações cromossômicas após o *crossing-over* (DANA *et al.*, 2012; MALUF *et al.*, 2011), e sua incidência é de cerca de 1% - 3% em diferentes populações e de 1,9% em africanos e americanos (DANA *et al.*, 2012; MOZDARANE *et al.*, 2007).

Embora as inv(9) (p11q12) e (p11q13) sejam consideradas variantes normais, há relatos sugerindo que podem estar associadas a infertilidade e abortos recorrentes (CEYLAN *et al.*, 2008).

Dana e *cols.* (2012) investigaram 900 casais inférteis na Romênia: destes, 3,7% apresentaram inversão do cromossomo 9, e os controles, 2,2%. Não foi observada associação quando comparados os casos com os controles. No Japão, Ozawa *et al.* (2008) avaliaram 2.324 casais com perdas reprodutivas recorrentes e encontraram uma frequência de 3,49% de inversão do cromossomo 9. E a razão de prevalência ajustada para abortos subsequentes nos casais com inversão do cromossomo 9 foi estatisticamente significativa (RP= 2.0; vp= 0,026).

### 3.2.1.4 Alterações nos cromossomos sexuais

As alterações dos cromossomos sexuais, do mesmo modo que ocorre nos autossomos, podem ser numéricas ou estruturais. Assim, essas alterações podem

ser causadas tanto pela falta quanto pela presença de cópias extras dos cromossomos (X e Y). Muito frequentemente, as alterações dos cromossomos sexuais aparecem na forma de mosaico, juntamente com linhagens celulares normais (MALUF *et al.*, 2011).

As alterações dos cromossomos sexuais podem afetar a fertilidade, a determinação sexual, além de outras características fenotípicas. Com exceção do cromossomo Y, as aneuploidias dos cromossomos sexuais são viáveis e compatíveis com crescimento e desenvolvimento relativamente normais. As monossomias completas dos cromossomos autossomos são letais, já a monossomia do cromossomo X é viável, apesar de resultar em taxa elevada de perdas fetais (YOUNG *et al.*, 2007).

As aneuploidias dos cromossomos sexuais são mais frequentes do que as dos autossomos. Em recém-nascidos, observa-se a frequência de 0,2% e 0,1% respectivamente. As mais observadas em crianças nativas são 47,XXY/ 47,XYY, presente em meninos, e 45,X e 47,XXX, presente em meninas (MALUF *et al.*, 2011).

### 3.2.2 Aborto recorrente e alterações gênicas nos pais

O desenvolvimento de um conceito é um processo multifatorial e envolve, entre outros fatores, a formação de um suporte vascular adequado. O fluxo sanguíneo placentário ineficiente causado por eventos trombóticos ou insuficiência vascular pode levar a efeitos deletérios no desenvolvimento da gravidez (TAL *et al.*, 1999). Alguns estudos sugerem associação entre as mutações gênicas relacionadas a trombofilia e aborto recorrente, sendo descrita a mutação 1691G>A no gene do *fator V Leiden*, 20210G>A no gene da protrombina e 677C>T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (JIVRAJ *et al.*, 2006; HUSSEIN *et al.*, 2010).

#### 3.2.2.1 Polimorfismos nos genes da protrombina e Fator V Leiden

As duas causas mais comuns de trombofilia hereditária são as mutações nos genes da protrombina 20210G>A e *Fator V Leiden (FVL)* 1691G>A, que estão relacionadas a desordens na coagulação sanguínea, resultando em um estado de hipercoagulabilidade, que repercute negativamente desde a implantação do embrião até fases mais tardias da gestação. No início da gestação, elas podem se manifestar como abortos espontâneos, enquanto na gravidez tardia as trombofilias podem estar associadas a complicações como pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, deslocamento da placenta e natimortos (KOVALEVSKY *et al.*, 2008).

O gene da protrombina está localizado no cromossomo 11 na região (p11–q12). O polimorfismo 20210G<A corresponde a uma substituição do tipo transição,

em que uma guanina é substituída por uma adenina no nucleotídeo 20210, da região não traduzida 3' do DNA complementar do gene do fator II da coagulação (protrombina). Esta mutação está associada ao aumento da estabilidade do seu RNAm e concentração plasmática da protrombina, resultando em um estado de hipercoagulabilidade, o que predispõe a complicações na gravidez, como os abortamentos (BAGHERI *et al.*, 2011).

A mutação 20210G<A no gene da protrombina afeta entre 1- 4% da população normal, e sua prevalência é maior entre indivíduos brancos do sul da Europa. Esta mutação está associada ao aumento de 20-50% da concentração de protrombina no plasma e é responsável por 6,2% de todos os casos de trombose. As mulheres com história de perdas fetais portadoras da mutação no gene da protrombina têm risco três vezes maior de trombose venosa (FOCA *et al.*, 2000; KOVALEVSKY *et al.*, 2008).

O gene do *fator V* está localizado no cromossomo 1 na região (q21 – q25). O polimorfismo neste gene envolve a substituição do tipo transição, onde uma guanina é substituída por uma adenina no nucleotídeo 1691, levando à substituição do aminoácido arginina por glutamina na proteína. Esta mutação é denominada de *fator V de Leiden*. A arginina é um dos principais sítios de clivagem para ativação da proteína C. A presença desta mutação altera o *fator V*, tornando-o resistente à inativação pela proteína C, o que resulta em um estado de hipercoagulabilidade com risco de 5 a 10 vezes para a ocorrência de trombozes nos heterozigotos e 80 vezes nos homozigotos (KOVALEVSKY *et al.*, 2008; PARVEEN *et al.*, 2012).

A trombina exerce papel importante na regulação do processo de coagulação. Combinada com a trombomodulina, presente na superfície da célula endotelial,



converte proteína C em proteína C ativada (proteína Ca). O cofator proteína S junto com a proteína Ca degradam o fator Va (*fator V* ativado) e VIIIa, limitando a atividade desses dois fatores na cascata, diminuindo, assim, a produção de trombina e, conseqüentemente, a coagulação. Nos casos em que há mutação no gene do *fator V*, ou seja, *fator V* alterado resistente à inativação pela proteína C, esta fica impossibilitada de se ligar e clivar o *fator V*, deixando assim de exercer seu papel regulador – Figura 2 (FRANCO, 2001; KUJOVICH, 2011).

O *fator V* é um cofator importante na ativação da trombina, portanto, fundamental na formação da rede de fibrina que compõe o coágulo. O *fator V* é ativado a Va, que se liga a receptores específicos na superfície das plaquetas; o complexo Va/Xa executa a transformação da protrombina em trombina (Figura 2). A trombina é fundamental no processo de ativação da fibrina e formação posterior do coágulo (FRANCO, 2001).

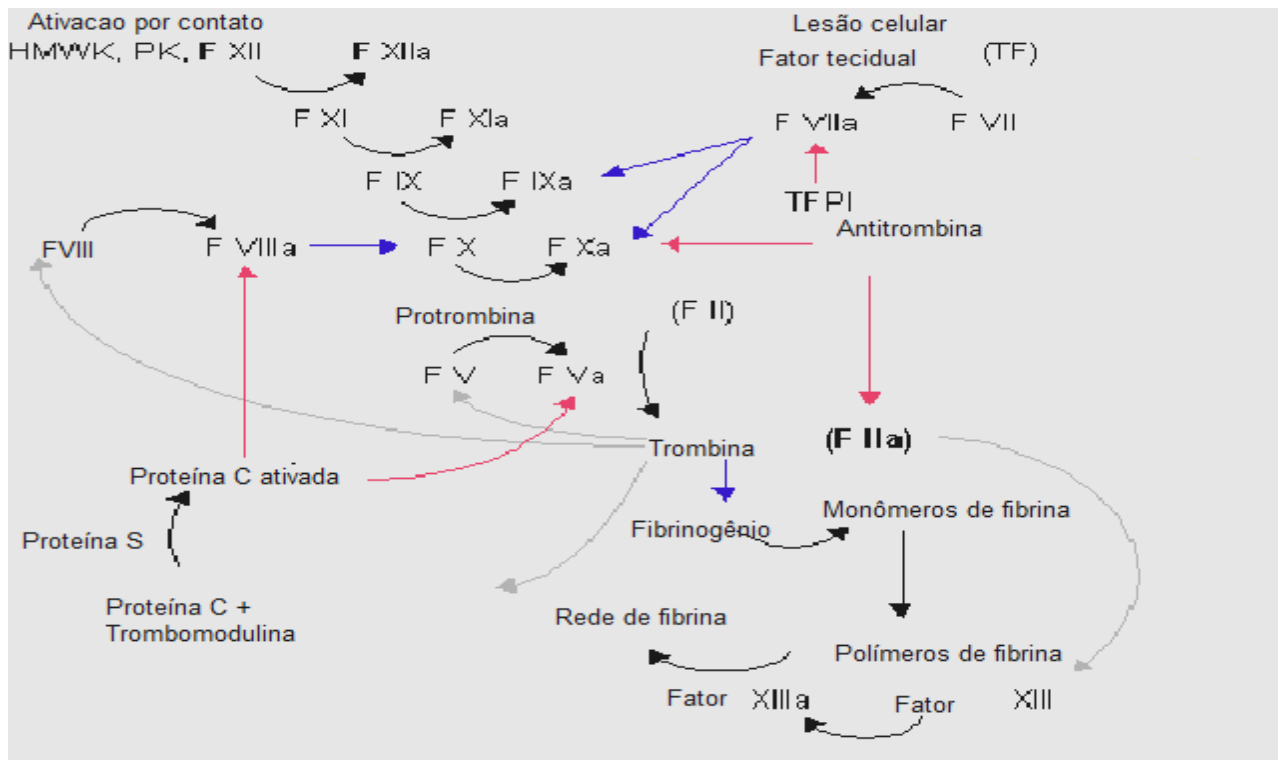


Figura 2. Representação esquemática da cascata de Coagulação, adaptada de Franco (2001).

A mutação *fator V de Leiden* é responsável por 20-40% de todos os casos de trombozes isolados e 40-45% dos casos de trombofilia familiar (KOVALEVSKY *et al.*, 2008; PARVEEN *et al.*, 2012).

Há controvérsias sobre a associação dos polimorfismos 1691G<A no gene do *fator V* e 20210G<A no gene da protrombina com abortos recorrentes, uma vez que a frequência de ambos os polimorfismos difere em várias populações. Essas mutações são mais frequentes na população europeia (5% e 3-8%) respectivamente, e praticamente ausente entre os africanos e asiáticos ( $\leq 1,0\%$ ). No Brasil, ambas as mutações estão presentes em cerca de 2,0% da população em geral (PARVEEN *et al.*, 2012; KUJOVICH, 2011).

Bradley e *cols.* (2012) realizaram uma metanálise, incluindo 116 artigos de língua inglesa, para avaliar a associação entre os polimorfismos 1691G<A no gene do *fator V* e 20210G<A no gene da protrombina e aborto recorrente. Concluíram que os dados sugerem associação entre estes polimorfismos e perdas da gravidez.

Serrano e *cols.* (2010) investigaram a prevalência dos polimorfismos 1691G<A no gene do *fator V* e 20210G<A no gene da protrombina em 100 mulheres portuguesas com três ou mais abortos consecutivos e não encontraram diferenças significativas quando compararam os casos (5% e 3%) com os controles (5% e 1%), respectivamente, enquanto Parveen e *cols.* 2012 investigaram 1.000 mulheres no Norte da Índia com aborto recorrente e observaram incidência maior do polimorfismo 1691A>G nos casos (5%) ao comparar com os controles (2,4%), com  $RP = 2,14$ .

Bagheri e *cols.* (2011) avaliaram os polimorfismos 1691G<A e 20210G<A em 70 mulheres com aborto recorrente no Irã. A mutação 1691G<A não foi encontrada nos casos nem nos controles, enquanto a mutação 20210G<A foi encontrada em heterozigose (GA) em 31% dos pacientes e 5% dos controles ( $p = 0,0001$ ), não sendo observado o genótipo homozigoto (AA).

Settin e *cols.* (2011) estudaram 142 mulheres egípcias com aborto recorrente, sem causa definida, cujos resultados mostraram frequência maior das mutações 1691G<A (23,6% versus 1,4%,  $P=0,0001$ ); 20210G<A (34,7% versus 1,4%,  $P=0,0001$ ) nos casos quando comparados aos controles, respectivamente.

### 3.2.2.2 Polimorfismo no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase

Alterações na via do folato, como deficiência de folato materno, hiperhomocisteinemia materna e polimorfismo 677TT no gene metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*), contribuem para a etiologia dos abortos recorrentes em diferentes populações (GOVINDAIAH, *et al.*, 2009).

A *MTHFR* é uma das principais enzimas que regulam o metabolismo da homocisteína. A mesma catalisa a redução de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-metilenotetrahidrofolato a N<sup>5</sup>-metilenotetrahidrofolato, forma mais comum de folato plasmático circulante, o qual, juntamente com a vitamina B12, é importante para metilação da homocisteína à metionina. A redução na atividade ou nível da *MTHFR* induz hiper-homocisteinemia e diminuição da concentração de folato (MTIRAOU, *et al.*, 2006).

O mecanismo exato de ação da hiper-homocisteinemia nos abortos espontâneos não é bem conhecido, mas algumas hipóteses a correlacionam ao aumento do potencial trombogênico e subsequente trombose placentária (MONTERRAT *et al.*, 2012; MTIRAOU *et al.*, 2006).

O principal polimorfismo genético no gene *MTHFR* consiste na substituição de citosina por timina no nucleotídeo 677 (677C>T). Esta substituição resulta na troca de alanina por valina na proteína e alteração na estrutura da enzima, deixando-a termolábil, o que leva à redução da atividade enzimática aproximadamente em 70% e 35% em indivíduos homocigotos mutantes (TT) e heterocigotos (CT), respectivamente (ZETTERBERG *et al.*, 2002; BOTTO e YANG, 2000). O gene que codifica a enzima *MTHFR* em humanos está localizado na região p36.3, no braço curto do cromossomo 1 (CASTRO *et al.*, 2003; CALLEJÓN *et al.*, 2007).

O genótipo homozigoto mutante 677(TT) predispõe ao desenvolvimento de hiperhomocisteinemia, principalmente quando associado à diminuição de folato. Essa interação genética/nutricional está relacionada ao aumento do risco de doenças vasculares e maus resultados gestacionais, tais como aborto recorrente, pré-eclâmpsia, defeito do tubo neural e óbito fetal (FROSST *et al.*, 1995; CASTRO *et al.*, 2003). No entanto, Foca e *cols.* (2000) e Cardona e *cols.* (2008) não encontraram associação entre hiperhomocisteinemia e aborto espontâneo.

Unfried e *cols.* (2002) avaliaram 133 mulheres na Áustria com história de três ou mais abortos espontâneos e 74 controles. Foi observada frequência maior do alelo mutado (T) entre os casos (34,6%), quando comparado com os controles (21,6%). Os autores concluíram que a homozigose (TT) para o alelo mutante do polimorfismo 677C>T no gene da *MTHFR* conferiu risco 3,7 vezes maior para a ocorrência de abortos espontâneos.

Montserrat e *cols.* (2012) investigaram 60 mulheres na Espanha, com três ou mais abortos recorrentes, mas não observaram diferença significativa entre os genótipos homozigotos ou heterozigotos para o polimorfismo 677C>T no gene da *MTHFR*, quando comparados com os controles.

A população em geral apresenta o alelo mutado em torno de 50% em heterozigose (CT) e em cerca de 1 a 20% em homozigose (TT). O genótipo (TT) é mais frequente em indivíduos do sul da Europa (Itália 18%, Espanha 15%) (BOTTO e YANG, 2000; ZETTERBERG *et al.*, 2002).

Um segundo polimorfismo no gene da *MTHFR* é o 1298 A>C, que corresponde a uma transição da adenina para citosina no nucleotídeo 1298 do gene, resultando na troca do resíduo de glutamato por alanina na proteína *MTHFR* (CASTRO *et al.*, 2003). Segundo os estudos de Zetterberg e *cols.* (2002) e Mtiraoui

e cols. (2006), a presença da dupla mutação C677T/A1298C aumenta o risco de aborto recorrente (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência individual e combinada dos polimorfismos C677T e A1298C no gene MTHFR em mulheres com aborto recorrente e controles, segundo (Mtiraoui et al., 2006 e Zetterberg et al., 2002).

Genótipo	Caso %	Controle %	RP	População	Autor
677CT	23,5	15	< 0,001	Tunísia	Mtiraoui et al., 2006
677TT	30	7	< 0,001		
1298AC	31	4	< 0,001		
1298CC	32,5	13,5	< 0,001		
677C/T-1298C/C	13,3	2,3	6,5		
677T/T- 1298A/C	25,5	6,9	4,6		
677CT	45	48	0,88	Grécia	Zetterberg et al., 2002
677TT	20	10,4	2,15		
1298AC	66	44	2,5		
1298 CC	3,8	10,4	0,33		
TT/AA e CT/AA	56	38	2,06		

Nair e cols. (2013) realizaram uma metanálise, incluindo cinco estudos, para investigar a associação entre o polimorfismo 1298 A>C e o aborto recorrente. Concluíram que os genótipos mutantes heterozigoto (AC) e homozigoto (CC) aumentaram significativamente o risco de aborto recorrente (RP= 1,98 e 4,80 respectivamente).

Settin e cols. (2011) investigaram, no Egito, 70 mulheres com dois ou mais abortos recorrentes, que, quando comparadas com os controles, apresentaram maior frequência dos genótipos homozigotos mutantes MTHFR 677 TT e 1298 CC e da dupla mutação 677T/1298C; no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa.

## 4 OBJETIVOS

### Geral

Investigar a associação entre alterações cromossômicas e as mutações gênicas (1691G<A, 20210G<A, 677C<T), em mulheres com dois ou mais abortos recorrentes de primeiro trimestre sem causa definida.

### Específicos

- Investigar a associação entre abortamento recorrente de primeiro trimestre e a frequência de alterações cromossômicas estruturais e numéricas nos casais.
  
- Investigar a associação entre abortamento recorrente de primeiro trimestre e os polimorfismos: no gene do *fator V de Leiden* (1691G<A); no gene da protrombina (20210G<A) e no gene da *MTHFR* (677C<T).
  
- Verificar a ocorrência simultânea dos polimorfismos 1691G<A, 20210G<A, 677C<T e das alterações cromossômicas.

## 5 CASUÍSTICA

### 5.1 Tipo do estudo

Foi realizado um estudo caso-controle para investigação de alterações cromossômicas e gênicas em casais com antecedentes de abortamento recorrente de primeiro trimestre, tendo como controles mulheres com, pelo menos, uma gestação bem-sucedida, sem história de aborto.

### 5.2 População e área do estudo

Foram estudadas 151 mulheres e 94 parceiros com história obstétrica de dois ou mais abortos consecutivos de primeiro trimestre, sem causa definida e sem filhos vivos. Destas pacientes, 40 foram atendidas no ambulatório de Aborto Habitual da Maternidade Climério de Oliveira (MCO); 06, no Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES); e 105 em duas clínicas particulares de Salvador (Clínica Aloimune= 53 e Laboratório DNA = 52), no período de janeiro de 2011 a julho de 2012. Foram excluídas, mediante avaliação do prontuário, as mulheres que induziram o abortamento, com dois abortos com parceiros diferentes, maiores de 40 anos ou portadoras de alguma doença relacionada com insucesso gestacional, como diabetes *mellitus*, doenças infecciosas (sífilis, rubéola, citomegalovírus, toxoplasmose e HIV), hipertensão arterial crônica, anomalias uterinas, positividade para anticorpos antifosfolípidos e disfunção da tireoide. Foram incluídos todos os parceiros que compareceram com a esposa, sendo que aqueles que apresentaram espermograma alterado foram encaminhados para avaliação com urologista. Os controles foram 100 mulheres saudáveis, que



deram à luz na MCO, sem história de aborto, com até 40 anos e com, pelo menos, um filho vivo, que foram triadas sequencialmente na enfermaria da MCO, mediante consulta ao prontuário e entrevista.

Foi realizada entrevista para coleta de dados demográficos, do estilo de vida (consumo de álcool, café, cigarro, medicamentos), história familiar e ambiente de trabalho.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – Fiocruz), Resolução 213/2009, e da Maternidade Climério de Oliveira, Resolução 010/2010. As pacientes incluídas no estudo responderam ao questionário epidemiológico e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), após explicação dos objetivos e finalidades do trabalho. A pesquisa obteve o financiamento do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), PROCESSO Nº: 620219/2008-4.

## **6 MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1 Coleta das amostras de sangue**

Foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubos a vácuo, contendo ácido etilenodiaminotetracético sódico (EDTA), na concentração de 1,5 mg/ml, que foram destinados à extração do DNA genômico; e mais 5 mL de sangue venoso em tubo a vácuo com heparina sódica para culturas dos linfócitos e análise dos cromossomos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasília 2001; FROSST et al., 1995; BEIGUELMAN, 1982).

### **6.2 Análise molecular**

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 300 µL de sangue total, utilizando-se o Kit QIAGENR *DNA Blood Mini Kit* (Uniscience do Brasil).

Os experimentos para investigação dos polimorfismos foram realizados no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – Fiocruz).

### **6.3 Investigação dos polimorfismos**

Após extração, o DNA foi amplificado pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos para cada gene (Quadro I). Para cada reação de PCR, foram utilizados controles negativos e positivos, com o objetivo de identificar possíveis contaminantes.

A reação de PCR foi realizada em ciclador de temperatura da GeneAmp PCR system 2400, Perkin Elmer (Indianápolis, Indiana, Estados Unidos), e o produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose (SIGMA for routine use- St Louis, MO, Estados Unidos) a 1,0% em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1X pH 8,3, corado pelo corante *Sybr Green* (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), diluído na proporção de 1:2.000 em TAE 1X e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Para acompanhar visualmente as amostras no gel, elas foram coradas pelo corante azul-de-bromofenol, xilenocianol, sacarose (0,25%/0,25%/40,0%) respectivamente, na proporção de 1:6.

Os produtos de amplificação da PCR foram submetidos à digestão com enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo, utilizando a técnica de Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP). Os produtos gerados foram analisados em gel de poliacrilamida a 7,0% e comparados aos marcadores de pares de base padrão, para identificação dos genótipos.

Quadro I. Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos e enzimas de restrição utilizados para investigação dos polimorfismos gênicos.

Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos (5'-3')	Mutação	Enzima de restrição
D: TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA R: AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG'	<b>677C&lt;T da <i>MTHFR</i></b>	<b><i>Hinf I</i></b>
D: TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC R: ATA GCA CTG GGA GCA TTG AAG C	<b>20210G&lt;A <i>Protrombina</i></b>	<b><i>Hind III</i></b>
D: TGC CCA AGT GCT TAA CAA GAC CA R: CTT GAA GGA AAT GCC CCA TTA	<b>1691G&lt;A <i>FV Leiden</i></b>	<b><i>MnII</i></b>

D- direto, R- reverso

**Protocolo para PCR dos polimorfismos: 677C<T no gene *MTHFR*; 1691G<A no gene *Fator V* e 20210G<A no gene protrombina.**

A reação de PCR foi realizada em tampão composto por 200mM de Tris-HCL; 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); solução de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) na concentração de 10 μM; 12,5 pmoles de cada *primer*, (direto/ reverso) e 3U da enzima *Taq DNA Polimerase* (*Invitrogen* - Carlsbad, California, Estados Unidos), para um volume final de 50 μL. A amplificação do DNA foi realizada em ciclador de temperatura com etapa inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C e um minuto a 72 °C e um ciclo final de 72°C por 5 minutos (FROSST *et al.*1995), para obtenção dos produtos finais:

- a) *MTHFR*677C<T: fragmento de 198pb;
- b) *FV*1691G<A: fragmento de 116 pb;
- c) Protrombina/20210G<A: fragmento de 345 pb.

**Protocolo para RFLP para o polimorfismo 677C<T**

Após a amplificação, o DNA foi digerido com a enzima de restrição *Hinf* I (*New England Biolabs Inc.* - Ipswich, MA, Estados Unidos). A reação foi realizada com a utilização de uma solução de 2 μL do tampão NEBuffer 4 concentrado 10x (Biolabs - Ipswich, MA , Estados Unidos) (50mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCL, 10mM de MgCl<sub>2</sub>); 3U da enzima de restrição *Hinf* I; 7,7 μL de água estéril e 10 μL do produto de PCR, para um volume final de 20 μL, seguido de incubação a 37°C por 8 horas.

Os indivíduos com genótipo homocigoto selvagem (CC) mantiveram o fragmento original de 198 pb, o genótipo heterocigoto (CT) os fragmentos de 198 pb, 175 pb e 23 pb, e o genótipo homocigoto mutante (TT) os fragmentos de 175 e 23pb.

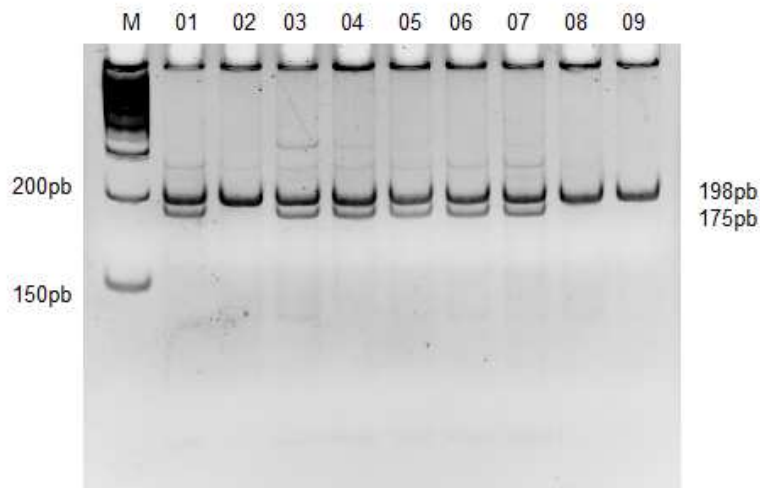


Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,0%, demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo C677T no gene MTHFR: posições 01, 03, 04, 05, 06 e 07 – indivíduos heterocigotos (CT); posições 02, 08 e 09 – indivíduos com genótipo homocigoto selvagem. M: marcador de 50 pb.

### Protocolo para RFLP para o polimorfismo 1691G<A

Após a amplificação, o DNA foi submetido à digestão com a enzima de restrição *MnII* (*New England Biolabs* - Ipswich, MA , Estados Unidos). A reação foi realizada com a utilização de uma solução de 3  $\mu$ L do tampão NEBuffer 4 concentrado 10x (*Biolabs*- Ipswich, MA , Estados Unidos): 50mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCL, 10mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5  $\mu$ L da enzima de restrição *MnII*; 0,3  $\mu$ L do purificado BSA 10X (*Biolabs*- Ipswich, MA, Estados Unidos); 6,2  $\mu$ L de água estéril livre de Dnase e Rnase e 10  $\mu$ L do produto de PCR, para um volume final de 20  $\mu$ L, seguido de incubação a 37°C por 8 horas. Os indivíduos com o genótipo homocigoto

selvagem (GG) mostraram fragmentos de 116pb, 67pb e 37pb; o genótipo heterozigoto (GA) mostrou fragmentos de 153 pb, 116pb, 67pb e 37pb, e o genótipo homozigoto (AA) mutante fragmentos de 153 pb, 67pb e 37pb.

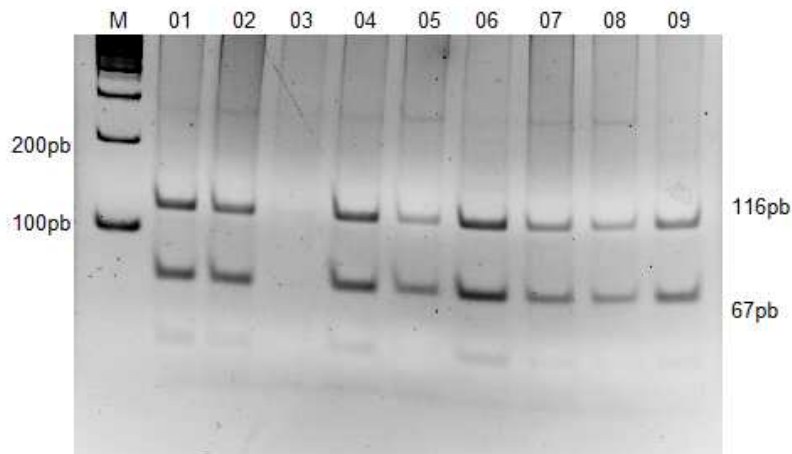


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,0%, demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo 1691G>A no gene do Fator V. Posições 01, 02, 04, 05, 06, 07, 08, 09 – indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (GG). M: marcador de 100 pb.

#### **Protocolo para RFLP para o polimorfismo 20210G<A**

Após a amplificação, o DNA foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Hind* III (*New England Biolabs*- Ipswich, MA, Estados Unidos). A reação foi realizada com a utilização de uma solução de 2  $\mu$ L do tampão NEBuffer 2 concentrado 10x; 0,2  $\mu$ L da enzima de restrição *Hind* III; 7,8  $\mu$ L de água estéril e 10  $\mu$ L do produto de PCR, para um volume final de 20  $\mu$ L. Seguido de incubação a 37°C por 8 horas. Indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (GG) apresentaram o fragmento original de 345 pb, o genótipo heterozigoto (GA), os fragmentos de 345pb e 322pb, e o genótipo homozigoto mutante (AA), o fragmento de 322pb.

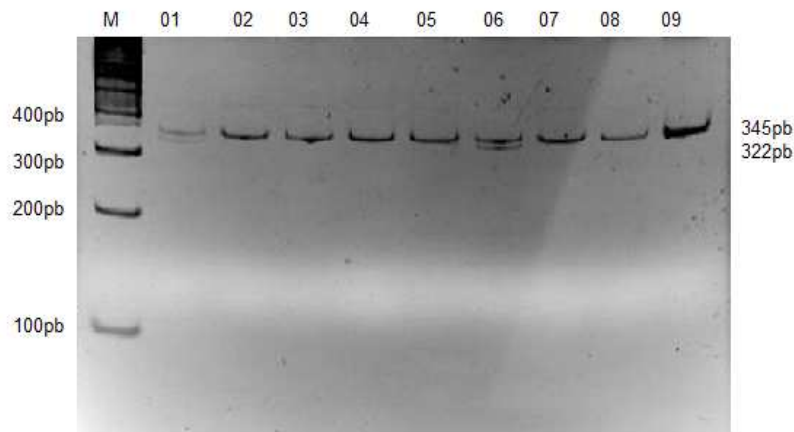


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,0%, demonstrando os fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR para o polimorfismo 20210G-A no gene da protrombina. Nas posições 01 e 06, são mostrados indivíduos heterozigotos (GA); nas posições 02, 03, 04, 05, 07, 08 e 09, indivíduos com genótipo homozigoto selvagem. M: marcador de 100 pb.

#### 6.4 Estudo das alterações cromossômicas

A investigação das alterações cromossômicas foi realizada por meio da análise do cariótipo dos indivíduos na Maternidade Climério de Oliveira, no Serviço de Genética Médica do HUPES e na Clínica Aloimune (30% dos indivíduos) e mediante consulta do resultado do cariótipo nos prontuários no Laboratório DNA e na Clínica Aloimune (70% dos indivíduos).

##### *Culturas de linfócitos de sangue venoso para obtenção dos cariótipos*

De cada indivíduo, foram realizadas duas culturas de 5 mL de meio RPMI 1640 (CULTILAB - Campinas, SP, Brasil), 20,0% de soro bovino fetal (CULTILAB), 2,0% de fitohemaglutinina (CULTILAB) e 18 gotas de sangue total, cultivadas a 37 °C por 72 horas. Adicionou-se 0,1 mL de colcemid (CULTILAB) 1 hora antes de

completar as 72 horas. Após quarenta e cinco minutos, as culturas foram tratadas com técnicas citológicas, para obtenção dos cromossomos e preparação das lâminas (BEIGUELMAN, 1982). As lâminas foram tratadas com tripsina - DIFCO (San Jose, Califórnia, Estados Unidos) a 1,5% entre 2 e 15 segundos e coradas com Giemsa (MERCK- Rockland, Massachusetts, Estados Unidos) para obtenção do padrão de bandeamento G (SEABRIGHT, 1971).

As culturas de linfócitos e a análise citogenética foram realizadas no Laboratório de Genética Humana e Biologia Molecular, no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

#### Análise Citogenética

Após a preparação, as lâminas foram identificadas com uma numeração, para que a análise fosse realizada sem identificar o indivíduo (teste cego).

Para investigar a presença de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, foram analisadas 30 metáfases de cada indivíduo; nos casos de mosaïcismo, foram analisadas 50 metáfases.

Para realizar a análise, as metáfases eram escolhidas pela qualidade técnica, ao microscópio de luz na objetiva de 10X. Uma vez selecionada a metáfase, mudava-se para a objetiva de imersão (100X). Inicialmente contavam-se os cromossomos; as células contendo menos que 45 cromossomos eram desprezadas e procurava-se outra metáfase. Em cada metáfase, os 46 cromossomos eram identificados através do padrão específico de bandas, seguido do desenho das



células que apresentavam metáfases alteradas, para investigar possíveis translocações e o ganho ou perda de cromossomos específicos.

## **6.5 Análise estatística**

A distribuição das variáveis quantitativas foi determinada usando o teste Kolmogorov-Smirnov. As médias das variáveis quantitativas entre dois grupos foram comparadas usando teste T Student independente para os dados com distribuição normal e Mann-Whitney para os dados com distribuição não normal. Os testes de Kruskal-Wallis (não paramétrico) e ANOVA (paramétrico) foram utilizados para comparar médias entre três ou mais grupos. A análise de correlação bivariada foi realizada para determinar correlação entre pares de variáveis, usando os testes de Pearson e Spearman. O valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo para os testes realizados. Foram utilizados os *softwares* EPI-INFO 6.04 e SPSS 17.0.

## 7 RESULTADOS

A idade média das mulheres com aborto de repetição (casos) foi de  $32,14 \pm 4,35$  anos, variando entre 19 e 40 anos e dos parceiros foi de  $35,4 \pm 7,22$ , variando entre 22 e 47 anos. No grupo controle, a idade média foi de  $25,80 \pm 6,47$ , variando entre 16 e 40 anos ( $p = 0,000$ ). A idade das mulheres com perdas recorrentes foi estratificada em três categorias:  $\leq 30$  anos (37%),  $>30 <35$  anos (47,9%) e  $> 35$  anos (15,1%).

Os casos foram selecionados em três instituições com condições socioeconômicas distintas, mas, quando comparadas as frequências das alterações cromossômicas ( $p= 0,442$  e  $p= 0,320$ ) e gênicas 677C-T, 1691G-A e 2021G-A ( $p= 0,817$ ;  $p= 0,618$  e  $p= 0,859$ ) respectivamente, entre os três grupos, não houve diferença significativa. Esta constatação permitiu que, ao longo do trabalho, as pacientes fossem analisadas como um todo.

Os casos apresentaram um número médio de perdas gestacionais de  $2,8 \pm 1,0$ , variando entre duas e sete. Foi observada maior frequência de indivíduos no grupo com duas perdas 47,6%, seguido do grupo com três perdas, 37,7% (Tabela 2).

Quando se correlacionou o número de abortamentos com a idade das pacientes, verificou-se que 22 das que tiveram quatro ou mais abortos (Tabela 2) tinham a idade média de 36,8 anos. A análise de correlação mostrou significância entre idade das pacientes e número de perdas ( $p=0,003$ ).

Tabela 2. Número de abortos das mulheres com história de perdas recorrentes da gravidez.

N. Perdas	N. de pacientes	%
2	72	47,6%
3	57	37,7%
4	11	7,2%
5	6	3,9%
6	4	2,6%
7	1	0,6%
Total	151	100%

No presente estudo, o estado civil predominante entre as mulheres era a união estável 97,8% (45/46) nos casos e 80% (80/100) nos controles, seguido do estado civil solteira 2,2% (1/46) nos casos e 19% (19/100) nos controles ( $p = 0,021$ ).

Os dados relacionados aos hábitos de vida foram obtidos de 46 mulheres dos 151 casos e de 96 mulheres dos 100 controles. O hábito de tomar café foi observado em 76% (35/46) dos casos e em 86,4% (83/96) dos controles ( $p = 0,184$ ). O consumo social de bebida alcoólica foi mais frequente nos casos 54,3% (25/46) que nos controles 43,7% (42/96),  $p = 0,154$ ; quanto ao hábito de fumar, este foi mais frequente nos controles 11,4% (11/96) que nos casos 4,3% (2/46),  $p = 0,155$ . No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os casos e os controles.

Quanto à exposição ocupacional, as pacientes não se referiram a funções que representassem possíveis fatores de risco ambiental.

## 7.1 Alterações cromossômicas

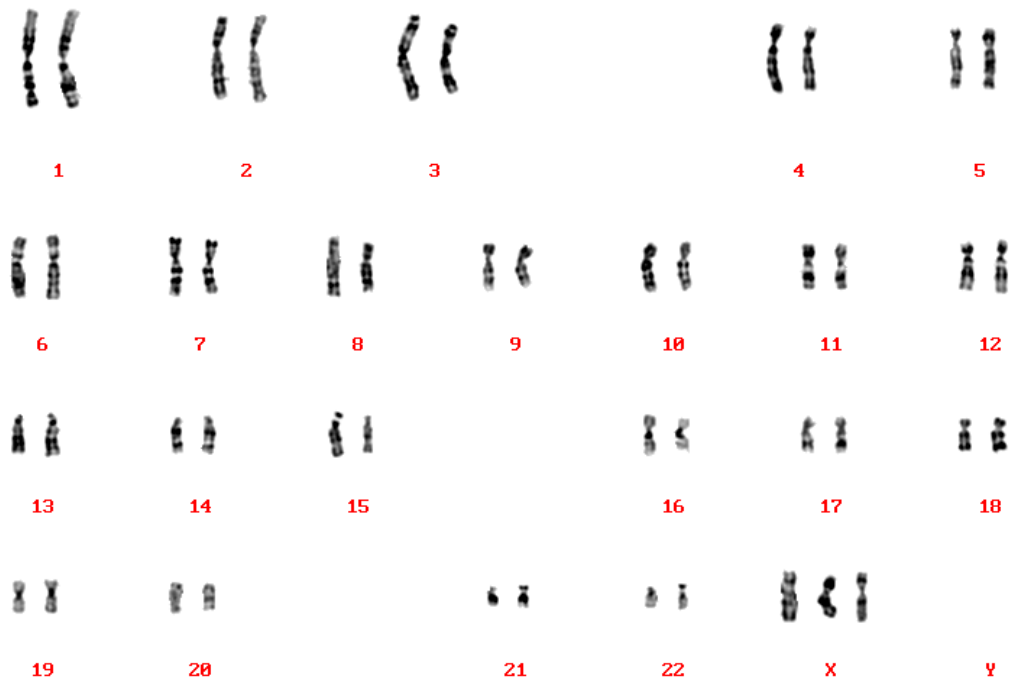


Figura 6. Metáfase mostrando trissomia do cromossomo X, observada em uma das mulheres com aborto recorrente (47,XXX).

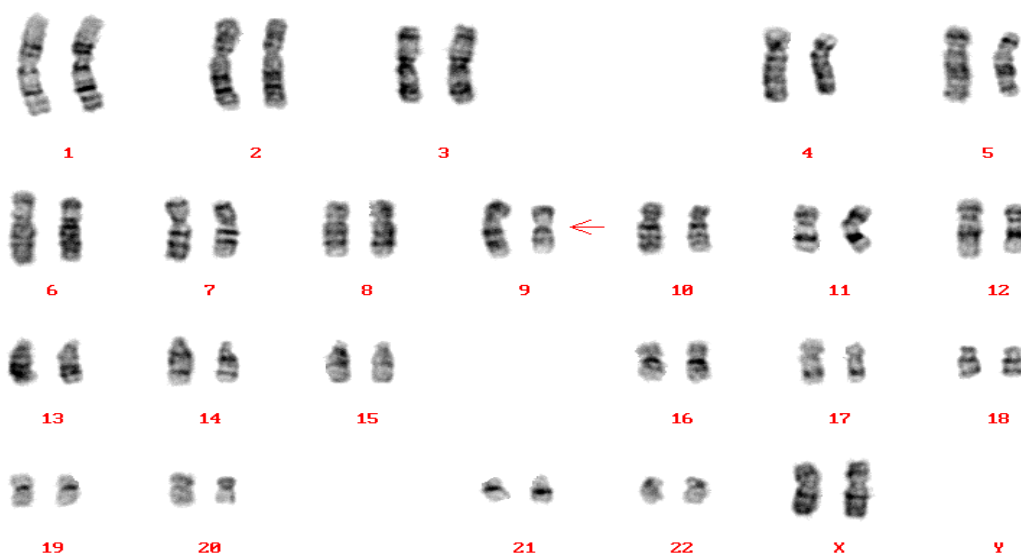


Figura 6. Metáfase mostrando inversão do cromossomo 9, observada em uma mulher do grupo controle.

A Tabela 3 mostra a frequência de alterações cromossômicas nas mulheres do grupo caso, nos parceiros e nas mulheres do grupo controle. O grupo de mulheres com perdas gestacionais apresentou frequência de 7,3% e os controles 1% para as alterações cromossômicas ( $p=0,022$ ).

A associação entre aborto recorrente (caso x controle) e alterações cromossômicas apresentou  $OR=7,7$  (IC 95% 1,29-170,5).

A frequência das alterações cromossômicas observada no grupo dos pais (2,1%) foi menor que no grupo das mães com perdas gestacionais (7,3%), mas a diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa ( $p=0,896$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência das alterações cromossômicas no grupo de parceiros, mulheres do grupo caso e mulheres do grupo controle.

Indivíduos	Cariótipo				Total
	Normal	%	Alterado	%	
Casos	140	92,7%	11	7,3%	151
Parceiros	92	97,8%	02	2,1%	94
Controles	99	99%	01	1%	100

As alterações cromossômicas numéricas 07 (4,7%) foram mais frequentes que as estruturais 04 (2,6%) no grupo das mulheres com perdas fetais. As alterações numéricas observadas foram mosaicismo envolvendo os cromossomos sexuais. As estruturais corresponderam a três translocações recíprocas [t(11;18); t(2;12) e t (11;17)] e uma robertsoniana [rob (14;21) ] (Tabela 4). No entanto, não

houve diferença estatisticamente significativa entre as alterações numéricas e estruturais ( $p=0,104$ ).

No grupo dos parceiros, foi observado um caso (1,05%) de alteração numérica (mosaicismo do cromossomo X) e outro (1,05%) estrutural (inversão do cromossomo 18) (Tabela 4). Em nenhum dos grupos, as alterações numéricas e estruturais foram encontradas simultaneamente.

Tabela 4. Alterações cromossômicas no grupo das mulheres com aborto de repetição, parceiros e controles.

CASOS	N	%	CONTROLES	N	%	PARCEIROS	N	%
<b>Alterações estruturais</b>								
46,xx t(11;18) (q25;q21)	1					46,XY inv(18)q10	1	
46,xx t (11;17)	1							
46,xx t(2;12)	1							
45,xx rob (14;21) (q10q10)	1							
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>2,6</b>			<b>--</b>		<b>1</b>	<b>1,05</b>
<b>Alterações numéricas</b>								
46,xx/47,xxx			46,xx/47,xxx	1		46,xy/47,xyy	1	
46,xx/47,xxx/45,x								
46,xx/49,xxxxx/45,x								
46,xx/49,xxxxx								
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>4,7</b>		<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>	<b>1,05</b>

Após a estratificação das idades das mulheres com aborto recorrente, observou-se maior frequência de alterações cromossômicas na faixa etária entre 30 e 35 anos de idade (11,2%), quando comparada com as mulheres com menos de 30

anos (3,6%). No entanto, não foi observada associação entre a idade materna e a frequência de alterações cromossômicas,  $p = 0,362$  (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência das alterações cromossômicas das mulheres com aborto recorrente correlacionada com as idades estratificadas.

IDADE	CARIÓTIPO				TOTAL
	NORMAL	%	ALTERADO	%	
Idade $\leq 30$	54	96,4%	02	3,6%	56
Idade $>30 <35$	64	88,8%	08	11,2%	72
Idade $> 35$	22	95,6%	01	4,4%	23

Valor  $p$ : 0,362

As variações estruturais normais foram observadas em sete (4,6%) das 151 mães com abortamento e em seis (6,4%) dos 94 pais (Tabela 6). A variação mais frequente nas mães foi 9qh+ (03), região de heterocromatina aumentada do cromossomo 9, seguida por 16qh+ (02), região de heterocromatina aumentada do cromossomo 16; um caso de inversão do cromossomo 9 (inv 9p) e um caso apresentou o cromossomo 21 com a haste do satélite aumentada.

No grupo dos pais, a única variação encontrada foi a região de heterocromatina aumentada do cromossomo 9 (9qh+) em 06 casos, cuja frequência correspondeu a 3 vezes mais à encontrada nas mulheres (Tabela 6).

Tabela 6. Variações normais observadas na estrutura dos cromossomos no grupo das mulheres com perdas recorrentes, no grupo dos parceiros e nos controles.

	VARIANTES NORMAIS	N	%	Total	%
CASOS	46,XX inv (9p)	1	0,67%		
	46,XX,21pstk+	1	0,67%		
	46,xx,9qh+	3	2%		
	46,XX,16qh+	2	1,3%	7	4,6%
CONTROLES	46,XX inv (9p)	3	3%	3	3%
PARCEIROS	46xy9qh+	6	6,4%	6	6,4%

## **Análise combinada**

A análise de confundimento potencial e de interação das covariáveis fumo, álcool e café foi prejudicada por perdas no número de indivíduos do grupo caso (das 151 mulheres com aborto recorrente, foram obtidos os dados de 46 indivíduos).

Assim, o pequeno número amostral impediu a realização da análise.

## **7.2 Alterações gênicas**

7.2.1 Investigação dos polimorfismos C677T no gene da *MTHFR*, 1691G-A no gene do Fator V e 20210G-A no gene da protrombina.

Das 151 mulheres com aborto recorrente que participaram do estudo, foram obtidos os resultados dos polimorfismos C677T no gene *MTHFR* de 137 indivíduos; do polimorfismo 1691G-A no gene do *Fator V* de 136 indivíduos; e do polimorfismo 20210G-A no gene da protrombina de 138 indivíduos.

A distribuição das frequências alélicas dos polimorfismos 677C<T no gene da *MTHFR*, 1691G<A no gene do *Fator V* e 2021G<A no gene da protrombina está em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto nos casos ( $p > 0,5$ ), quanto nos controles ( $p > 0,5$ ).

A Tabela 7 mostra a distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, *FVL* e protrombina das mulheres com aborto de repetição e dos controles. A frequência do polimorfismo 677C-T no gene da *MTHFR* foi bastante similar entre casos e controles. Nos casos, a frequência do genótipo selvagem (CC) foi de 58,4%, do heterozigoto (CT), 37,2% e do homozigoto (TT), 4,4%. Os controles apresentaram frequência de 59% para o genótipo selvagem



(CC), 37% para o heterozigoto (CT) e 4% para o homozigoto (TT). Não houve diferença significativa quando comparados casos e controles ( $p=0,975$ ).

A frequência do polimorfismo 1691G<A no gene do *Fator V* não foi estatisticamente diferente entre casos e controles ( $p= 0,491$ ). A frequência do genótipo homozigoto selvagem (GG) foi 97,1% x 98% e do heterozigoto (GA) foi 2,9% x 2% em casos e controles respectivamente. Já o homozigoto mutante AA não foi observado tanto nos casos quanto nos controles.

A frequência do polimorfismo 2021G<A no gene protrombina foi de 97,1% para o genótipo homozigoto selvagem (GG) e 2,9% para o heterozigoto (GA); o homozigoto mutante (AA) não foi observado. Os controles apresentaram frequência de 100% para o genótipo homozigoto selvagem (GG), não sendo detectados os genótipos heterozigoto (GA) e homozigoto mutante (AA).

Tabela 7. Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes MTHFR, FVL e Protrombina nas mulheres com aborto de repetição e nos controles.

GENÓTIPOS	CASOS		CONTROLES		P
	N.	%	N.	%	
<b>677 MTHFR</b>					
<b>C&gt;T</b>					
Homozigoto Selvagem	80	58,4%	59	59%	
Heterozigoto	51	37,2%	37	37%	
Homozigoto Mutante	06	4,4%	4	4%	
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>100%</b>	<b>100</b>	<b>100%</b>	<b>*0,975</b>
<b>1691 FVL</b>					
<b>G&gt;A</b>					
Homozigoto Selvagem	132	97,1%	98	98%	
Heterozigoto	4	2,9%	2	2%	
Homozigoto Mutante	0	--	0	0	
<b>Total</b>	<b>136</b>	<b>100%</b>	<b>100</b>	<b>100%</b>	<b>**0,491</b>
<b>2021 PROT</b>					
<b>G&gt;A</b>					
Homozigoto Selvagem	134	97,1	100	100%	
Heterozigoto	4	2,9	0	0	
Homozigoto Mutante	0	--	0	0	
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100%</b>	<b>**0,107</b>

\* $\chi^2$ : 0,051    \*\* Fisher`s Exact Test

Conforme a Tabela 8, quando comparados casos e controles, a análise estatística não mostrou diferença significativa entre as frequências alélicas dos polimorfismos no gene *MTHFR* 677C<T (23% x 22,5%), no gene do *Fator* V1691G<A (1,5% x 1%) e no gene protrombina 2021G<A (1,4% x 0%) respectivamente ( $p= 0,479$ ;  $p= 0,491$  e  $p= 0, 107$ ).

Tabela 8. Frequências alélicas dos polimorfismos no gene MTHFR 677C<T, no gene do Fator V1691G<A e no gene protrombina 2021G<A, no grupo de mulheres com perdas recorrentes e controles.

ALELOS	CASOS		CONTROLES		P
	N	%	N	%	
<b>1691 FVL</b>					
<b>G&gt;A</b>					
Homozigoto Selvagem	268	98,5%	198	99%	
Mutante	4	1,5%	02	1%	
<b>Total</b>	<b>272</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>	<b>**0,491</b>
<b>677 MTHFR</b>					
<b>C&gt;T</b>					
Homozigoto Selvagem	211	77%	155	77,5%	
Mutante	63	23%	45	22,5%	
<b>Total</b>	<b>274</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>	<b>*0,479</b>
<b>2021 PROT</b>					
<b>G&gt;A</b>					
Homozigoto Selvagem	272	98,5%	200	100%	
Mutante	4	1,4%	--	--	
<b>Total</b>	<b>276</b>	<b>100%</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>	<b>**0,107</b>

\*X<sup>2</sup>: 0,035

\*\* Fisher`s Exact Test

A Tabela 9 mostra a frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes *MTHFR*677C<T, *Fator V* 1691G<A e protrombina 2021G<A, segundo a estratificação das idades das mulheres com aborto recorrente em dois grupos: com 30 anos ou menos e com 31 anos ou mais. A frequência do genótipo mutante dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, *Fator V* e protrombina foi maior no grupo das mulheres com 31 anos ou mais (65%, 100% e 75%). No entanto, não foi encontrada diferença significativa quando comparadas com as frequências do grupo de mulheres com idade ≤ 30 anos (35%, 0% e 25%, respectivamente). Não foi evidenciada correlação entres os genótipos mutantes nos genes *MTHFR*, *Fator V* e Protrombina e a idade materna (p= 0,620, 0,471 e 0,307, respectivamente).

Tabela 9. Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, Fator V e Protrombina e sua associação com a idade estratificada das mulheres com aborto recorrente.

GENÓTIPOS	IDADE	≤ 30 %	IDADE ≥31 %	TOTAL	V ALOR P
<b><i>MTHFR677C-T</i></b>					
Homozigoto Selvagem	32	40,5%	47 59,5%	79	
<b>Mutante</b>	<b>20</b>	<b>14,7%</b>	<b>37 65%</b>	<b>57</b>	0,620
<b><i>FVL1691G-A</i></b>					
Homozigoto Selvagem	51	35%	80 65%	131	
<b>Mutante</b>	<b>0</b>	<b>--</b>	<b>04 100%</b>	<b>04</b>	0,471
<b><i>PROT2021G-A</i></b>					
Homozigoto Selvagem	51	38,3%	82 61,7%	133	
<b>Mutante</b>	<b>01</b>	<b>25%</b>	<b>03 75%</b>	<b>04</b>	0,307

*Fisher`s Exact Test*

A Tabela 10 mostra a frequência genotípica dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, Fator V e Protrombina correlacionada com o número de abortos: três ou menos e mais que três. A frequência do genótipo mutante dos polimorfismos *MTHFR* 677C< T e Protrombina 2021G< A foi maior no grupo de pacientes com mais de três abortos (57,2% e 9,5%), quando comparado ao grupo com três abortos ou menos (39,1% e 1,8%), respectivamente. Já a frequência do genótipo mutante *Fator V* 1691G<A foi maior no grupo de mulheres com três abortos ou menos (3,5%), quando comparado com as mulheres com mais de três abortos (0%). No entanto, não foi observada associação entre a frequência dos genótipos mutantes dos polimorfismos nos genes *MTHFR*, Fator V e Protrombina e o número de abortos ( $p=0,098$ ,  $0,504$  e  $0,111$ ) respectivamente.

Tabela 10. Frequência genotípica dos polimorfismos nos genes MTHFR, Fator V e Protrombina e sua associação com o número de abortos.

GENÓTIPO	NÚMERO DE ABORTOS				VALOR P
	Abortos ≤ 3		Abortos >3		
<b>MTHFR677C-T</b>					
Homozigoto Selvagem	70	60,9%	09	42,8%	
<b>Mutante</b>	<b>45</b>	<b>39,1%</b>	<b>12</b>	<b>57,2%</b>	0,098
Total	115		21		
<b>FVL 1691G-A</b>					
Homozigoto Selvagem	110	96,5%	21	100%	
<b>Mutante</b>	<b>04</b>	<b>3,5%</b>	<b>0</b>		0,504
Total	114		21		
<b>PROT 2021G-A</b>					
Homozigoto Selvagem	114	98,2%	19	90,5%	
<b>Mutante</b>	<b>02</b>	<b>1,8%</b>	<b>02</b>	<b>9,5%</b>	0,111
Total	116		21		

*Fisher's Exact Test*

A Tabela 11 mostra a distribuição dos genótipos mutantes dos polimorfismos: MTHFR 677C>T, Fator V 1691G>A e protrombina 2021G>A, quando correlacionados com as alterações cromossômicas no grupo de mulheres com abortos recorrentes. Dos 57 genótipos mutantes MTHFR 677C>T, apenas três (5,3%) apresentaram alterações cromossômicas. Já as mulheres com genótipos mutantes para os polimorfismos Fator V 1691G>A (quatro) e protrombina 2021G>A (quatro), nenhuma apresentou alteração cromossômica. Assim, não foi observada associação entre os genótipos mutantes dos referidos polimorfismos e a presença de alterações cromossômicas ( $p= 0,328$ ,  $0,756$  e  $0,714$ ) respectivamente.

Tabela 11. Frequência dos genótipos mutantes MTHFR677C>T, FVL1691G>-A e PROT 2021G>A correlacionada com as alterações cromossômicas no grupo de mulheres com aborto recorrente.

GENÓTIPO	CARIOTIPO				TOTAL	VALOR P
	NORMAL %		ALTERADO %			
<b>MTHFR677C-T</b>						
Homozigoto	72	91%	07	9%	79	
Selvagem						
Mutante	<b>54</b>	<b>94,7%</b>	<b>03</b>	<b>5,3%</b>	<b>57</b>	0,328
<b>FVL 1691G-A</b>						
Homozigoto	122	93%	09	7%	131	
Selvagem						
Mutante	<b>04</b>	<b>100%</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>04</b>	0,756
<b>PROT 2021G-A</b>						
Homozigoto	123	92,4%		7,6%	133	
Selvagem	10					
Mutante	<b>04</b>	<b>100%</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>04</b>	0,714

*Fisher`s Exact Test*

## 8 DISCUSSÃO

O estudo avaliou as alterações cromossômicas e os polimorfismos nos genes da *MTHFR*, Fator V e Protrombina em 151 mulheres com história de dois ou mais abortamentos no primeiro trimestre da gestação e respectivos controles.

A média de idade, de 32 anos, das mulheres com perdas gestacionais nesse estudo foi similar à encontrada por Pal *et al.* (2009) e Montserrat *et al.* (2012), que descreveram a idade de 33 e 34, respectivamente.

Este estudo evidencia que as mulheres do grupo caso e também os controles iniciaram a vida reprodutiva precocemente, ou seja, 19 e 16 anos respectivamente. Sendo mais precoce no grupo controle, cujas mulheres, muitas vezes, ainda adolescentes tiveram uma gravidez não planejada.

Do ponto de vista conceitual, considera-se abortamento de repetição quando ocorrem três interrupções consecutivas da gestação; todavia, neste trabalho, foram incluídas pacientes a partir de duas perdas, o que representou aproximadamente metade da população estudada (47,6%). Esses achados decorrem do fato de que, na prática clínica, há grande demanda dos casais por iniciar a investigação a partir de dois abortamentos. Outros estudos também incluíram mulheres a partir de dois abortamentos (SETTIN *et al.*, 2011; FOCA *et al.*, 2000).

No grupo dos casos, 97,8% afirmaram que vivem em regime de união estável, o que lhes proporciona suporte emocional para as tentativas de êxito nas gestações. Nos trabalhos consultados, a avaliação é geralmente realizada nos casais, o que traduz o envolvimento e suporte emocional advindos da vida familiar (KISS *et al.*, 2009; MEZA *et al.*, 2008). O fato de a maioria estar em união estável traduz a

intenção de constituir uma família, uma vez que, sem o apoio do parceiro, seria difícil persistirem frente às frustrações repetidas.

Horne e *cols.* (2005) sugerem que hábitos de vida, como uso de bebida alcoólica, cigarro e consumo excessivo de café, são considerados fatores de risco para aborto recorrente. Os estudos têm sugerido o aumento nas taxas de abortamento em mulheres com hábitos de ingestão elevada de cafeína, quatro a cinco xícaras por dia (WETHERSBEE *et al.*, 1977; SIMPSON *et al.*, 2007). Em relação à bebida alcoólica, não existe uma dose a ser ingerida com segurança na gravidez. No entanto, o risco mostra-se maior quando o consumo é elevado e frequente, especialmente no primeiro trimestre da gestação (NEME *et al.*, 2005). A via de ação do álcool e seus efeitos deletérios no feto não são bem definidos. Acredita-se que haja toxicidade direta, sendo que um dos seus metabólitos (acetaldeído) é teratogênico e acumula-se no feto (GARCÍA-ENGUÍDANOS *et al.*, 2002).

O hábito de fumar (mais de 10 cigarros) por dia mostrou associação com aumento das taxas de perdas gestacionais. Muitos componentes do cigarro têm sido considerados possíveis toxinas, especialmente a nicotina, para explicar a sua relação com os abortos (NEME *et al.*, 2005; SIMPSON, 2007).

No presente estudo, o consumo de álcool foi mais frequente no grupo das mulheres com perdas gestacionais (54,3%) que nos controles (43,7%). No entanto, não foi constatada diferença estatisticamente significativa quando comparado os dois grupos.



## 8.1 Alterações cromossômicas

Foi observada associação entre alterações cromossômicas e aborto recorrente no primeiro trimestre da gestação, no grupo de mulheres estudado. Mulheres com alterações cromossômicas tiveram 7,7 vezes mais chances de ter aborto de repetição. Sendo a frequência das alterações cromossômicas de (7,3%) no grupo de mulheres com abortamentos, e de (1%) nos controles ( $p=0,022$ ). Esta frequência de AC é semelhante à observada nos estudos de Pal *et al.* (2009) e Kiss *et al.* (2009) (8,9% e 9,3%), respectivamente, e difere daquelas referidas por Celep *et al.* (2006) e Ozawa *et al.* (2008), que encontraram frequências de alterações cromossômicas menores, isto é, de 3,8% e 4,9%, respectivamente.

Neste estudo, apenas 94 pais compareceram para realização do cariótipo. Desses, somente dois (2,1%) tiveram alterações cromossômicas, o que não revelou significância estatística quando comparado com o grupo das mães com perdas gestacionais. Apesar de os casais com antecedentes de abortamento de repetição apresentarem grande motivação para identificação da etiologia das perdas, o não comparecimento do parceiro para realização do cariótipo ainda é grande, fato que dificulta a caracterização de todos os casos.

A revisão da literatura mostra que, entre 4,7% e 12,5% dos casais com dois ou mais abortos espontâneos, um dos parceiros apresenta alteração cromossômica (PAL, *et al.*, 2009; KOCHHAR *et al.*, 2012; MERE, L *et al.*, 2012). Tais estudos correlacionam esta variabilidade a diferenças do tamanho amostral e aos critérios de seleção dos indivíduos, como número de abortamentos e exclusão daqueles com etiologia já definida. No presente estudo, a frequência de alteração cromossômica

de 7,3% decorreu provavelmente da rigorosa seleção dos casos de abortamento precoce com causa não identificada.

As alterações cromossômicas foram observadas em 11 mulheres com perdas gestacionais, sendo: mosaicismo do cromossomo X, sete casos (63,7%); translocações recíprocas, três casos (27,3%); e translocação robertsoniana, um caso (9%). Quanto aos casos de mosaicismo do cromossomo X, a frequência observada (63,7%) foi superior à referida na literatura, onde tem sido descrita entre 0 e 30% dos casos. Contudo, resultados similares foram encontrados nos trabalhos de Kiss *et al.* (2009) e PAL *et al.* (2009), que descreveram 50% e 48%, respectivamente. A discrepância dos nossos dados e desses autores pode estar relacionada ao tipo de amostra selecionada (inclusão de abortos de primeiro e segundo trimestres e natimortos) e ao número de metáfases analisadas; no presente estudo, foram analisadas 30 metáfases por indivíduo e, na maior parte dos trabalhos consultados, foram analisadas entre 15 e 20 células por indivíduo. Segundo Kiss e *cols.* (2009), quanto maior o número de metáfases analisadas, maior a chance de se detectar um mosaicismo de menor grau.

Entre os casos de mosaicismo, destacaram-se os de Síndrome de Turner, com detecção de quatro casos (57,14%) – três 46,XX/47,XXX/45,X e um 46,XX/49,XXXXX/45. A incidência de abortamentos e natimortos nos pacientes com estas alterações varia entre 25 e 30% e entre 6 e 8%, respectivamente, o que está relacionado à diminuição da função ovariana, disfunção autoimune e anormalidades uterinas (KISS *et al.*, 2009). As linhagens celulares com triplo X (46,XX/47,XXX) também têm sido descritas em amostras de casais com abortamento. No presente trabalho, elas foram encontradas em cinco casos (71,4%) e um caso de 46,XX/49,XXXXX (14,3%).

O aumento da frequência de mosaicismos do cromossomo X tem sido descrito em mulheres com aborto recorrente. No entanto, ainda não se sabe qual é a verdadeira correlação desses achados com a evolução da gravidez. Essas aneuploidias acarretam alterações fenotípicas menos graves do que as associadas a defeitos dos cromossomos autossômicos, evento este decorrente provavelmente da inativação do X. Por outro lado, o mosaicismo pode ser uma manifestação de equilíbrio genético alterado, que pode levar à não disjunção cromossômica (KUO *et al.*, 2004).

No grupo dos pais, foi observado um caso (1%) com mosaicismo correspondente à Síndrome de Klinefelter (46,XY/47,XXY), concordando com Kiss *et al.* (2009), que encontraram um caso em 108 indivíduos. Verifica-se que cerca de 3% dos homens inférteis e que 5 a 10% daqueles com oligospermia ou azoospermia apresentam a síndrome de Klinefelter em mosaicismo. Nesses casos, as alterações testiculares são menos graves, havendo azoospermia em mais de 50% dos casos, mas também podendo haver homens férteis (MALUF *et al.*, 2012)

Os resultados das translocações concordam com os relatados na literatura, onde as translocações recíprocas balanceadas são identificadas em cerca de metade a um terço dos casais com abortos de repetição e as translocações robertsonianas têm sido relatadas em frequência menor, entre 10% a 28% dos casais. A prevalência elevada das translocações recíprocas em relação às robertsonianas pode ser resultado das formas de segregação apresentadas por estas anomalias durante a gametogênese. Tem sido reportado que portadores de translocações recíprocas geram entre 18 e 72% de gametas não balanceados, enquanto indivíduos com translocações robertsonianas produzem apenas 11,6% a 17,8% de gametas alterados (ELGHEZAL *et al.*, 2007).

As translocações recíprocas observadas no presente estudo, apenas nas mulheres do grupo caso, foram: t(11;18), t(2;12) e t(11;17), diferindo de Diedrich, *et al.* (1983), que reportaram translocações envolvendo alguns cromossomos como 1, 7 e 22, como sendo as mais frequentes nos casos de abortamento de repetição. No entanto, neste estudo nenhuma das translocações identificadas envolveram tais cromossomos. Por sua vez, os rearranjos entre os cromossomos 13, 14 e 15 são considerados as translocações robertsonianas mais comuns, tanto entre casais com aborto recorrente, como na população em geral; entretanto, a observada no nosso estudo foi a rob (14;21) (FRYNS *et al.*, 1998).

No presente estudo, a frequência de translocações no grupo das mulheres com perdas gestacionais foi 2,6%, não sendo detectadas no grupo dos homens. Conforme a literatura, 3 a 5% dos casais com aborto recorrente portam uma translocação cromossômica em que as mulheres são duas vezes mais afetadas que os homens. Uma possível explicação para esses achados é que os homens portadores de uma translocação recíproca podem ter fertilidade reduzida, decorrente de espermatozoides não balanceados produzidos pela translocação cromossômica, e sequer engravidam suas parceiras (FRYNS *et al.*, 1998).

A frequência aumentada de translocação recíproca nos casais com abortamento de repetição é um achado esperado, uma vez que portadores de uma translocação têm risco maior, 50% ou mais, de ter um desequilíbrio cromossômico durante a gametogênese, em razão da segregação meiótica desigual decorrente da translocação. A identificação de uma translocação não é apenas um diagnóstico importante, mas tem também valor prognóstico para as gestações futuras e aconselhamento genético (CELEP *et al.*, 2006).

As inversões são alterações estruturais encontradas em frequência baixa nos casais com abortamento de repetição. Saxena e cols. (2012) investigaram 200 casais e a frequência encontrada foi de 0,4%; no presente estudo, observou-se apenas a inversão do cromossomo 18 no grupo dos pais (1,1%). As inversões podem contribuir para infertilidade e abortamentos, uma vez que, na meiose, forma-se uma alça para que o cromossomo invertido possa parear com o seu homólogo. Quando há *crossing-over* dentro da alça de inversão, pode ocorrer deleção ou duplicação de segmentos cromossômicos. Assim, indivíduos com inversão podem formar gametas não balanceados e, conseqüentemente, apresentarem chances maiores de fetos não viáveis (HONEYWELL *et al.*, 2012; MALUF *et al.*, 2012).

A frequência das alterações cromossômicas foi menor no grupo de mulheres com idade acima de 35 anos (4,4%) em relação às mulheres com idade > 30 < 35, cuja frequência foi de 11,2%. A associação entre alterações cromossômicas e a idade materna é controversa. Segundo Elghezal e cols. (2007), mulheres com mais de 35 anos terão mais abortos, provavelmente como resultado de não disjunção cromossômica do que de outras anormalidades cromossômicas e em decorrência da influência de outros fatores relacionados às perdas gestacionais.

Grande e cols. (2012) investigaram 353 mulheres com aborto esporádico e recorrente e constataram que a frequência de aneuploidias em ambos os grupos aumentou com a idade materna, sendo 54% (83/153) para as mulheres abaixo de 35 anos e 74% (147/200) para as mulheres com 35 anos ou mais (P= 0,001). Já Stephenson e cols. (2002) não encontraram correlação entre a frequência de aneuploidias e a idade materna.

A inversão pericêntrica do cromossomo 9, inv(9), que é a alteração estrutural mais comum, com incidência de 1 a 3% na população em geral, é considerada um

polimorfismo normal, pois geralmente não apresenta efeitos fenotípicos. A região invertida contém apenas o centrômero e heterocromatina centromérica, por isso raramente resulta em cromossomos aberrantes depois do *crossing-over* (DANA *et al.*, 2012). Entretanto, alguns autores questionam que suas consequências clínicas não são bem determinadas. Observou-se apenas um caso no grupo das mães (0,6%) e três casos nos controles (3%), concordando com Ozawa *et al.* (2008), que encontraram nos casos 0,6% de alterações no cromossomo 9.

Outra variação considerada normal encontrada foi a região q dos cromossomos 9 e 16 com heterocromatina aumentada (qh+). Foram descritos cinco casos (3,3%) no grupo das mães – três envolvendo o cromossomo 9 e dois o cromossomo 16 – e seis casos (6,4%) no grupo dos pais, todos envolvendo o cromossomo 9. No entanto, alterações semelhantes não foram descritas nos controles. No estudo de Celep *e cols.* (2006), a frequência encontrada de qh+ do cromossomo 9 foi de 13,3%, que pode não ter efeito na etiologia dos abortos porque esta região é constituída de heterocromatina e não contém genes ativos (CELEP *et al.*, 2012).

Os casais com antecedentes de perdas gestacionais trazem consigo uma expectativa natural quanto à elucidação das causas. O fato de, em metade dos casos, não ser possível identificar as causas ligadas às perdas merece um suporte emocional adicional e o encorajamento para tentativas novas. Por outro lado, a continuidade das investigações para o tão esperado êxito gestacional aponta para o nível gênico, também abordado neste trabalho (SIMPSON *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2013).

## 8.2 Polimorfismos no gene *MTHFR* 677C>T, no gene *Fator V* 1691 G> A e no gene *Protrombina* 20210G>A.

É controversa a associação entre o polimorfismo *MTHFR* 677C>T e abortos recorrentes. Govindaiah e cols. (2009) e Couto e cols. (2005) encontraram um risco de 2,3 e 3,1, respectivamente, para a ocorrência de abortos em indivíduos com esse polimorfismo, quando comparado ao grupo controle. No entanto, no presente estudo, não se encontraram diferenças estatisticamente significantes para a frequência do alelo mutante (T) do polimorfismo *MTHFR* 677C>T entre as pacientes (23,0%) e os controles (22,5%). Montserrat e cols. (2012) e Machin e cols. (2009) também não encontraram diferença para o alelo mutante (T) entre casos e controles.

As frequências da mutação *MTHFR* 677C>T observadas para o grupo de mulheres com abortamento recorrente foram de 37,2% para o genótipo heterozigoto (CT) e 4,4% para os homozigotos mutantes (TT). Estes achados concordam com os observados no estudo populacional de Couto *et al.* (2004), que investigaram 843 recém-nascidos em Salvador/Bahia e encontraram frequência alélica de 23,4% para o alelo T, sendo 36,2% dos indivíduos heterozigotos e 5,3% homozigotos mutantes. No entanto, essas frequências diferem das observadas no trabalho de Couto *et al.* (2005), que avaliaram 88 mulheres em São Paulo com abortamento recorrente e encontraram 53% e 13,6% dos genótipos heterozigotos e homozigotos mutantes, respectivamente. Na Colômbia, Cardona e cols. (2008) investigaram 93 mulheres com perdas gestacionais e encontraram 46,2% de heterozigotos e 12,9% de homozigotos mutantes. Essa diferença pode estar relacionada à variação mundial desse polimorfismo nas diferentes populações, uma vez que é mais frequente em

caucasoides que em afro-descentes, grupo dominante na população de Salvador (MONTERRAT *et al.*, 2012).

A distribuição da frequência do polimorfismo *MTHFR* 677C>T apresenta variabilidade étnica e geográfica elevada em todo o mundo. A prevalência do genótipo homozigoto mutante (TT) varia em torno de 1% em populações negras dos Estados Unidos, África subsaariana e da América do Sul e 20% em hispano-americanos, colombianos e ameríndios brasileiros (SHARP *et al.*, 2004). No Brasil, a frequência do genótipo TT varia de 2,7 a 17,5%, e a frequência do alelo T encontra-se entre 19% e 38% (FERNANDES *et al.*, 2012).

Segundo Rai e cols. (2006), a heterozigose para a mutação *MTHFR*677C>T não é considerada um fator de risco independente para trombose, uma vez que níveis elevados de homocisteína, considerados como fator de risco importante para a ocorrência de abortos, estão elevados, principalmente, nos indivíduos homozigotos mutantes (TT). A frequência diminuída do genótipo homozigoto mutante (TT) no grupo com perdas fetais, pode explicar a não associação desse polimorfismo com a patogênese das perdas fetais.

A investigação não demonstrou diferença estatisticamente significativa para as frequências alélicas do polimorfismo *Fator V* 1691G> A, quando comparadas aos grupos casos e controles ( $p= 0,491$ ). As pacientes apresentaram frequência alélica de 1,5% para o alelo mutante A, sendo 2,9% dos indivíduos heterozigotos e 0% homozigotos mutante. Os controles apresentaram frequência alélica de 1%.

No presente estudo, não se encontrou associação entre o polimorfismo protrombina 20210G>A e perdas recorrentes quando comparados casos e controles (RP= 1,04). As pacientes apresentaram frequência alélica de 1,4% para o alelo



mutante A, sendo 2,9% dos indivíduos heterozigotos e 0% homozigotos mutante. Entre os controles não foi observado o alelo mutante A.

Estes achados corroboram com os trabalhos de Serrano *et al.* (2011) e Mierla *et al.* (2012), que também encontraram prevalência similar entre casos e controles para os polimorfismos 1691G>A e 20210G>A. Por outro lado, Settin e *cols.* (2011) reportaram aumento na prevalência desses polimorfismos em mulheres com aborto recorrente quando comparadas com os controles. Esses resultados diferentes podem ser decorrentes de aspectos metodológicos, como inclusão de participantes com outras possíveis causas não identificadas e falta de estratificação dos casos por etnia.

Os estudos que encontraram associação entre as mutações *Fator V* 1691G>A e *Protrombina* 20210G>A e aborto recorrente verificaram as seguintes frequências de heterozigotos em casos e controles, respectivamente: para o *Fator V Leiden*, 23,6%/1,3% e *protrombina* 34,7%/1,4% (SETTIN *et al.*, 2011); para do *Fator V Leiden*, 19%/4% e *protrombina* 9%/2% (FOCA *et al.*, 2000). A taxa elevada de heterozigotos é encontrada na Europa, em que a mutação é extremamente rara, com menos de 1%, em asiáticos, africanos e seus descendentes. No Brasil, as duas mutações estão presentes em cerca de 2% da população com influência caucasiana (GOLDMAN *et al.*, 2003; ROSENDAAL *et al.*, 1998). Como a população de Salvador tem um componente genético negroide, esse fato pode justificar a frequência diminuída desse polimorfismo na população e a não associação com os abortamentos recorrentes no presente estudo.

É controversa a associação entre o polimorfismo *Fator V* 1691G>A e o polimorfismo *Protrombina* 20210G>A e abortos recorrentes. Os estudos sugerem a prevalência elevada para o polimorfismo *Fator V* 691G>A em mulheres com perdas

recorrentes no primeiro e segundo trimestre de gestação, enquanto o polimorfismo Protrombina 20210G>A teria sido identificado como fator de risco para perda recorrente, principalmente no primeiro trimestre (MARTINELE *et al.*, 2000; KUJOVICH, 2011). O mecanismo pelo qual as trombofilias afetam as perdas recorrentes não é bem conhecido. No entanto, alguns estudos têm descrito a associação entre trombofilia hereditária e o aumento de complicações da gravidez, como pré-eclâmpsia, infarto da placenta, diminuição do crescimento fetal, natimortos e deslocamento prematuro de placenta (YENICESU *et al.*, 2009; GRANDONE, *et al.*, 2001).

Van e *cols.* (2008) encontraram prevalência elevada de heterozigotos para a mutação *fator V* 1691G>A em mulheres com perda recorrente, em comparação com os controles, sugerindo risco de 2 a 5 vezes maior. No estudo de Biron e *cols.* (2009), foi constatado que mulheres homozigotas tinham risco 5 vezes maior de ter perda fetal no segundo trimestre do que as mulheres heterozigotas e um risco 11 vezes maior do que as mulheres sem a mutação.

A frequência das mutações *MTHFR* 677C>T, *Fator V* 1691G>A e Protrombina 2021G>A foi maior no grupo das mulheres com idade acima de 31 anos. No entanto, não mostrou diferença significativa quando comparada com o grupo de mulheres com idade  $\leq 30$  anos, concordando com a literatura, que afirma que pequenas deleções não mostram efeito importante relacionado com a idade e ocorre com frequência aproximadamente igual em homens e mulheres. Porém, as mutações de substituição de base são mais comuns em homens do que em mulheres, e a sua frequência aumenta com a idade paterna, o que pode ser explicado pelo número maior de divisões celulares pré-meióticas em homens, especialmente os mais velhos (CROW, 2006; GOVINDAIAH *et al.*, 2009).

No presente estudo, não se encontrou associação entre o número de abortos e as mutações *MTHFR* 677C>T, *Fator V* 1691G>A e Protrombina 2021G>A ( $p=0,098$ ,  $0,504$  e  $0,111$ ). Discordando de Settin e cols. (2011), que avaliaram 72 mulheres no Egito, as que apresentaram as mutações *Fator V* 1691G>A e Protrombina 2021G>A tiveram o dobro de risco de ter aborto recorrente. Segundo Unfried e cols. (2002), as mulheres homozigotas mutantes para *MTHFR* 677C>T em Viena apresentaram risco 3,7 maior de terem aborto recorrente. No entanto, Mierla e cols. (2012) também não encontraram associação entre as mutações *Fator V* 1691G-A e Protrombina 2021G-A e aborto recorrente (RP=  $0,64$  e  $0,52$ ) respectivamente, na Romênia. Machin *et al.* (2009) não encontraram associação entre a mutação *MTHFR* 677C>T e aborto recorrente, na Venezuela ( $p > 0,05$ ). Segundo Machin e cols. (2009), os indivíduos homozigotos estão associados a um risco maior de terem aborto recorrente.

Entre as mulheres que apresentaram genótipo mutante para os polimorfismos *MTHFR* 677C>T, *Fator V* 1691G>A e protrombina 2021G>A, apenas 5,3% das que apresentaram a mutação 677C>T tiveram alteração cromossômica. Segundo a literatura, algumas alterações cromossômicas, em particular as que se originam de quebras cromossômicas, podem resultar em mutações gênicas. Deleções e inserções grandes, por exemplo, contribuem com, aproximadamente, 5 a 6% das mutações patogênicas conhecidas. No entanto, estima-se que as mutações cromossômicas sejam menos frequentes que as genômicas, ocorrendo a uma taxa aproximada de um rearranjo por 1.700 divisões celulares (YOUNG, 2007; GRIFFITHS *et al.*, 1998).

## 9 CONCLUSÃO

Foi observada associação entre alterações cromossômicas e aborto recorrente no primeiro trimestre da gestação no grupo de mulheres estudado. Mulheres com alterações cromossômicas tiveram um risco 7,7 vezes maior de ter aborto de repetição, com frequência de 7,3% nos casos e 1% nos controles.

As principais alterações cromossômicas encontradas foram mosaicismo do cromossomo X (4,7%), seguido pelas translocações recíprocas (2%).

A frequência das alterações cromossômicas foi maior nas mulheres com aborto recorrente (7,3%) do que nos respectivos parceiros (2,1%), ( $p=0,896$ ).

Não foi observada associação entre os polimorfismos *MTHFR* 677C<T, *Fator V* 1691G<A e *Protrombina* 20210G<A e aborto recorrente no primeiro trimestre da gestação.

## 10 REFERÊNCIAS

BAGHERI, M.; RAD, I. A.; NANBAKSH, F. Factor V Leiden G1691A and factor II G20210A point mutations and pregnancy in North-West of Iran. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 284, p. 1311–1315, 2011.

BARINI, R et al. Fatores Associados ao Aborto Espontâneo Recorrente. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.22 n.4, 2000.

BEIGUELMAN, B. et al. **Citogenética Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1982.

BELLVER, J. et al. The role of thrombophilia and thyroid autoimmunity in unexplained infertility, implantation failure and recurrent spontaneous abortion. **Hum. Reprod.**, v. 23, n. 2, p. 278-284, 2008.

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

BERG, M. M. J. et al. Genetics of early miscarriage. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1822, p. 1951–1959, 2012.

BERRY, C. W. et al. The Euro-Team Early Pregnancy (ETEP) protocol for recurrent miscarriage. **Human Reprod.**, v. 10, n. 6, p. 1516-1520, 1995.

BIRON-ANDRÉ A. C.; BAUTERS, A.; LE CAM-DUCHEZ, V. et al. Factor V Leiden homozygous genotype and pregnancy outcomes. **Obstet. Gynecol.** v. 114, n. 77, p. 1249–1253, 2009.

BORRELL, A.; STERGIOTOU, I. Miscarriage in contemporary maternal–fetal medicine: targeting clinical dilemmas. **Ultrasound Obstet. Gynecol.**, 2013.

BOTTO, L. D.; YANG, Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, v. 151, p. 862 - 877, 2000.

BOUÉ, E.; BOUÉ, A. Chromosomal analysis of two consecutive abortuses in each of 43 women. **Humangenetik.**, v. 19, n. 3, p. 275-280, 1973.

BRENNER, B. Inherited thrombophilia and pregnancy loss (review). **Thromb. Haemost.**, v. 82, p. 634–640, 1999.

BROOKE, H.-W. et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. **Fertil. Steril.**, v. 98, n. 3, p. 675-680, 2012.

CAETANO, MR. et al. Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. *Rev Ciênc Méd* 15: 47- 53, 2006.

CAO, Y; XU. et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. **Gene**, v. 514, n.2, p.105-11, 2013.

CARP, H. et al. Recurrent miscarriage: a review of current concepts, immune mechanisms, and results of treatment. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 45, n. 10, p. 657-669, 1990.

CARP, H. et al. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. **Fertil. Steril.**, v. 75, n. 4, 2001.

CARP, H. et al. Parental karyotype and subsequent livebirths in recurrent miscarriage. **Fertil. Steril.**, v. 81, n. 5, 2004.

CARDONA, .H. et al. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and homocysteine levels in women with recurrent pregnancy loss: a nutrigenetic perspective. **Nutr. Hosp.**, v. 23, n. 3, p. 277-282, 2008.

CASTRO, R. et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T and 1298A-->C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. **QJM.**, v. 96, n. 4, p. 297-303, apr.2003.

CELEP, F. et al. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 127, n. 1, p. 106-109, 2006.

CEYLAN G, CEYLAN C, YUCE H. A rare seen case with homozygosity for pericentric inversion of chromosome 9 and primary infertility. **Amer. J. Case Rep.**, v.9, p. 385-388, 2008.

COUTO, E. et al. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase mutation in women with recurrent spontaneous abortions: a new path to thrombophilia? **Sao Paulo Med. J.**, v. 123, n. 1, p. 15-20, 2005.

CRAMER, D. W.; WISE, L. A. The epidemiology of recurrent pregnancy loss. **Semin. Reprod. Med.**, v. 18, n. 4, p. 331-339, 2000.

CROFTS, F. et al. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 12, p. 2961-2963, 1994.

CROW, J. F. Age and sex effects on human mutation rates: an old problem with new complexities. **J Radiat Res.** v. 47, Suppl B, p.B75-82, 2006.

DANA, M. ; STOIAN, V. Association of Pericentric Inversion of Chromosome 9 and Infertility in Romanian Population. **Maedica (Buchar)** v.7, n. 1, p. 25-29, 2012.

DAWOOD, F. et al. Genetic polymorphisms on the factor V gene in women with recurrent miscarriage and acquired APCR. **Hum Reprod.**, v. 22, n. 9, p. 2546-2553, sep. 2007.

DE BRAEKELEER, M.; DAO, T. M. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. **Hum. Reprod.**, n. 5, p. 519-528, 1990.

DESJARDIN, M. K.; STEPHENSON, M. D. Information-rich " reproductive outcomes in carriers of a structural chromosome rearrangement ascertained on the basis of recurrent pregnancy loss. **Fertil. Steril.**, v. 97, n. 4, p. 894-903, 2012.

DIEDRICH, U. et al. Chromosome anomalies in 136 couples with a history of recurrent abortions. **Hum. Genet.**, v. 65, n. 1, p. 48-52, 1983.

DIZON-TOWNSON, D. S. et al. Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. **J. Obstet. Gynecol.**, v. 177, n. 2, p. 402-405, aug. 1997.

DUL, E.C. et al. Chromosomal abnormalities in azoospermic and non-azoospermic infertile men: numbers needed to be screened to prevent adverse pregnancy outcomes. **Hum. Reprod.**, v. 27, n. 9, p. 2850 – 2856, 2012.

FERNANDES, H. F. et al. Prevalence of variants that confer risk for venous thromboembolism in an elderly population of northeastern Brazil. **Genet. Mol. Res.**, v. 12, (AOP), 2013.

FOKA, Z. J. et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 458–462, 2000.

FRANSSEN, M.T. et al. Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages. **BMJ.**, v.332, n. 7544, p. 759-763, 2006.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.**, v. 10, p. 111–113, 1995.



FOKA, Z.J. et al. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 2, p. 458-462, 2000.

FRYNS, J. P.; VAN BUGGENHOUT, G. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 81, n. 2, p. 171-176, 1998.

FAUTH, C. et al. Additional dark G-band in the p arm of chromosome 19 due to a paracentric inversion with a breakpoint in the pericentromeric heterochromatin. **Am. J. Med. Genet.**, v. 103, n. 2, p. 160-162, 2001.

GARCÍA-ENGUÍDANOS, A. et al. Risk factors in miscarriage: a review. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 102, n. 2, p. 111-119, 2002.

GATTÁS, G. J. F. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/ GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 451-458, 2004.

GEORGE, L. et al. Risks of repeated miscarriage. **Paediatr. Perinat. Epid.**, v. 20, n. 2, p. 119-126, 2006.

GILCHRIST, D.M. et al. Recurrent spontaneous pregnancy loss. Investigation and reproductive follow-up. **J. Reprod. Med.**, n. 36, p. 184-8, 1991.

GRANDE, M. et al. The effect of maternal age on chromosomal anomaly rate and spectrum in recurrent miscarriage. **Hum. Reprod.**, v. 27, n. 10, p. 3109–3117, 2012.

GRANDONE, E. et al. Inherited thrombophilia and in vitro fertilization implantation failure. **Fertil. Steril.**, v. 76, n. 1, p. 201-202, 2001.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1998.

GONZALEZ, A. B.; HARTGE, P.; THUM, M. J. Recurrent miscarriage. **New Engl. J. Med.**, p. 364-368, 2011.

GOVINDAIAH, V. et al. Association of parental hyperhomocysteinemia and C677T Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with recurrent pregnancy loss. **Clin. Biochem.**, v. 42, n. 4-5, p. 380-386, 2009.

HOGGE, W.A.; BYRNES, A.L.; LANASA, M.C. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 189, p. 397-402, 2003.

HODES-WERTZ, B. et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. **Fertil. Steril.**, v. 98, n. 3p. 675-680, 2012.

HONEYWELL, C. et al. Apparent Transmission Distortion of a Pericentric Chromosome One Inversion in a Large Multi-Generation Pedigree. **Am. J. Med. Genet.**, Part A, v. 158A, p. 1262–1268, 2012.

HAKIM, R.B.; GRAY, R.H.; ZACUR, H. Infertility and early pregnancy loss. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 172, n. 5, p. 10-17, 1995.

HAYWOOD, L. e BROWN, M. D. Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 34, p. 1-17, 1991.

HIRSHFELD-CYTRON, J.; SUGIURA-OGASAWARA, M.; STEPHENSON, M.D. Management of recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a reciprocal translocation: a systematic review. **Semin. Reprod. Med.**, v. 29, n. 6, p. 470-81, 2011.

HOGGE, W. A. et al. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 189, n. 2, p. 397-400, 2003.

HOLMES, Z.R. et al. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. **Br. J. Haematol.**, v. 105, n. 1, p. 98-101, apr. 1999.

HORNE, A. H.; ALEXANDER, C. I. Recurrent miscarriage. **J. Fam. Plann. Reprod. Health Care**, v. 31, n. 2, 2005.

HUSSEIN, A.S.; DARWISH, H.; SHELBAYEH, K. Association between factor V Leiden mutation and poor pregnancy outcomes among Palestinian women. **Thromb. Res.**; v. 126, n. 2, p. e78-82, aug. 2010.

JACOBS, P.A.; HASSOLD, T. J. The origin of numerical chromosome abnormalities. **Adv. Genet.**, v. 33, p. 101-133, 1995.

JIVRAJ, S.; RAI, R.; UNDERWOOD, J.; REGAN, L. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. **Hum. Reprod.**, v. 21, n. 5, p. 1161-1165, 2006.

JAUNIAUX, E. et al. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. **Hum. Reprod.**, v. 21, n. 9, p. 2216-222, 2006.

KAVALIER, F. Investigation of recurrent miscarriages. **BMJ.**, v. 331, p. 121-122, 2005.

KALOUSEK, D.K.; LAU, A. E. Pathology of spontaneous abortions. In: *Developmental pathology of the embryo and fetus*. Philadelphia: Lippincot, p. 55-82, 1992.

KISS, A. et al. Chromosomal abnormalities in couples with history of recurrent abortion. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 31, n. 2, p. 68-74, 2009.

KOCHHAR, P. K; GHOSH, P. Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal abnormalities. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 39, n. 1, p. 113–120, 2013.

KOVALEVSKY, G. et al. Evaluation of the Association Between Hereditary Thrombophilias and Recurrent Pregnancy Loss. **Arch. Intern. Med.**, v. 164, p. 558-563, 2004.

KRABBENDAM, I.; FRANX, A.; BOTS, M. L. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 118, n. 2, p. 143-153, 2005.

KUJOVICH, J.L. Factor V Leiden thrombophilia. **Gen. Med.**, v. 13, n. 1, p.1-16, 2011.

KUO, P-L.; GUO, H.-R. Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. **Fertil Steril.**, v. 82, n. 6, 2004.

LEBEDEV, I. Molecular cytogenetics of recurrent missed abortions. **Indian J. Med. Res.**, v. 124, p. 9-10, july. 2006.

LJUNGER, E. et al. Chromosomal anomalies in first-trimester miscarriages. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 84, n. 11, p. 1103-1107, 2005.

MAKINO, T. et al. Chromosomal analysis in Japanese couples with repeated spontaneous abortions. **Int. J. Fertil.**, v. 35, n. 5, p. 2666-2670, 1990.

MALUF, S. W. et al. **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

MARTINELLI, I. et al. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. **New Engl. J. Med.**, v. 343, n. 14, p.1015-1018, 2000.

MEZA-ESPINOZA, J.P.; ANGUIANO, L.O.; RIVERA, H. Chromosomal abnormalities in couples with reproductive disorders. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 66, n. 4, p. 237-240, 2008.

MIERLA, D. et al. Association of Prothrombin (A20210G) and Factor V Leiden (A506G) with Recurrent Pregnancy Loss. **Maedica (Buchar)**. v. 7, n. 3, p. 222-226, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Técnicas para coleta de sangue. Brasília, WH 460, 2001.

MISKOVIC, S. et al. Positive reproductive family history for spontaneous abortion: predictor for recurrent miscarriage in young couples. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 161, p. 182–186, 2012.

Miodovnik, M. Mimouni, F; Tsang, R. C. Glycemic control and spontaneous abortion in insulin-dependent diabetic women. **Obstet. Gynecol.**, n. 68, p. 366-369, 1986.

MONTERRAT, C. et al. Plasma homocysteine and vitamin B12 serum levels, red blood cell folate concentrations, C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and risk of recurrent miscarriage: a case-control study in Spain. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 2012.

MONTORO, M. et al.. Successful outcome of pregnancy in women with hypothyroidism. **Ann. Intern. Med.**, v. 94, n. 1, p. 31-34, 1981.

MORALES-MACHÍN, A. et al. C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene as risk factor in women with recurrent abortion. **Invest. Clin.**, v. 50, n. 3, p. 327-333, 2009.

MOZDARANI, H; MEYBODI, A. M; KARIMI, H. Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility. **Indian J. Hum. Genet.**, v. 13, n. 1, p. 26-9, 2007.

MTIRAOU, N. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. **Reproduction**, v. 131, p. 395–401, 2006.

NAIR, R. R. et al. Association of maternal and fetal MTHFR A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: a study of an Indian population and a meta-analysis. **Fertil Steril.** 99(5):1311-1318, 2013.

NELEN, W.L. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase Methods and clinical applications. **Clin Chem.**, v. 39, p. 1764–1779, 1993.

NELEN, W. L. et al. Genetic risk factor for unexplained recurrent early pregnancy loss. **Lancet**, v. 350, p. 861, 1997.

NEME, B. et al. **Obstetrícia básica**. 3 ed. São Paulo: Savier, 2005.

OHNO, M; MAEDA, T; MATSUNOBU, A. A cytogenetic study of spontaneous abortions with direct analysis of chorionic villi. **Obstet. Gynecol.**, v. 77, n. 3, p. 394-398, 1991.

OZAWA, N. et al. Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss. **Fertil Steril**. v. 90, n. 4, p. 1301-1304, 2008.

PAL, S. et al. Chromosomal abnormalities and reproductive outcome in Malaysian couples with miscarriages. **Singapore Med. J.**, v. 50, n. 10, p. 1008-1012, 2009.

PANASIUK, B. et al. Reciprocal chromosome translocations involving short arm of chromosome 9 as a risk factor of unfavorable pregnancy outcomes after meiotic malsegregation 2:2. **Adv. Med. Sci.**, v. 54, n. 2, p. 203-210, 2009.

PARVEEN, F.; SHUKLA, A.; AGRAWA, S. Should factor V Leiden mutation and prothrombin gene polymorphism testing be done in women with recurrent miscarriage from North India? **Arch Gynecol Obstet**. 287(2):375-81, 2013.

RAI, R. et al.. Randomised controlled trial of aspirin and aspirin plus heparin in pregnant women with recurrent miscarriage associated with phospholipid antibodies (or antiphospholipid antibodies). **BMJ.**, v. 314, n. 7076, p. 253-257, 1997.

REBBECK, T. R. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v. 6, n. 9, p. 733-743, 1997.

REES, D. C.; COX, M.; CLEGG, J. B. World distribution of factor V Leiden. **Lancet**, v. 346, n. 8983, p. 1133-1134, 1995.

REY, E. et al. Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. **Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 901-908, 2003.

REZENDE, J. **Obstetrícia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1995.

RIER, S.E. et al. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 21, p. 433-441, 1993.

Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. The investigation and treatment of couples with recurrent miscarriage. Guideline n. 17, London:RCOG Press, 2003.

ROSENDAAL, F. R. et al. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). **Blood**, v. 85, p. 1504-1508, 1995.

ROSENDAAL, F. R. et al. CUMMING, A. M.; PRESTON, F. E. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. **Reitsma PH.Thromb. Haemost.**, v. 79, n. 4, p. 706-708, 1998.

SAXENA, S. G. et al. Chromosomal aberrations in 2000 couples of Indian ethnicity with reproductive failure. **Reprod. Biomed. Online**, v. 25, n. 2, p. 209-218, 2012.

SCHLESSELMAN, J. J. How does one assess the risk of abnormalities from human in vitro fertilization? **Am. J. Obst. Gynecol.** v. 135, p. 135, 1979.

SEABRIGHT, M. **A rapid banding technique for human chromosomes**. **Lancet** 30: 971, 1971.

SERRANO, F. et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 284, p. 1127-1132, 2011.

SETTIN, A. et al. Factor V Leiden and prothrombin gene mutations in Egyptian cases with unexplained recurrent pregnancy loss. **Hematology**, v. 16, n. 159, 2011.

SETTIN, A. et al.. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in Egyptian women with unexplained recurrent pregnancy loss. **Genet Test Mol Biomarkers**. 15(12):887-92, 2011.

SHARP, L.; LITTLE; J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: A HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, v. 159, p. 423-443, 2004.

SIMPSON, J. L. Causes of fetal wastage. **Clinical Obstet. Gynecol.**, v. 50, n. 1, p. 10-30, 2007.

SOH, K. et al. Chromosome analysis in couples with recurrent abortions. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 144, n. 2, p. 151-63, 1984.

STENCHEVER, M. A. et al. Cytogenetics of habitual abortion and other reproductive wastage. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 127, p. 143, 1977.

STENCHEVER, M. A. et al. Spontaneous and recurrent abortions. **Comprehensive gynecology**, (4) St. Louis, MO:CV Mosby, 2001. p. 280-299.

STEPHENSON, M. D. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. **Fertil. Steril.**, v. 66, p. 24–29, 1996.

STEPHENSON M.D; AWARTANI K. A; ROBINSON W. P. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 446 – 451, 2002.

SUGIURA-O. M. et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. **Human Reprod.**, v. 27, n. 8, p. 2297 – 2303, 2012.



THIRUCHELVAM, A. ; SEKARAN, M. ; SITI ZAWIAH O. Thrombophilia investigation in Malaysian women with recurrent pregnancy loss. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 35, n. 6, p. 1061–1068, 2009.

UNFRIED, G. et al. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and idiopathic recurrent miscarriage. **Obstet. Gynecol.**, v. 99, n. 4, p. 614-619, 2002.

VAN STRALEN, K. J.; ROSENDAAL, F. R.; DOGGEN, C. J. Minor injuries as a risk factor for venous thrombosis. **Arch. Intern. Med.**, v. 168, n. 57, p. 21–26, 2008.

VAN DEN BERG, M. M. et al. Genetics of early miscarriage. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1822, n. 12, p. 1951-1959, 2012 .

YENICESU, G. I. A Prospective Case–Control Study Analyzes 12 Thrombophilic Gene Mutations in Turkish Couples with Recurrent Pregnancy Loss. **Reprod. Immunol.**, v. 63, p. 126–136, 2010.

YOUNG, I. D. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 259.

ZETTERBERG, H. et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. **Eur. J. Hum. Genet.**1 v. 10, n. 2, p. 113-118, 2002 .

## APÊNDICE A

**Entrevista para coleta de dados epidemiológicos.**

NÚMERO DO QUESTIONÁRIO \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

**I-DADOS PESSOAIS**

Nome.....

Idade.....

Prontuário.....

**Estado civil**

- ( 0) solteiro
- (1) casada ou união estável
- (2) separada
- (3) outros

**II-DADOS SOCIOECONÔMICOS****Qual a sua renda mensal em salários mínimos?**

- (0) Não trabalha
- (9) Não sabe

**Grau de instrução:**

- Analfabeto
- 1. grau incompleto
- 1. grau completo
- 2. grau incompleto
- 2. grau completo
- Superior

**Ocupação atual:** \_\_\_\_\_

- (0) desempregada
- (9) Não tem

**III-HÁBITOS DE VIDA****Quantas refeições você faz por dia?**

---

**Consumo de álcool:**

( 0 ) não ( 1 ) sim ( ) quantas vezes por semana

---

---

**Consumo de café:**

( 0 ) não ( 1 ) sim ( ) quantas vezes por dia

---

---

**Consumo de cigarro:**

( 0 ) não ( 1 ) sim ( ) quantos por dia

---

---

**Uso de medicamento:**

( 0 ) não ( 1 ) sim

Qual? .....

---

---

**IV- QUANTIDADE DE ABORTOS ( )**

---

a) Já apresentou algum tipo de trombose? Sim ( ) Não ( ) Não sabe ( )

**POLIMORFISMOS**

( ) fator Vde Leiden (G1691A)

( ) protrombina (G20210A)

( ) metilenotetrahidrofolato redutase C677T

## ANEXO A

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **Para a (o)s pacientes**

Você está sendo convidado a participar como voluntário da pesquisa intitulada **BIOMARCADORES ASSOCIADOS A PERDAS FETAIS RECORRENTES E MOLA HIDATIFORME**, em pesquisas realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ - BA.

A sua participação é totalmente voluntária e gratuita, podendo ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

**Este trabalho tem como objetivo avaliar fatores de risco associados a perdas gestacionais de repetição e doença trofoblástica gestacional (mola hidatiforme), analisando substâncias do sangue. Serão identificadas doenças como: anemias, alterações de coagulação e deficiências nutricionais que possam levar a distúrbios no desenvolvimento do feto.**

Os registros da sua participação serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes, que serão do conhecimento somente dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução CNS 340/2004. A mesma aprova as Diretrizes para Análise Ética e Tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana.

Solicitamos a sua autorização para que as amostras colhidas sejam armazenadas. E se necessário estudos futuros seja respeitado o item 1.3 da resolução 347/05: “Declara que toda nova pesquisa a ser feita com o material será submetida para aprovação do CEP da instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP” e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço, o que poderá acarretar em riscos e desconfortos, como sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir esses riscos. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao acompanhamento clínico e a sua avaliação periódica.

A participação no estudo trará o benefício imediato, uma vez que todos os resultados de todas as avaliações e que correspondem a investigações das

principais moléculas associadas à ocorrência de perdas fetais e mola hidatiforme serão investigadas e disponibilizadas para o médico que te avalia regularmente.

Assinatura do Paciente/ ou controle \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do Paciente/ ou controle (letra de forma):



Endereço \_\_\_\_\_

Nome Testemunha 1:

\_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Nome Testemunha 2:

\_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

Marcelo Ramos- Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2285.

Comitê de Ética em Pesquisa- Maternidade Climério de Oliveira/UFBA. Rua Augusto Viana S/N Canela, Hospital Universitário Professor Edgar Santos, 1. andar. 3283-8043.

Dra Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de Pesquisa em Anemias da Faculdade de Farmácia/UFBA e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2226.

Drª Olívia Lúcia Nunes Costa no “Ambulatório de Aborto Habitual”, na Maternidade Pública Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia.

## APÊNDICE B

### **Chromosomal abnormalities in recurrent first-trimester miscarriages.**

Artigo aceito pela revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.

Em 02/12/2013, RBGO 1663.

Informamos que seu artigo "***Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions***", será publicado no Fascículo 3 do Volume 36 da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.

Atenciosamente,

***Jurandyr Moreira de Andrade***

Editor Científico da RBGO

Alterações cromossômicas em casais com aborto recorrente de primeiro trimestre.

Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions.

Departamento de ginecologia e obstetrícia da Universidade Federal da Bahia – Salvador, Bahia (Ba), Brasil.

Rozana Oliveira Gonçalves<sup>1</sup>

Wendell Vilas Boas Santos <sup>2</sup>

Manoel Sarno<sup>3</sup>

Bruno Antonio Veloso Cerqueira<sup>4</sup>

Marilda Souza Gonçalves<sup>5</sup>

Olivia Lucia Nunes Costa<sup>6</sup>

1- Aluna do curso de doutorado do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz- Bahia  
rozana26oliveira@hotmail.com

2- Pesquisador visitante do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz- Bahia  
dellbio@yahoo.com.br

3- Professor do departamento de ginecologia e obstetrícia da Universidade Federal da Bahia  
manoelsarno@uol.com.br

4- Professor da Universidade Estadual de Santa Cruz- Bahia.  
bcerqueira@bahia.fiocruz.br

5- Pesquisadora do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz- Bahia.  
mari@bahia.fiocruz.br

6- Professora do departamento de ginecologia e obstetrícia da Universidade Federal da Bahia.  
olivialcosta@yahoo.com.br

Correspondência  
Rozana Oliveira Gonçalves  
Rua Waldemar Falcão, 121 - Candeal,  
Salvador - BA, 40296-710, Fone:(71) 3176-2200.  
rozana26oliveira@hotmail.com

## RESUMO

**OBJETIVO:** Foi realizado um estudo caso controle para determinar a prevalência de alterações cromossômicas em casais com aborto recorrente de primeiro trimestre, sem causa definida.

**Métodos:** A população do estudo incluiu 151 mulheres e 94 parceiros com história obstétrica de dois ou mais abortos consecutivos de primeiro trimestre (1-12 semanas de gestação). Os controles foram 100 mulheres saudáveis, sem histórico de perda da gravidez. A análise cromossômica foi realizada em linfócitos de sangue periférico, cultivados 72 horas e tratados com a técnica tripsina-Giemsa (GTG banda). Em todos os casos, foram analisadas 30 metáfases e montados dois cariótipos, utilizando microscopia de luz. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student para dados com distribuição normal e o teste Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Foi usado o teste Kruskal-Wallis ou análise de variância para comparar os valores médios entre três ou mais grupos. O software utilizado foi o SPSS 17.0.

**Resultados:** A frequência de alterações cromossômicas das mulheres com aborto recorrente foi de 7,3%, incluindo 4,7% com mosaicismos do cromossomo X, 2% com translocações recíprocas e 0,6% com translocações Robertsonianas. No total, 2,1% dos parceiros das mulheres com AR tinham anormalidades cromossômicas, sendo 1% com mosaicismos do cromossomo X e 1% com inversões. Entre os controles, 1% teve mosaicismos.

**Conclusão:** No presente estudo foi observada associação entre alterações cromossômicas e aborto recorrente no primeiro trimestre da gestação (OR=7,7 (IC 95% 1,29-170,5)). A identificação etiológica de fatores genéticos é uma informação



clínica importante para o aconselhamento genético e orientação do casal quanto ao risco para gestações futuras, bem como diminui o número de investigações para elucidar as possíveis causas dos abortamentos.

**Palavras-chave:** aborto recorrente, anormalidades cromossômicas, translocações recíprocas.

## **ABSTRACT**

**Objective:** One case-control study was conducted to investigate the prevalence of chromosomal abnormalities in couples with two or more recurrent first trimester miscarriages, unknown cause.

**Methods:** The study population included 151 women and 94 partners who had an obstetrical history of two or more consecutive first-trimester abortions (1-12 gestation weeks). The controls were 100 healthy women without a history of pregnancy loss. Chromosomal analysis was performed on lymphocytes from peripheral blood, cultured for 72 hours, using Trypsin-Giemsa (GTG) banding. In all cases at least 30 metaphases were analyzed and two karyotypes were prepared, using light microscopy.

The statistical analysis was performed using the Student t-test for normally distributed data and the Mann-Whitney test for non-parametric data. The Kruskal-Wallis test or ANOVA was used to compare the mean values between three or more groups.

The software used was SPSS 17.0.

**Results:** The frequency of chromosomal abnormalities in women with recurrent miscarriages was 7.3%, including 4.7% with X-chromosome mosaicism, 2% with reciprocal translocations and 0.6% with Robertsonian translocations. In total, 2.1% of the partners of women with recurrent miscarriages had chromosomal abnormalities, including 1% with X-chromosome mosaicism and 1% with inversions. Among the controls, 1% had mosaicism.

**Conclusion:** In the present study was observed association between chromosomal abnormalities and recurrent miscarriage in the first trimester of pregnancy (OR = 7.7 (95% CI 1.29 to 170.5). Etiologic identification of genetic factors is an important clinical information for genetic counseling and orientation of the couple on the risk for future pregnancies and decreases the number of investigations to elucidate the possible causes of miscarriages.

**Key words:** recurrent miscarriages, chromosomal abnormalities, reciprocal translocations.

## INTRODUCTION

### **Alterações cromossômicas em casais com aborto recorrente de primeiro trimestre.**

### **Chromosomal abnormalities in couples with recurrent first trimester abortions.**

Recurrent miscarriage is usually defined as the occurrence of three or more consecutive pregnancy losses before 20 weeks of gestation or the loss of three consecutive fetuses of less than 500 g in weight<sup>1, 2</sup>. Recurrent spontaneous abortion (RSA) is a condition that occurs in 2–5% of couples<sup>3, 4</sup>.

Abortion is considered a multifactorial problem, with different causes involved in its etiology, including environmental, genetic, anatomical, endocrine, immunological thrombophilic and infectious diseases<sup>5, 4</sup>.

It has been reported that 50% of spontaneously aborted fetuses have chromosomal abnormalities<sup>6</sup>. The majority of such abnormalities are due to chromosomal non-disjunction or mutation. However, unbalanced translocations account for approximately 1% of spontaneous miscarriages. In such cases, a parental carrier of a structural chromosome rearrangement, most commonly a reciprocal or Robertsonian translocation has often been identified<sup>7, 8</sup>. In approximately 3-5% of couples with recurrent miscarriage, one of the partners is affected by a chromosomal translocation, as opposed to 0.2% in the normal population. This may repeatedly produce an unbalanced gamete, resulting in the recurrence of spontaneous miscarriage<sup>9, 10, 11</sup>.

## METHODS

One case-control study was conducted to investigate association between Idiopathic recurrent miscarriages and chromosomal abnormalities. Miscarriage diagnosis was based on clinical history and clinical examination. The study population included 151 women and 94 partners who had an obstetrical history of two or more consecutive first-trimester abortions (1-12 gestation weeks) who completed a systematic examinations at routine consultation to miscarriage, such as tests for abnormal chromosomes, endocrine abnormalities and uterine anomalies. Study subjects were recruited between January 2011 and July 2012, from four health centers in Salvador, Bahia, Brazil, which operate a comprehensive medical and health program for pregnant women. We excluded women with two miscarriages with different partners, with a living children, women who were over 40 years of age and suffering from a disease associated with gestational failure such as hypertension, infections, uterine anomalies, antiphospholipid syndrome, inherited thrombophilia, hypothyroidism and diabetes mellitus. The controls were 100 healthy women who gave birth in the Maternity Climério de Oliveira (MCO), with no history of abortion, with up to 40 years and with at least one living child. She were screened in the infirmary of the MCO in consultation with the medical records and interview.

A questionnaire was administered to all subjects to collect the demographic, lifestyle (consumption of alcohol, coffee, cigarettes and drugs), family history and work environment data. All participating subjects personally provided their consent to participate in the study.

## **Chromosome preparations**

Chromosomes from cultured peripheral blood lymphocytes were analyzed using Trypsin-Giemsa (GTG) banding: 5 mL peripheral blood samples was taken to heparinized injectors for karyotyping. Peripheral blood lymphocytes were stimulated with fitohemaglutinina (0,1 ml) and cultured for 72 h at 37°C, in RPMI 1640 medium. Colchicine was added at 16 µg/ml to the cultures 1 h before harvesting. Slides were prepared after hypotonic treatment of the cells with KCl (0.075 M) followed by fixation in methanol/glacial acetic acid (3/1 vol/vol). A concentrated suspension of the cells was dropped on slides, which were aged in the incubator at 37 °C for three days and then stained with the G-banding technique. In all cases at least 30 metaphases were analyzed and two karyotypes were prepared, using light microscopy. In cases of suspected mosaicism, 50 cells were counted. All of the metaphases were examined for gross structural or numerical cytogenetic anomalies.

## **Statistical Analysis**

The distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. The means of the quantitative variables between the two groups were compared using the Student t-test for normally distributed data and the Mann-Whitney test for non-parametric data. The Kruskal-Wallis test or ANOVA was used to compare the mean values between three or more groups. A bivariate correlation analysis was performed to determine the correlations between the pairs of variables using Pearson's test and Spearman's test. All tests were considered significant if the P value was less than 0.05. We used SPSS 17.0 for the analyses.

## **Ethical Standards**

The study was approved by the research ethics committee of Maternity Climério of Oliveira under resolution 010/2010. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subjects and the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008.

## RESULTS

The women in this study had a mean age of 32.1 ( $\pm$  4.3) years, ranging between 19 and 40 years. In the control group, the mean age was 25.8 ( $\pm$  6.5) with a range from 16 to 40 years. The mean number of abortion cases were  $2.8 \pm 1.0$ , ranging from two to sete. It was observed higher frequency of subjects in the group with two abortions 47.6%, followed by the group with three abortions 37.7% (Table 1).

Women with recurrent miscarriage ages were categorized into three groups:  $\leq$  30 years  $> 30 \leq 35$  years  $> 35$  years. We observed a higher frequency (11.2%; 8/72) of chromosomal abnormalities in the group of women with age between 30 and 35 years, compared to women under 30 years (3.6%; 2/56). However, no association was observed between maternal age and the frequency of chromosomal abnormalities ( $p = 0.36$ ).

Of the 151 patients with a history of recurrent miscarriage, only 46 (30.5%) provided data regarding their lifestyle habits. Of these 46, 25 (54.3%) drank alcoholic beverage (once or twice per month); 35 (76%) drank coffee and only two (4.3%) were

smokers (smoked 1 or 2 cigarettes per day). Of the 96 women in the control group, 42 (43.7%) reported that they consumed drunk alcoholic beverage (once or twice per month); 83 (86.4%) drank coffee and 11 (11.4%) were smokers (smoked 1 or 2 cigarettes per day). None of the habits showed a statistically significant difference when compared with the controls ( $p=0.15$ ,  $p=0.18$  and  $p=0.15$ ) (Table 2).

The frequency of chromosomal abnormalities was more prevalent in the women with pregnancy loss (7.3%) than in the controls (1%), (Table3). An association was observed between chromosomal abnormalities and recurring losses in the first trimester  $OR=7,7$  (IC 95% 1,29-170,5).

Among the women with pregnancy loss, we identified seven cases (4.7%) of X-chromosome mosaicism: three (46, XX/47, xxx/45, x), two (46, XX/47, xxx), one (46, XX / 49xxxxx) and one (46, xx/49, xxxxx/45, x); three cases (2%) of reciprocal translocations: [t (11; 18), t (2; 12) e t(11, 17)] and one case (0.6%) of Robertsonian translocation (14, 21) (Table 3). However, no significant difference between the numerical and structural changes was found ( $p=0.10$ ). We found that 2.1% of the partners had chromosomal abnormalities (one case of X-chromosome mosaicism and other inversions (18) q10), and in the controls, one case of X-chromosome mosaicism was found (Table 3).

In addition, an extra G-band was detected in five cases in the group of women with pregnancy loss (three cases of 9qh+ and two cases of 16qh+) and in six cases of 9qh+ in the group of fathers. Pericentric inversion of chromosome 9 was observed in one woman with recurrent miscarriages and in three cases in the controls. This inversion was considered a normal variant in the population. One patient had a chromosome 21 with the rod increased satellite (Table 4).

## DISCUSSION

In the present study, we found statistically significant differences for chromosomal aberrations (CA) when comparing 151 women with abortions (7.3%) to 100 controls (1%) ( $p=0.02$ ). This frequency of CA was similar to that observed in other reports by Pal et al. (2009) and Kiss et al. (2009) (8.9% and 9.3%), respectively. However, Celep et al. (2006) and Ozawa et al. (2008) reported that the frequencies of CA were lower, 3.8% and 4.9%, respectively. A review of the literature showed that in 4.7% to 12.5% of couples with at least two miscarriages, one partner carries a chromosomal alteration<sup>4, 8,15</sup>. Many studies attribute this variability to differences in the sample size and variations in the criteria for selection of the individuals, such as the number of abortions and the exclusion of those with defined etiology. Our findings could be due to our stringent case selection of women with early abortions with unidentified cause.

Chromosomal abnormalities were found in 11 women with pregnancy loss, including mosaicism in the X-chromosome in seven cases (63.7%), reciprocal translocations in three cases (27.3%) and Robertsonian translocation in one case (9%). The frequency of X-chromosome mosaicism was higher than that found in previous reports, where it has been reported to be between 0-30% of cases.

However, similar results were found by Kiss et al., (2009) and Pal et al., (2009), who reported X-chromosome mosaicism in 50% and 48% of the cases, respectively. This finding is likely related to the type of sample selected and the number of metaphases analyzed. In our study, we analyzed 30 cells, but most other studies have investigated 15 to 20 cells. According to the literature, the greater the number of metaphases analyzed, the greater the chance of detecting mosaicism of lesser degree.



It has been related that approximately 3% of infertile males and 5-10% of those with oligospermia or azoospermia had mosaic Klinefelter syndrome <sup>16</sup>.

In the present study, we found four cases of translocations in women with recurrent miscarriages: t(11;18), t(2;12), t(11;17) and one Robertsonian translocation (14;21). The translocations were more common in women (2.6%) compared to men (0%), which has also been reported by other authors. According to some authors, as male carriers of translocations have reduced fertility, chromosomal abnormalities in the female partner are a more common finding in couples with recurrent miscarriages <sup>8</sup>. The significant increase in reciprocal translocation in couples with reproductive failure is an expected finding because the carriers of reciprocal translocation have a significantly increased risk of chromosomal imbalance (partial chromosomal duplication/deficiency) during gametogenesis due to unequal meiotic segregation of the balanced translocation <sup>13, 17, 18</sup>.

It has been reported that the crossing over that occurs during meiotic division may lead to deletion or duplication of a chromosome segment in pericentric inversion. One case of pericentric inversion (in chromosome 18) was found in a male patient. The length of the inverted segment of the carrier patients seems to be a decisive factor determining the effects of a pericentric inversion in the progeny. Indeed, genetically unbalanced gametes have a greater chance of arising from a large rather than a small inversion in the meiotic loop <sup>19</sup>.

The most frequent pericentric inversion in the general human population is inv (9). This inversion is usually a normal polymorphism, however, its clinical consequences remain unclear <sup>20, 21</sup>. In addition, the additional G (+) band in the cases of 9qh+ and 16qh+ are not believed to be an etiological cause of abortion

because these bands are in the heterochromatin blocks, which contain no active genes<sup>13</sup>.

The frequency of chromosomal abnormalities was higher in women with recurrent miscarriages (7.3%) than in men (2.1%), but it showed no significant difference ( $p = 0.89$ ). The major chromosomal abnormalities found were X-chromosome mosaicism (4.7%), followed by reciprocal translocations (2%).

An association was observed between chromosomal abnormalities and recurring abortions in the first trimester in the group of women studied. These data confirm that chromosomal studies in couples with recurrent abortion are an important and necessary part of the etiological investigations. Some studies have been performed in other regions of Brazil, but this is the first in Salvador, Bahia.

Chromosome abnormalities are identified in approximately 50% of all first trimester spontaneous abortions. The estimate of frequency of second trimester chromosomal abnormalities is 15%<sup>22</sup>. In an attempt to obtain a homogeneous sample, we included in our study only idiopathic recurrent first trimester abortions. Which reduced the sample size, preventing an analysis of potential confounding and interaction of covariates smoking, alcohol and coffee.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Acknowledgement**

This study was supported by CNPq, contract grant number: 620219/2008-4.

FIOCRUZ/ Brazilian Minister of Health.

We are especially grateful to the Ambulatory of genetics of University Hospital Professor Edgard Santos that collaborated in the recruitment of women of group case.

## REFERENCES

- [1] Roman E. Fetal loss rates and their relation to pregnancy order. *J Epidemiol Community Health*, 1984; 38(1): 29–35.
- [2] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage, *Lancet*, 2006; 368 (9535) 601– 611.
- [3] Kuo PL, Guo HR. Mechanism of recurrent spontaneous abortions in women with mosaicism of X-chromosome aneuploidies. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1594-601.
- [4] Howard C, Vladimir T, Ayala A, Michal D, Shlomo M, Gad B. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2001; 75(4):678-82.
- [5] Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189 (2):397-400.
- [6] De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum. Reprod*. 1990; 5 (5) 519–528.
- [7] Ozawa N, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Arase T, Ishimoto H, Yoshimura Y. Pregnancy outcomes of reciprocal translocation carriers who have a history of repeated pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008, 90(4):1301-4.
- [8] Pal S, Ma SO, Norhasimah M, Suhaida MA, Siti Mariam I, Ankathil R, Zilfalil BA. Chromosomal abnormalities and reproductive outcome in Malaysian couples with miscarriages. *Singapore Med J* 2009, 50(10):1008-12.
- [9] Hirshfeld-Cytron J, Sugiura-Ogasawara M, Stephenson MD. Management of recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a reciprocal translocation:  
a systematic review. *Semin Reprod Med*. 2011, 29(6):470-81.
- [10] Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, Fujita T, Kawaguchi R, Maruyama T, Ozawa N, Sugi T, Takeshita T, Saito S. Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J Hum Genet*. 2008; 53(7):622 – 8.
- [11] Stephenson M D. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril*. 1996; 66(1):24-9.

- [12] Kiss A, Rosa RFM, Dibi RP, Zen PRG, Pfeil JN, Graziadio C. Chromosomal abnormalities in couples with history of recurrent abortion. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009; 31(2):68-74.
- [13] Celep F, Karagüzel A, Ozeren M, Bozkaya H. The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 127(1):106-9.
- [14] Kochhar P. K; Ghosh, P . Reproductive outcome of couples with recurrent miscarriage and balanced chromosomal. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2013; 39(1): 113–120.
- [15] Van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(12):1951-9.
- [16] Abdel-Razic MM, Abdel-Hamid IA, Elsobky E, El-Dahtory F. Further Evidence of the Clinical, Hormonal, and Genetic Heterogeneity of Klinefelter Syndrome: A Study of 216 Infertile Egyptian Patients. *J Androl.* 2012;33(3):441-8.
- [17] Fryns JP, Van BG. Structural chromosome rearrangements in couples with recurrent fetal wastage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998; 81(2):171-6.
- [18] Panasiuk B, Danik J, Lurie IW, Stasiewicz-Jarocka B, Leśniewicz R, Sawicka A, Kałuzewski B, Midro AT. Reciprocal chromosome translocations involving short arm of chromosome 9 as a risk factor of unfavorable pregnancy outcomes after meiotic malsegregation 2:2. *Adv Med Sci.* 2009; 54(2):203-1.
- [19] Fauth C, Bartels I, Haaf T, Speicher MR. Additional dark G-band in the p-arm of chromosome 19 due to a paracentric inversion with a breakpoint in the pericentromeric heterochromatin. *Am J Med Genet.* 2001;103(2):160-2.
- [20] Amiel A, Sardos-Albertini F, Fejgin MD, Sharony R, Diukman R, Bartoov B. Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin. *J Hum Genet.* 2001; 46(5):245-50.
- [21] Dana M, Stoian V. Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica (Buchar).* 2012; 7(1):25-9.
- [22] Simpson JL. Causes of fetal wastage. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50(1):10-30.
- [23] Krieger H, Morton NE, Mi MP, Azevêdo ES, Freire-Maia N, Yasuda N. Racial admixture in northeastern Brazil. *Ann Hum Genet* 1965; 29(2):113-25.

## TABLES

Table 1. Number of abortions of women with history of losses recurrent pregnancy.

N.abortions	N.of patients	%
2	72	47.6%
3	57	37.7%
4	11	7.2%
5	6	3.9%
6	4	2.6%
7	1	0.6%
Total	151	100%

Table 2 Epidemiological data of women with recurrent miscarriage and controls.

Data	Cases			Controls			pvalue
Age	32.1			25.8			0.00
Mean abortions	2.8			1.8(children)			
Smoker	11.4%			4.3%			0.15
alcoholic beverage	54.3%			43.7%			0.15
coffee	76%			86.4%			0.18
Mean meals / day	4.0			4.2			
thrombosis	0%			0%			
Use of medication	Yes	Not		Yes	Not		
	4.3%	95.7%		3%	97%		
Education	College	H. school		college	H. school		
	30.4%	69.6%		9%	91%		
* Racial Group	white	Black	Mulatto	white	Black	Mulatto	
	17.3%	11%	71.7%	16%	27%	57%	

\* According Krieger, et. al. 1965.

Table 1. Chromosomal abnormalities in the group of women with recurrent pregnancy losses and their partners and the controls.

INDIVIDUALS	Structural alterations/n	Numerical alteration / n	Total%
WOMEN	46,xxt(11;18) (q25;921) (1) 46,xxt (11;17) (1) 46,xxt(2;12) (1) 45,xxrob (14;21) (q10q10) (1)	46,xx/47,xxx (2) 46,xx/47,xxx/45,x (3) 46,xx/49,xxxxx/45,x (1) 46,xx/49,xxxxx (1)	
Total	04 (2.6%)	07 (4.7%)	11(7.3%)
CONTROLS	-----	46,xx/47,xxx (1)	01(1%)
MEN	46,xy inv(18)q10 (1)	46,xy/47,xxy (1)	02(2.1%)

Table 2 .Normal variations in the structure of chromosomes in cases and controls

INDIVIDUALS	NORMAL VARIANTS	N.	Total /%
WOMEN	46,XX inv (9p) 46,XX, 21pstk+ 46,xx, 9qh+ 46,XX, 16qh+	1 1 3 2	7 (4.6%)
CONTROLS	46,XX inv (9p)	3	3 (3.0%)
MEN	46xy9qh+	6	6 (6.4%)