



RENATA ZACCARIA SIMONI

**TROMBOFILIA HEREDITÁRIA EM FETOS COM
MALFORMAÇÕES DE ORIGEM VASCULAR**

*Inherited thrombophilia in fetuses with malformations of
vascular origin*

**CAMPINAS
2012**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

RENATA ZACCARIA SIMONI

**TROMBOFILIA HEREDITÁRIA EM FETOS COM
MALFORMAÇÕES DE ORIGEM VASCULAR**

*Inherited thrombophilia in fetuses with malformations of
vascular origin*

Orientadora: Profa. Dra. EGLE CRISTINA COUTO DE CARVALHO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde, área de concentração em Saúde Materna e Perinatal.

Thesis of Doctorate presented to the Graduate Program of Obstetrics and Gynecology from the School of Medical Sciences, University of Campinas for obtaining the title of Doctor in Health Sciences, concentration area of Maternal and Perinatal health.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA RENATA ZACCARIA SIMONI
SOB ORIENTAÇÃO DA PROFA. DRA. EGLE CRISTINA COUTO DE CARVALHO**

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si57t Simoni, Renata Zaccaria, 1972-
Trombofilia hereditária em fetos com malformações
de origem vascular / Renata Zaccaria Simoni. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Egle Cristina Couto de Carvalho.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anormalidades congênicas. 2. Hidrocefalia. 3.
Gastrosquise. 4. Doenças genéticas inatas. 5.
Trombofilia hereditária. I. Carvalho, Egle Cristina Couto
de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Genetic polymorphisms in fetuses with malformations of vascular origin.

Palavras-chave em inglês:

Congenital abnormalities

Hydrocephalus

Gastroschisis

Genetic diseases, Inborn

Inherited thrombophilia

Área de concentração: Saúde Materna e Perinatal

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Egle Cristina Couto de Carvalho [Orientador]

Nelson Lourenço Maia Filho

Helaine Maria Besteti Pires Milanez

Lourenço Sbragia Neto

Marcelo Luis Nomura

Data da defesa: 05-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: RENATA ZACCARIA SIMONI

Orientadora: Profa. Dra. Egle Cristina Couto de Carvalho

Membros:

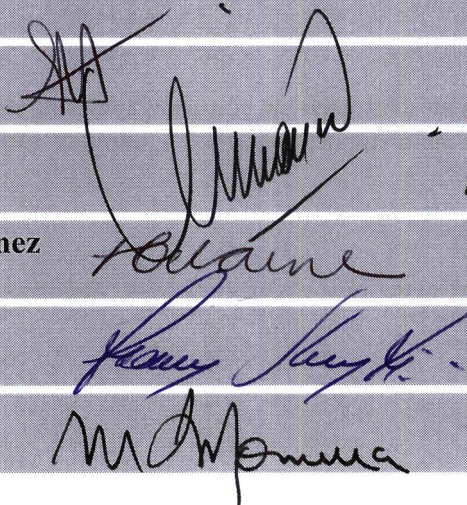
1. Egle Cristina Couto de Carvalho

2. Nelson Lourenço Maia Filho

3. Helaine Maria Besteti Pires Milanez

4. Lourenço Sbragia Neto

5. Marcelo Luís Nomura



Handwritten signatures of the five members of the exam board, corresponding to the list on the left. The signatures are written in black ink on a light background.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 05/12/2012

Dedico este trabalho...

*Às minhas filhas **Rebecca e Sophia**,
minha melhor “produção”, meu sonho realizado,
minha maior felicidade.*

*Ao meu amor Amaury,
pelo carinho, paciência e incentivo...*

*Aos meus queridos pais, por me incentivarem a trilhar
este caminho, e conseguir chegar onde sonhei...*

Sem vocês, esta conquista não seria possível.

Agradecimentos

A Deus, por iluminar sempre meu caminho...

Às participantes do estudo, que mesmo em seu momento mais sublime, colaboraram voluntariamente para este estudo.

À Prof^a. Dr^a. Egle Cristina Couto de Carvalho, pela oportunidade em realizar o sonho de ser Doutora. Agradeço por sua orientação, pela confiança e ajuda em todas as etapas e conquistas de minha vida.

À Prof^a Dra. Joyce M Anichino Bizacchi, do Hemocentro, por sua participação na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Juliana Heinrich, do Laboratório de Procedimentos Especializados do CAISM, pela grande colaboração.

Aos Prof.(as) Drs(as), João Luiz Pinto e Silva, Belmiro Gonçalves Pereira, José Guilherme Cecatti. Eliana Martorano Amaral, Renato Passini Júnior, Mary Ângela Parpinelli, Helaine Milanez, Fernanda Surita, Ricardo Barini, Bussâmara Neme, Marcelo Nomura, Adriana Luz, Patricia Rehder, Giuliane Lajos, Maria Laura Nascimento, Anderson Pinheiro e Tábata Zumpano Dias, pelas conversas, pelos ensinamentos e pelos ótimos momentos.

À Conceição Silva Santos, Secretária da Divisão de Obstetrícia, minha “MÃE” e amiga presente em todos os momentos de minha vida, pelo carinho e dedicação sempre que precisei, ao longo de todos estes anos...

À Karla Thainá e Camila, da Divisão de Obstetrícia, pela alegria e disposição sempre.

Às Enfermeiras e funcionárias Administrativas dos Ambulatórios de Pré Natal de Alto Risco e Pré Natal Especializado do CAISM, pelo acolhimento, carinho e dedicação por serem sempre solícitas.

À Denise, Secretária da Sub Comissão de Pós-Graduação do Departamento de Tocoginecologia pela colaboração em todos momentos.

À Margareth, Secretaria do Departamento de Tocoginecologia, pela amizade, companheirismo e dedicação.

À Márcia, Secretária da Comissão de Pesquisa do Departamento de Tocoginecologia, pelas informações e ajuda.

Aos alunos de graduação e residência, pela colaboração para estímulo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às outras pessoas, que em todos os momentos souberam compreender meus momentos ausentes e de nervosismo. Obrigada pela paciência e por estarem sempre ao meu lado!

SUMÁRIO

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	XIII
LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	33
2.1. OBJETIVO GERAL	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. SUJEITOS E MÉTODO	34
3.1. DESENHO DO ESTUDO	34
3.2. TAMANHO AMOSTRAL	34
3.3. SELEÇÃO DOS SUJEITOS	36
3.3.1. Critérios de inclusão para o grupo Casos	37
3.3.2. Critérios de exclusão para o grupo Casos	37
3.3.3. Critérios de inclusão para o grupo Controle	37
3.3.4. Critérios de exclusão para o grupo Controles	38
3.4. VARIÁVEIS E CONCEITOS	38
3.4.1. Variáveis independentes	38
3.4.2. Variáveis dependentes	38
3.4.3. Variáveis de controle	40
3.5. TÉCNICAS, TESTES E EXAMES	41
3.5.1. Extração do DNA	41
3.5.2. Análise dos polimorfismos do DNA – mutação C677T-MTHFR (76)	41
3.5.3. Análise dos polimorfismos do DNA – fator V de Leiden (77)	42
3.5.4. Análise dos polimorfismos do DNA – mutação G2021A-FII (26)	43
3.5.5. Interpretação dos resultados	43
3.5.6. Instrumentos para coleta de dados	44
3.5.7. Coleta de dados	44
3.5.8. Processamento e análise dos dados	45
3.5.9. Aspectos éticos	46
4. PUBLICAÇÕES	48
4.1. ARTIGO 1	49
4.2. ARTIGO 2	69
5. DISCUSSÃO	86
6. CONCLUSÕES	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

8. ANEXOS.....	109
ANEXO 1 - FICHA PARA COLETA DE DADOS	109
ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	110
ANEXO 3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO BANCO DE SANGUE DO CORDÃO DO HEMOCENTRO DA UNICAMP	111
ANEXO 4. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCM – UNICAMP ...	114
ANEXO 5. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DAS OUTRAS MALFORMAÇÕES	116

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
BMI	Índice de massa corpórea / <i>Body mass index</i>
CAISM	Centro de Atenção Integral á Saúde da Mulher – Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Departamento de Tocoginecologia
EUA/USA	Estados Unidos da América / <i>United States of America</i>
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
mg	Miligramas
mM	Milimoles
μL	Microlitros
MTHFR	Metileno tetrahidrofolato redutase / <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>
ng	Nanogramas
OR	Odds-ratio

PA	Estado do Pará
RCP / PCR	Reação em cadeia da polimerase / <i>Polymerase chain reaction</i>
SNC / CNS	Sistema nervoso central / <i>Central nervous system</i>
SP	Estado de São Paulo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	Distribuição mundial das frequências do alelo T (677-MTHFR)	35
Table 1 (Artigo 1)	<i>Median values, range and p-value resulting from the comparison between groups for sample characterization</i>	65
Table 2 (Artigo 1)	<i>Distribution of C677T-MTHFR by type of CNS malformation</i>	66
Table 3 (Artigo 1)	<i>Results of analyses of fetal polymorphisms in Cases and Controls</i>	67
Table 4 (Artigo 1)	<i>Risk of CNS malformations according to the result of the C677T-MTHFR mutation in fetal blood</i>	68
Table 1 (Artigo 2)	<i>Demographic and obstetric history of the studied mothers</i>	83
Table 2 (Artigo 2)	<i>Results of fetal polymorphisms for cases and controls</i>	84
Table 3 (Artigo 2)	<i>Allele distribution between cases and controls</i>	85
Tabela 1	Resultado da mutação C677T-MTHFR nas outras malformações estudadas	116

RESUMO

Contexto e objetivo: Algumas malformações congênitas têm origem vascular, e a trombose durante a organogênese já foi aventada como possível mecanismo para esta ocorrência. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre trombofilia fetal e malformações de origem vascular.

Tipo de estudo e local: Foi realizado um estudo caso-controle, desenvolvido no ambulatório de Medicina Fetal do CAISM UNICAMP, de 2005 a 2010.

Métodos: Foram incluídos no estudo 100 fetos com malformações de sistema nervoso central (SNC), gastrosquise, *limb body wall* e redução de membros (casos), submetidos a cordocentese como rotina do serviço, cujos resultados de cariótipo foram normais. Como controles, foram incluídos 100 fetos sem malformações cujo sangue de cordão fora previamente doado para o Banco de Sangue de Cordão do HEMOCENTRO UNICAMP. A pesquisa das mutações Fator V de Leiden, G20210A-FII e C677T-MTHFR foi realizada no sangue fetal dos dois grupos, e os resultados foram comparados. A análise descritiva foi feita utilizando Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher. Para avaliar a associação entre as variáveis, foram utilizados o teste de Wilcoxon e a regressão logística.

Resultados: Foram incluídos 78 fetos com malformações de SNC, 14 com gastrosquise, 3 com redução de membros e 2 com *limb body wall*. As mutações fator V de Leiden e G20210A-FII não foram encontradas nos casos e nos controles. A mutação C677T-MTHFR foi encontrada na forma heterozigota (CT) em 24 casos (24,8%) e em 6

controles. A mutação homozigota (TT) foi encontrada em 7 casos (7,2%) e em 1 controle. Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Quando avaliados os fetos com malformações de SNC (Artigo 1), a mutação CT foi encontrada com frequência significativamente maior nos casos do que nos controles (OR 10.309 IC95% 3.344-32.258), e a mutação TT também mostrou diferença significativa (OR 12.346 IC95% 1.388-111.11). A avaliação dos 14 fetos com gastrosquise (Artigo 2) não mostrou diferenças significativas quanto à presença da mutação CT ou TT entre os casos e os controles.

Conclusão: A presença da mutação C677T-MTHFR no sangue fetal mostrou associação com malformações de SNC, tanto na forma homozigota quanto heterozigota.

Palavras-chave: anormalidades congênitas, hidrocefalia, gastrosquise, doenças genéticas inatas, trombofilia hereditária.

ABSTRACT

Context and objective: Some congenital malformations have vascular origin, and a thrombosis during organogenesis is a possible mechanism for them. The aim of this study was to evaluate the association between fetal thrombophilia and malformations of vascular origin.

Study type and location: A case-control study was performed at the Fetal Medicine Outpatient Clinic of CAISM UNICAMP, from 2005 to 2010.

Methods: Ninety-seven fetuses with central nervous system malformations, gastroschisis, limb body wall and limb reduction were included in the study (cases), after routine cordocentesis showed normal karyotype results. A hundred fetuses without malformations were included as controls. These fetuses' cord blood had been donated to the Cord Blood Bank of HEMOCENTRO UNICAMP. DNA was extracted from fetal cord blood to study the mutations Factor V Leiden, G20210A-FII and MTHFR-C677T in both groups. Descriptive analysis was realized using Chi-square and Fisher's Exact Test. Wilcoxon test and logistic regression were used to analyse the associations among variables.

Results: We found 78 fetuses with central nervous system malformations, 14 with gastroschisis, 3 with member reduction and 2 with limb body wall. The mutations Factor V Leiden and G20210A-FII were not detected in cases nor in controls. The mutation MTHFR-C677T was encountered in 24 cases (24.8%) and in 6 controls its heterozygous form (CT). The homozygous mutation (TT) was found in 7 cases (7.2%) and in one control. These differences were statistically significant ($p < 0.0001$). When the fetuses

with central nervous system malformations were evaluated separately (Article 1), the frequency of the CT mutation was significantly higher in cases than in controls (OR 10.309 95% CI 3.344-32.258), as did the TT mutation (OR 12.346 95% CI 1.388-111.11). The 14 fetuses with gastroschisis were also evaluated separately (Article 2), and the results showed no statistically significant differences between cases and controls when concerning to the presence of the mutation MTHFR-C677T.

Conclusion: The presence of the mutation MTHFR-C677T in fetal blood was associated with central nervous system malformations, both in homozygous and heterozygous form.

Keywords: congenital abnormalities, hydrocephalus, gastroschisis, genetic diseases - inborn, inherited thrombophilia.

1. INTRODUÇÃO

As malformações congênitas acometem 3 a 5% dos nascidos vivos (1,2), e algumas delas têm mecanismos vasculares em sua origem. A trombose do sistema nervoso central (SNC), por exemplo, ocorre em 1,35 de cada 100.000 nascidos vivos (3), e foi associada a algumas malformações deste sistema. Os defeitos do SNC são, depois dos cardíacos, as falhas mais comuns, e ocorrem em aproximadamente 21% dos casos de malformação (2).

1.1. Malformações fetais de possível origem vascular

A hidrocefalia fetal ocorre, em 60% dos casos, como consequência de malformações, tumores e lesões destrutivas; em 40% dos casos, a causa não é encontrada (4). Ela é definida como aumento dos átrios ventriculares maior que 10 mm, sendo classificada como leve (10-15mm), moderada (>15mm com cortex residual >2mm) e severa (cortex residual <2mm) (5,6). A origem vascular foi postulada como uma teoria para ocorrência das hidrocefalias sem causa aparente (7).

Outra importante malformação do SNC, a anencefalia é ausência de tecido cerebral e do fechamento superior da calota craniana, e sua incidência, no Brasil, é de 18 casos para cada dez mil nascidos vivos, taxa mais de cinquenta vezes maior do que a observada em países da Europa, como França e Áustria (8). Origina-se de uma neurulação anormal que ocorre entre o 23º e 28º dias de gestação, resultando na ausência de fusão das pregas neural e da formação do tubo neural na região do encéfalo (9,10).

Um defeito na linha mediana da coluna vertebral, a espinha bífida, leva à exposição do canal medular e ocorre entre a terceira e quarta semanas de gestação. Pode apresentar diversas localizações e extensões, e as estruturas envolvidas definem o prognóstico; é lombossacra em 90% dos casos (11).

A encefalocele apresenta-se como protrusão do conteúdo intracraniano através de defeito ósseo na calota craniana. Pode ser associada com síndromes genéticas ou não, porém freqüentemente é associada com outras malformações. É rara, ocorrendo em 1,2 para cada 10.000 nascimentos. A mortalidade perinatal chega a 40% dos casos e a grande maioria dos sobreviventes apresenta déficit intelectual (12).

Na porencefalia, cistos cerebrais formam cavidades que podem se comunicar com o sistema ventricular. Seu desenvolvimento geralmente é bilateral e simétrico, podendo ser associado com microcefalia. A hidranencefalia representa a forma extrema de pseudoporencefalia. Sua causa é heterogênea, podendo envolver infecção congênita ou oclusão da carótida interna. A ocorrência é rara (13).

As malformações de parede abdominal fetal têm sido relatadas precocemente com o uso da ultrassonografia. O diagnóstico, em média, é feito com 10 semanas de gestação. Porém, sua formação ocorre entre a quinta e a décima semana de atraso menstrual. Algumas seqüências de aberrações podem cursar com essa anormalidade, podendo ser de diferente espectro o achado (14).

A gastrosquise incide em 1,75 a 2,5 para cada 10.000 nascimentos, preferencialmente no sexo masculino. Ocorre mais frequentemente à direita, envolvendo todas as camadas da parede abdominal, com extensão de aproximadamente dois a quatro centímetros;

raramente ocorre à esquerda devido à proteção hepática. Geralmente envolve alças intestinais e fígado; ocasionalmente envolve estômago e outros órgãos. Várias teorias são envolvidas na patogenia desta malformação, como a teoria da involução anormal da veia umbilical, acidente intravascular da artéria onfalomesentérica e rotura intra-útero precoce da onfalocele. Em 7 a 30% dos casos, pode ser associada com outras malformações, como hipoperistaltismo, má rotação intestinal, isquemia ou múltiplas atresia devidas a irritação química (15).

A síndrome de *limb body wall* é rara, ocorrendo em 1 para 42.000 nascimentos. É uma anomalia de disrupção que consiste na falência de fechamento da parede abdominal anterior, cordão umbilical curto, escoliose, anormalidades faciais e craniais. Essa anormalidade pode ocorrer isoladamente ou em associações com diversas malformações, sendo característica fundamental a ausência de fusão entre o âmnion e o córion. A teoria mais usada para explicar essa malformação envolve alterações hematológicas que levam ao desenvolvimento incompleto do sistema vascular fetal, com conseqüente hemorragia, necrose e anóxia dos tecidos, por volta da quarta a sexta semana de atraso menstrual (16).

A redução de membros afeta 3-8 para cada 10.000 recém-nascidos (17), e pode ser classificada como completa (amelia) ou parcial (meromelia). Em alguns casos a causa pode ser determinada, como a presença de uma brida amniótica, anomalias cromossômicas ou teratogenicidade. Em 1982 foi sugerido que a causa destas malformações poderia envolver acidentes vasculares (18).

Várias das malformações descritas foram associadas a fatores de trombofilia hereditária. Discorreremos sobre os principais fatores de trombofilia envolvidos nesse processo e, a seguir, mostraremos algumas das associações.

1.2. Fatores de trombofilia hereditária

Trombofilia é um termo aplicado a pacientes com tendência a trombose, com idade precoce ou recorrência freqüente, forte história familiar ou localizações não usuais e migratórias. A definição de trombofilia hereditária é: “tendência geneticamente determinada a tromboembolismo venoso e/ou arterial”. Anormalidades dominantes ou combinações de defeitos menos graves podem expressar-se clinicamente pela ocorrência de trombose espontânea em idade precoce, recorrência freqüente ou história familiar. Tendências leves podem ser descobertas por investigação laboratorial ou pela ocorrência de trombose na presença de fatores de risco. Todas as influências genéticas e suas interações não são, todavia, completamente entendidas (19).

A trombofilia familiar pode causar abortos e sérias complicações na gravidez, além de falhas de implantação nos casos de fertilização *in vitro*. Tal estado parece interferir no desenvolvimento do sistema vascular útero placentário, tornando-o ineficaz (20).

Algumas mutações genéticas, como o fator V de Leiden, a mutação G20210A do gene da protrombina e C677T no gene da enzima metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR) foram sugeridas como fatores que poderiam agir durante a organogênese, induzindo a redução ou o bloqueio da irrigação sanguínea, e interferindo na formação de diversos órgãos e partes fetais. Detalharemos, a seguir, estas mutações.

1.2.1. Fator V de Leiden

O estudo da trombose familiar progrediu muito nos últimos anos. A presença de famílias com trombose sugeria um defeito genético, e vários membros apresentavam resistência à proteína C ativada. Após investigação, excluíram-se alguns dos possíveis mecanismos: uma proteína mutante que atuaria como inibidor da proteína C ativada, um defeito funcional da proteína S, uma mutação no gene do fator VIII, auto-anticorpos contra proteína C ou anticorpos antifosfolípidos inibindo a função da proteína C ativada. As possibilidades restantes eram: uma mutação no gene do fator V alterando um dos sítios de clivagem ou função deficiente de um cofator desconhecido da proteína C ativada. A resistência à proteína C ativada era corrigida por uma fração protéica do plasma normal, que, purificada, mostrou-se idêntica ao fator V intacto, o que sugeriu que a resistência à proteína C ativada fosse resultado de defeito no gene do fator V. Em experimentos com mistura de plasma, a resistência à proteína C ativada foi corrigida por todos os plasmas com deficiências, exceto por aquele com deficiência do fator V. O fator V isolado corrigiu a resistência à proteína C ativada (21).

Foi identificada uma mutação no gene do fator V como base molecular para o fenótipo da resistência à proteína C ativada na maioria dos indivíduos afetados. Esta mutação foi encontrada em 50% das famílias com trombofilia e em 20% dos pacientes com trombose (19).

O fator V é uma glicoproteína plasmática de cadeia única, sintetizada no fígado e megacariócitos. Durante a coagulação, é convertido em fator V ativado pela trombina

e/ou fator Xa. Atua como cofator não enzimático da protrombinase, aumentando sua eficiência catalítica em aproximadamente duas mil vezes (19).

O fator Va não é apenas um cofator na reação da protrombinase, mas também um cofator na inativação do fator VIIIa pela proteína C ativada. O gene do fator V foi mapeado no cromossomo 1 e está intimamente ligado ao gene da ATIII. (19).

Em 1994 foi descrita uma mutação no gene do fator V (fator V de Leiden), responsável por 95% dos casos de resistência à proteína C ativada. A mutação, que ocorre em um dos sítios de clivagem da proteína C ativada no fator V, é uma transição de G para A na posição 1691, que prediz a substituição de arginina por glutamina. Esse fator V mutante é menos susceptível à inativação pela proteína C ativada do que o fator V normal (22).

A mutação no gene do fator V causa um estado de hipercoagulação através da lentificação da inativação do fator Va pela proteína C ativada (23). O fator V mutante expressa atividade pró-coagulante normal, mas é menos sensível à degradação mediada pela proteína C ativada, o que resulta em estabilização do complexo protrombinase, aumento na geração de trombina e ativação retrógrada dos fatores V e VIII. A taxa aumentada de ativação da cascata de coagulação, concomitante com a perda da atividade do fator V dependente da proteína C ativada, potencializa a resistência à proteína C ativada e resulta em hipercoagulação (21).

O fator V de Leiden é comum em pacientes com trombose, estando presente em aproximadamente 20% a 40% daqueles com um episódio de trombose venosa profunda. Sua frequência no Brasil é similar à descrita, apesar das diferenças étnicas entre as populações (24). A população brasileira é altamente miscigenada e deriva de imigrantes

vindos de Portugal, Espanha, Itália, África, Ásia e Europa Central, cuja porcentagem varia nas diferentes regiões do Brasil.

A frequência do fator V de Leiden em populações caucasianas é de aproximadamente 6% (19). Estudos em famílias sugerem que o fator V de Leiden é herdado como um traço autossômico dominante (21,25). Foi encontrada a mutação no gene do fator V na maioria (94%) das famílias com resistência hereditária à proteína C ativada (21).

A alta prevalência do fator V de Leiden na população geral sugere seleção genética positiva envolvida. Durante a evolução, um discreto estado de hipercoagulabilidade pode ter conferido certa vantagem em situações como lesão traumática e gravidez (21).

1.2.2. Mutação G20210A na protrombina (G20210A-FII)

A protrombina é o precursor da protease trombina, enzima chave nos processos de hemostasia e trombose, que exibe atividade procoagulante e anticoagulante. Uma transição no gene da protrombina G→A na posição 20210 foi encontrada em 18% dos pacientes com história pessoal e familiar de trombose venosa, em 6,2% de pacientes com primeiro episódio de trombose venosa profunda (26) e em 0,7% a 4 % da população normal (27).

A mutação G20210A no gene da protrombina parece ser mais comum no sul da Europa (3%) (27). Portadores do alelo G20210A apresentam níveis plasmáticos de protrombina mais altos do que os controles e risco 2,8 vezes maior de trombose (26). Na população brasileira, esta mutação foi encontrada em 6,2% dos pacientes com trombose venosa profunda (28).

O alelo G20210A está associado com níveis elevados de protrombina. Os portadores têm níveis de protrombina mais altos, e este aumento, por si só, é fator de risco para trombose (26).

O nível elevado de protrombina pode ser considerado um mecanismo para trombose, mas outros fatores além do alelo G20210A podem ser responsáveis. Não é claro como os níveis elevados de protrombina estimulariam a formação de trombose. Eles podem causar um desequilíbrio entre os sistemas procoagulante e anticoagulante (26).

1.2.3. Mutação C677T na enzima metileno tetrahidrofolato redutase (MTHFR)

A mutação C677T no gene da MTHFR foi descrita como maior responsável pela hiperhomocisteinemia moderada. Essa mutação leva à formação da enzima MTHFR termolábil, que apresenta apenas 50% de atividade, o que explica o aumento da homocisteína plasmática (19).

A homocisteína é um aminoácido derivado da conversão metabólica da metionina. No metabolismo intracelular, sofre remetilação para metionina ou transulfuração para cisteína, estando envolvidos neste processo o folato e a cobalamina ou vitamina B12 (23,29). A homocisteína é oxidada no plasma em homocistina e homocisteína-cistina, ambas referidas como homocisteína total (23). Várias condições herdadas ou adquiridas podem causar hiperhomocisteinemia, como deficiências de vitaminas, causas genéticas ou atividade enzimática reduzida (23,29).

A insuficiência renal crônica e outros fatores que interferem com o metabolismo do folato, como o uso de metotrexate ou anticonvulsivantes, ou com o metabolismo da

cobalamina, como o óxido nítrico, podem causar hiperhomocisteinemia leve ou moderada. A hiperhomocisteinemia leve ou moderada aumenta o risco para acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica e estenose das artérias carótidas extracranianas (23).

A frequência da hiperhomocisteinemia severa na população geral é 1:200.000 a 1:335.000. Indivíduos afetados apresentam retardo mental, anomalias esqueléticas, doença vascular arterial prematura e trombose venosa profunda com ou sem embolia pulmonar (64%), tromboflebite (24%) e trombose de veias cerebrais ou mesentéricas (12%) (23).

A deficiência do ácido fólico é um fator de risco importante para os defeitos de fechamento do tubo neural, mas o mecanismo exato de falha na embriogênese ainda é desconhecido. A enzima metileno tetraidrofolato redutase (MTHFR) é um componente-chave no metabolismo do folato. Sua deficiência pode levar a redução na concentração plasmática de folato, vitamina B12 e metionina, além do aumento da homocisteína. A geração de uma enzima termolábil com menor atividade foi implicada na patogênese dos defeitos de tubo neural em algumas populações (30). Por esta razão, alguns pesquisadores sugeriram a associação da mutação C677T no gene desta enzima com defeitos de fechamento do tubo neural (31, 32). No entanto, essa associação não foi confirmada em outros estudos (33,34).

1.3. Trombofilia e malformações fetais

Apesar de haver sugestões de uma possível associação entre trombofilia e malformações fetais de origem vascular, há poucos trabalhos avaliando esta relação. A hidrocefalia

(35) e microcefalia (36) subsequentes a trombose vascular foram descritas em relatos de caso.

Alguns relatos também descrevem a presença do fator V de Leiden em malformações raras, como a esquizecefalia. Ela se caracteriza pela presença de fendas nos hemisférios cerebrais que se estendem até os ventrículos laterais, com as bordas revestidas por substância cinzenta. De etiologia heterogênea, que pode envolver fatores hereditários ou processos destrutivos, costuma induzir deficiências motoras e cognitivas. Em dois casos relatados, as mutações C677T-MTHFR e fator V de Leiden foram encontrados em fetos com esta malformação (37). Além disso, a ocorrência de trombose cerebral na presença do fator V de Leiden foi relacionada tanto à hidrocefalia (38) quanto à porencefalia (39). A malformação congênita da veia cava inferior, com conseqüentes hipoplasia e trombose, também foi descrita em pacientes com fator V de Leiden (40,41,42).

A mutação G20210A no gene da protrombina foi descrita em alguns casos de malformação fetal, geralmente de região abdominal. A sugestão de que a atresia intestinal congênita pode resultar de acidente vascular mesentérico foi feita há muitos anos. Em experimento de 1955, Laux e Barnhard ligaram as veias mesentéricas de fetos de caninos, resultando em atresia intestinal. Tais achados foram reproduzidos em coelhos, ovelhas e cães (43). Com o advento dos métodos de diagnóstico para trombofilia hereditária, questionou-se se a predisposição genética poderia aumentar o risco de trombose mesentérica fetal. A avaliação de 28 crianças tratadas por atresia congênita de jejuno, íleo ou cólon, mostrou associação da doença com a presença do fator V de Leiden, mas não com a mutação G20210A-FII ou a C677T-MTHFR (44).

Outra malformação de parede abdominal fetal descrita em associação com fatores de trombofilia é a gastrosquise, que envolve todas as camadas da parede abdominal, geralmente com extrusão de fígado e alças intestinais, e tem várias teorias envolvidas em sua formação: involução anormal da veia umbilical, acidente vascular da artéria onfalomesentérica e rotura precoce intra-útero de onfalocele (Mortellaro et al., 2011). A indução da formação de trombo precocemente na gravidez, pela maior presença de estrógeno, foi descrita recentemente como possível teoria para a gastrosquise (45).

A avaliação de 220 pacientes com isquemia cerebral associada à persistência do forame oval mostrou alta prevalência da mutação G20210A-FII, mas não do fator V de Leiden (46). Entretanto, outros mostraram a presença significativa das duas mutações em situações similares (47, 48, 49).

A combinação do fator V de Leiden com a mutação G20210A-FII foi também descrita em recém-nascido com ausência de membros, e os autores concluíram que, nesses casos, é prudente explorar a presença de fatores de trombofilia em meio a outros possíveis responsáveis (50). A ausência de extremidades em recém-nascidos ocorre em 0,69 para cada 100.000 nascidos vivos. Em 35% dos casos, ocorre interrupção do suprimento vascular, seja por banda amniótica, uso de agentes vasoconstritores ou oclusão intravascular por trombo (51, 52).

Em 1982 foi sugerido que a causa destas malformações poderia envolver acidentes vasculares (53). Para avaliar a importância das trombofilias na redução de membros, 24 pares de mães e recém-nascidos foram avaliados quanto à presença de fatores adquiridos e hereditários. Os resultados mostraram excesso de fatores de trombofilia nos recém-

nascidos e/ou suas mães, atingindo significância estatística para os primeiros e sugerindo possível papel dos fatores de trombofilia como causa deste tipo de malformação (54).

Devido a sua participação no metabolismo do folato, e à bem descrita associação entre deficiência de folato e defeitos de fechamento do tubo neural (55, 56), a mutação C677T-MTHFR foi exaustivamente estudada neste tipo de malformação (31, 32, 34, 57, 58, 59). Apesar desta associação ter sido descrita em várias séries ao longo dos anos, o mecanismo exato de falha da embriogênese ainda é desconhecido (19). Por esta razão, pesquisadores sugeriram a associação da mutação com defeitos de fechamento de tubo neural. No entanto, essa associação não foi confirmada em outros estudos (33, 34).

Apesar de haver sugestões de uma possível associação entre trombofilia e malformações fetais de origem vascular, há poucos trabalhos avaliando esta relação. Algumas malformações subsequentes a trombose vascular foram descritas em relatos de caso (35, 36), mas as implicações da trombofilia hereditária no desenvolvimento anatômico fetal são desconhecidas. Para avaliar uma possível associação entre a presença de trombofilia fetal e alguns tipo de malformação, comparamos a presença do fator V de Leiden, das mutações G20210A-FII e C677T-MTHFR entre fetos com malformações de possível origem vascular e fetos morfolologicamente normais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a associação entre trombofilia hereditária fetal e malformações fetais de origem vascular.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a associação entre a presença, no feto, das mutações fator V de Leiden, G20210A no gene da protrombina e C677T no gene da enzima MTHFR e as seguintes malformações fetais: defeitos do SNC (hidrocefalia, anencefalia, hidranencefalia, porencefalia, encefalocele, microcefalia e espinha bífida), gastrosquise, *limb body wall* e redução de membros fetais.

3. SUJEITOS E MÉTODO

3.1. Desenho do estudo

Estudo caso-controle.

3.2. Tamanho amostral

Foram calculados dois tamanhos de amostra, de acordo com os seguintes parâmetros:

P_0 : proporção de controles expostos ao fator de risco

OR: Odds Ratio associado à exposição

α : Erro do tipo I

β : Erro do Tipo II

Cenário 1. Malformação Total x Controles

Utilizando os parâmetros abaixo:

P_0 : 0.25 OR: 3 α : 5% β : 10%

Tanto P_0 quanto o OR utilizados para este cálculo foram baseados nos estudos do Quadro 1, a seguir. O Quadro 1 mostra a prevalência da mutação C677T-MTHFR em diversas populações do mundo, incluindo os cinco continentes. Esta mutação foi utilizada como parâmetro para o cálculo do tamanho amostral por ser a mais prevalente dentre as três mutações estudadas. O cálculo baseado no fator V de

Leiden e na mutação G20210A na protrombina inviabilizaria a realização do estudo, por gerar tamanhos de amostra superiores a 10.000 indivíduos.

Com esses parâmetros, o tamanho da amostra é de 95 pacientes para cada grupo.

Cenário 2. Malformação do SNC x Controles

Utilizando os parâmetros abaixo:

P_0 : 0.25 OR: 3.5 α : 5% β : 10%

Tanto P_0 quanto o OR utilizados para este cálculo foram baseados nos estudos do Quadro 1, a seguir. Com esses parâmetros, o tamanho da amostra é de 75 pacientes para cada grupo.

Para o cálculo do parâmetro P_0 foram utilizados os seguintes estudos:

Quadro 1 - Distribuição mundial das frequências do alelo T (677-MTHFR)

Populações	n	Frequência (%)	Referência
América do Sul			
<u>Brasil</u>			
Branços (SP)	51	37	60
População miscigenada de São Paulo (SP)	296	23	28
População miscigenada de Belém (PA)	327	28	61
<u>México</u>			
População miscigenada do México	112	47	34
América do Norte			
<u>Estados Unidos</u>			
Judeus Ashkenazi	155	48	62
Caucasóides (Carolina do Sul)	151	35	63

<u>Canadá</u>			
Caucasóides	365	38	64
Euro-descendentes			
Europeus (EUA)	160	42	34
Europeus (EUA)	200	28	62
Europa			
<u>França</u>	456	37	65
<u>Itália</u>	289	40	66
<u>Inglaterra</u>	199	35	67
<u>Noruega</u>	329	29	68
<u>Holanda</u>	207	27	69
<u>Espanha</u>	36	54	70
Ásia			
<u>China</u>	24	25	71
<u>Japão</u>	778	37	72
Ásia-descendentes			
Japoneses (SP)	40	40	60
África			
Sub-Sahara	89	7	70
Afro-descendentes			
Africanos (SP/Brasil)	50	12	60
Africanos (Equador)	41	18	70
Africanos (PA/Brasil)	133	19	73
Africanos (EUA)	102	10	74
Africanos (Carolina do Sul/EUA)	146	11	63

3.3. Seleção dos sujeitos

Para o grupo Casos, foram selecionadas duplas mãe-feto que preencheram os critérios de inclusão e exclusão no dia de suas consultas de rotina no ambulatório

de Medicina Fetal do CAISM-UNICAMP, no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2010. Para o grupo Controles foram selecionadas duplas mãe-feto que doaram sangue do cordão umbilical ao Banco de Sangue de Cordão do HEMOCENTRO-UNICAMP, que preencheram os critérios de inclusão e exclusão.

3.3.1. Critérios de inclusão para o grupo Casos

Fetos com alguma das seguintes malformações isoladas: hidrocefalia, porencefalia, hidranencefalia, anencefalia, espinha bífida, encefalocele, microcefalia, gastrosquise, limb body wall e redução de membros. Todos foram submetidos a cordocentese para realização de cariótipo, como é rotina do serviço. Quando o cariótipo foi normal, o sangue obtido desta punção foi utilizado para a realização das mutações estudadas.

3.3.2. Critérios de exclusão para o grupo Casos

FORAM EXCLUÍDAS DO ESTUDO AS GESTANTES QUE SE NEGARAM A REALIZAR A CORDOCENTESE POR QUALQUER MOTIVO, NÃO HAVENDO PREJUÍZO AO SEU SEGUIMENTO NO SERVIÇO.

3.3.3. Critérios de inclusão para o grupo Controle

Foram incluídas neste grupo mulheres que tiveram filhos sem malformações e que doaram o sangue de cordão para o Banco de Sangue de Cordão do HEMOCENTRO-UNICAMP, colhido logo após o clampeamento do cordão umbilical e antes da dequitação placentária.

3.3.4. Critérios de exclusão para o grupo Controles

Antecedente de dois ou mais abortos espontâneos, óbito fetal, fenômenos tromboembólicos, hipertensão gestacional, diabetes e malformação fetal. Estes dados foram obtidos através do prontuário do HEMOCENTRO-UNICAMP e complementados por entrevista telefônica, quando necessário.

3.4. Variáveis e conceitos

3.4.1. Variáveis independentes

- Fator V de Leiden: mutação G1691A no gene do fator V, base molecular para o fenótipo da resistência à proteína C ativada. Categoria: homozigoto, heterozigoto, ausente.
- Mutação G20210A: mutação do gene da protrombina, que leva ao aumento dos níveis plasmáticos da mesma. Categorias: homozigoto, heterozigoto, ausente.
- Mutação C677T no gene da MTHFR: mutação no gene que codifica a enzima MTHFR, cuja deficiência leva ao aumento da homocisteína e conseqüente hiperhomocisteinemia. Categorias: homozigoto, heterozigoto, ausente.

3.4.2. Variáveis dependentes

- Hidrocefalia: aumento dos átrios ventriculares maior que 10 mm, sendo classificada como leve (10-15mm), moderada (>15mm com cortex residual >2mm) e severa (cortex residual <2mm) (5,6)

- Porencefalia: cistos cerebrais que formam cavidades que podem se comunicar com o sistema ventricular, geralmente é bilateral e simétrico, podendo ser associado com microcefalia; forma extrema de pseudoporencefalia (13).
- Hidranencefalia: ausência dos hemisférios cerebrais com meninges intactas e crânio de aparência normal, com foice intacta que separa os dois cistos hemisféricos. A membrana da parede é lúcida e transparente. Além da ausência de tecido cerebral, não há evidência de ventrículos laterais (75).
- Anencefalia: ausência de massa encefálica e telencéfalo, diagnosticada por ultrassom transvaginal entre 10-11 semanas de gestação, com presença de massa discóide (área cerebrovascular) substituindo o tecido cerebral. O cerebelo e a base do cérebro são menos comprometidos, mas as órbitas são superficiais e os olhos protraídos de suas bolsas (75).
- Espinha bífida: defeito na linha mediana da coluna vertebral, com exposição do canal medular, que ocorre entre a terceira e quarta semanas de gestação. Pode apresentar diversas localizações e extensões, e as estruturas envolvidas definem o prognóstico; é lombossacra em 90% dos casos (11).
- Encefalocele: protrusão do conteúdo intracraniano através de defeito ósseo na calota craniana. Pode ser associada com síndromes genéticas ou não, porém frequentemente é associada com outras malformações (12).
- Microcefalia: tamanho subnormal do cérebro, com circunferência cefálica 2 a 3 desvios-padrão abaixo do esperado para a idade gestacional e sexo, ou abaixo do terceiro percentil (75).

- Gastrosquise: defeito de fechamento da parede abdominal que envolve todas as suas camadas, para-umbilical, usualmente do lado direito, com extrusão de órgãos intra-abdominais. Pode envolver alças intestinais e fígado; ocasionalmente envolve estômago e outros órgãos (15).
- *Limb body wall*: anomalia de disrupção que consiste na falência de fechamento da parede abdominal anterior, cordão umbilical curto, escoliose, anormalidades faciais e craniais (16).
- Redução de membros: malformação congênita que envolve a ausência total ou parcial de um ou mais membros, com ou sem estruturas ósseas (18).

3.4.3. Variáveis de controle

- Idade: número de anos completos na data da inclusão na pesquisa
- Raça/cor: branca ou não branca, conforme visualizada pela pesquisadora
- Antecedente gestacional: número de gestações, partos e abortos espontâneos referidos pela mulher.
- Número de filhos vivos: quantos filhos vivos a mulher tem no momento da admissão no estudo
- Número de natimortos: quantos filhos nasceram mortos até o momento da admissão no estudo
- Antecedente de malformação fetal: quantos filhos apresentaram malformação fetal antes da gestação atual

3.5. Técnicas, testes e exames

3.5.1 Extração do DNA

Foram utilizados 50 µL de cada amostra de sangue fetal. O DNA genômico foi extraído e purificado utilizando o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corp., Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante para sangue total.

3.5.2 Análise dos polimorfismos do DNA – mutação C677T-MTHFR (76)

Após a extração do DNA genômico, amplificou-se a região do gene da MTHFR onde poderia ocorrer a mutação através da reação em cadeia da polimerase (RCP). O fragmento do gene da MTHFR foi amplificado numa mistura de 54mM Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 µM EDTA, 13.3 mM (NH₄)₂SO₄, 8% DMSO, 8 mM β-mercaptoetanol, 0.4 mg BSA/mL, 0.8 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada iniciador: sense (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCG GGA-3') e antisense (5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'), 500 ng do DNA genômico e 2 U da enzima Taq polimerase. A reação envolveu 30 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto), 55°C (1 minuto) e 72 °C (2 minutos). Um fragmento de 198 pares de base foi obtido e 10-15µL deste material amplificado foram digeridos com 0.5U da enzima Hinf I. Após a digestão o alelo mutante (alelo 677T) forneceu 2 fragmentos de 175 e 23 pares de base, observados num gel de agarose. Quando

o alelo normal (677C) estava presente, não havia o sítio de restrição para a enzima, e somente o fragmento de 198 pares de base foi observado.

3.5.3 Análise dos polimorfismos do DNA – fator V de Leiden (77)

codon para Arg506 está posicionado no exon 10 do gene do fator V. A determinação da mutação G para A envolveu a amplificação desta região, seguida pela digestão com a enzima MnlI. Após a extração do DNA genômico o exon 10 foi amplificado através da reação em cadeia pela polimerase (RCP), utilizando-se uma mistura de 54mM de tris-HCl, pH 8.8, 5.4mM MgCl₂ 5.4μM EDTA, 13.3mM (NH₄)₂SO₄, 10% DMSO, 8mM β-mercaptoetanol, 0.4mg/mL BSA, 0.8mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada iniciador (sense: 5'-CTTGAAGGAAATGCCCCATTA-3' e antisense: 5'-TGCCCAGTGCTTAACAAGACCA-3'), 500ng de DNA e 2 U de Taq polimerase. A reação envolveu 30 ciclos de incubação a 94⁰C (40''), 57⁰C (40'') and 72⁰C (2'). Um fragmento de 220 pares foi obtido e 5-10μL do material amplificado foi digerido com 0.5U da enzima Mnl I. Esta região do exon 10 continha 2 sítios de restrição nas posições 1637 e 1694. Após a digestão do gene normal (alelo 1691G), fragmentos de 116, 67 e 37 pares de base foram observados através de uma corrida em gel de agarose a 2%. Quando o alelo mutante estava presente (1691A), não ocorreu mais a clivagem na posição 1694, e observaram-se fragmentos de 153 e 67 pares de base.

3.5.4 Análise dos polimorfismos do DNA – mutação G2021A-FII (26)

Após a extração do DNA genômico o fragmento não transcrito da região 3'' do gene da protrombina foi amplificado pela RCP, numa mistura de 54 mM Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 µM EDTA, 0.8 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 NG de cada iniciador: sense (5'-TCTAGAAACAGTTGCCTGGC-3') e antisense (5'-ATAGCACTGGGAGCATT GAAGC-3'), 500 ng do DNA genômico e 2 U da enzima Taq polimerase. A reação envolveu 35 ciclos de incubação a 94°C (1 minuto), 58°C (1 minuto) e 72°C (1 minuto) e resultou na obtenção de um fragmento de 345 pares de base. 10 a 15µL do material amplificado foram digeridos com 2.5 U da enzima Hid III, fornecendo um fragmento de 322 pares de base, na presença do alelo mutante (G20210A). Quando o alelo normal (20210G) estava presente o sítio de restrição foi ausente e o fragmento de 345 pares de base permaneceu intacto.

3.5.5 Interpretação dos resultados

Fator V de Leiden: foi considerado presente ou ausente. Quando presente foi classificado em heterozigoto ou homozigoto.

Mutação G20210A no gene da protrombina: foi considerada presente ou ausente. Quando presente, foi classificado em heterozigota ou homozigota.

Mutação C677T no gene da MTHFR: foi considerada presente ou ausente. Quando presente, foi classificado em heterozigota ou homozigota.

3.5.6 Instrumentos para coleta de dados

Para a coleta de dados foi criada uma ficha categorizada (Ficha de Coleta de Dados - Anexo 1) que, após sua utilização, teve o campo de identificação dos sujeitos destruído.

3.5.7 Coleta de dados

Foram selecionadas para o estudo 100 duplas mãe-feto que preenchiam os critérios de inclusão e exclusão para o Grupo Casos, no Ambulatório de Medicina Fetal do CAISM-UNICAMP. Quando concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 2) e forneceram as informações para preenchimento da Ficha de Coleta de Dados (Anexo 1). No dia da cordocentese para realização do cariótipo fetal, feita rotineiramente no serviço, 50 µL foram retirados da amostra e enviados para o Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia/UNICAMP para pesquisa dos polimorfismos estudados. Em três dos casos não foi possível a realização dos exames por dificuldades técnicas, eles foram excluídos do estudo, restando então 97 pares mãe-feto no grupo Casos.

Para o Grupo Controles, foram selecionadas 100 mulheres que tiveram filhos sem malformações e doaram o sangue de cordão umbilical para o Banco de Sangue de Cordão do HEMOCENTRO-UNICAMP. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Genômica e Expressão do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia/UNICAMP para a pesquisa dos polimorfismos estudados. Os dados da Ficha de Coleta de Dados

foram coletados do prontuário médico destas mulheres e complementados por entrevista telefônica, quando necessário. Todas as mulheres haviam autorizado a utilização do sangue doado para a realização de pesquisas éticas e sigilosas, e o modelo desta autorização pode ser visto no Anexo 3.

Depois de preenchido o questionário da Ficha de Coleta de Dados, os nomes das mulheres foram eliminados, persistindo nas fichas apenas o número do sujeito no trabalho, sem identificação do mesmo. Os dados coletados foram digitados em uma planilha do programa Excel 2007 que foi completada posteriormente, com os dados laboratoriais obtidos com a pesquisa dos polimorfismos.

Após a obtenção dos resultados das mutações, finalizou-se o preenchimento da Ficha de Coleta de Dados, e foi realizada a análise estatística dos dados.

3.5.8 Processamento e análise dos dados

Concluída a digitação de todos os dados por dois revisores, a saber, o pesquisador e o estatístico, em planilha do programa Excel 2007 para Windows (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, EUA), os dados foram descritos através de média, desvio-padrão e mediana, e através de frequências absolutas (n) e relativas (%).

Foi realizada a análise descritiva por grupo e a avaliação do comportamento das variáveis, quanto à associação entre cada uma delas e o grupo, utilizando Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. A análise univariada foi utilizada para comparar cada uma das variáveis por grupo e identificar aquelas que poderiam ser discriminatórias para a variável resposta de interesse (ter malformação),

utilizando o teste de Wilcoxon para amostras independentes. Elas foram avaliadas quanto à correlação entre elas, e a análise de regressão logística foi feita para avaliar as chances de associação entre as variáveis estudadas e as malformações fetais.

Foram utilizados um nível de significância 5% e o software: SAS versão 9.1.3 para as análises. O poder foi de pelo menos 80% para as medidas na comparação entre os grupos.

3.5.9. Aspectos éticos

Foram seguidas as orientações propostas pela Declaração de Helsinque e suas revisões (WMA Declaration of Helsinki, 2008), assim como as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (78).

As informações foram obtidas apenas pelo propósito da pesquisa.

As gestantes do grupo casos somente foram admitidas após ter-lhes sido lido e explicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelo pesquisador no dia de sua consulta de rotina, terem recebido uma cópia do termo, terem-no compreendido e assinado.

As pacientes do grupo controle haviam autorizado previamente a utilização do sangue de cordão para pesquisas éticas e sigilosas.

Foi explicado que não haveria benefícios pessoais com a participação na pesquisa, e que os resultados encontrados, provavelmente, não trariam nenhum benefício imediato para a população.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 18 de dezembro de 2007, sob o parecer número 1.003/2007 (Anexo 4).

4. PUBLICAÇÕES

4.1. Artigo 1

Central nervous system malformations and the presence of the mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene in fetal blood in a Brazilian population

Artigo 2

Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms in Brazilian fetuses with gastroschisis

ARTIGO 1

4.1. Artigo 1

The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine - Manuscript ID DJMF-2012-0726

journalm@umkc.edu

Para: EGLE CRISTINA COUTO <egle.couto@uol.com.br>

20-Sep-2012

Dear Dr COUTO:

Your manuscript entitled "Central nervous system malformations and the presence of the mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase gene in fetal blood in a Brazilian population" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.

Your manuscript ID is DJMF-2012-0726.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/djmf> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/djmf>.

Thank you for submitting your manuscript to The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine .

Sincerely,

The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine Editorial Office

Central nervous system malformations and the presence of the mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene in fetal blood in a Brazilian population

Simoni RZ¹, Couto E¹, Barini R¹, Heinrich-Moçoçuah J², Bragança WO³, Luzo ACM⁴, Annichino Bizzachi JM⁴

1. Department of Gynecology and Obstetrics, University of Campinas, SP, Brazil
2. Specialized Procedures Laboratory, Department of Gynecology and Obstetrics
University of Campinas, SP, Brazil
3. Genomic and Expression Laboratory, Institute of Biology, University of
Campinas, SP, Brazil
4. Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, SP, Brazil

Corresponding author:

Egle Couto

Rua Alexander Flemming 101 Cidade Universitária – Campinas, SP

CEP 13083-881

Phone number: +55-19-3521 9304

Fax number: +55-19-3521 9477

egle.couto@uol.com.br

Short title: CNS malformation and MTHFR-C677T mutation

Key-words: Thrombophilia. Hydrocephalus. Anencephaly. Fetal thrombosis. Spina bifida.

Abstract

Objective: To evaluate the association between fetal central nervous system (CNS) malformations and the C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in fetal blood.

Methods: A case-control study was performed to compare the mutation C677T-MTHFR between 78 fetuses with CNS malformations and 100 normal fetuses. Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol. The polymerase chain reaction (PCR) was used to assay the thermolabile C677T-MTHFR. Statistical analysis was realized using Chi-square and Fisher's Exact Test, Wilcoxon test and logistic regression.

Results: Cases and Controls were similar when concerning to maternal characteristics as age, deliveries and abortions. Twenty (25.6%) cases and 6 controls had the heterozygous C677T-MTHFR (OR 10.309 95% CI 3.344-32.258) and 6 (7.7%) cases and one control presented the homozygous form (OR 12.346 95% CI 1.388-111.111).

Conclusion: The mutation C677T-MTHFR in fetal blood was associated with fetal CNS malformations, both in heterozygous and homozygous form.

Introduction

Congenital malformations occur in 3-5% of live births, and central nervous system (CNS) defects are the second most common type of malformations, after heart ones (Sekhobo et al, 2001).

CNS thrombosis is found in 1.35 per 100,000 live births and it has been associated with CNS malformations (Gunther et al., 2000).

The enzyme methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) participates in folate metabolism. For this reason and for the well-described association between folic acid deficiency and neural tube defects (NTD) (Heseker, 2011; Taruscio et al., 2011), the enzyme was exhaustively studied in this kind of malformation (Mornet et al., 1997; Dávalos et al., 2000; Isotalo, Wells, Dinnelly, 2000; Volcik et al., 2000; Martinez de Villarreal et al., 2001; Harisha et al., 2010). The enzyme MTHFR is a key component in folate metabolism. A C→T substitution at nucleotide 677 induces the generation of a thermolabile enzyme with reduced activity (Eskes, 1998). This deficiency in activity can lead to reduced plasmatic folate, vitamin B12 and methionine, and elevated homocysteine.

Some investigators have suggested the association between the mutation C677T-MTHFR and NTD (Dávalos et al, 2000; Martinez de Villarreal et al, 2001), but other studies did not confirm it (Boduroglu et al., 1999; Volcik et al., 2000). The implications of inherited thrombophilia in fetal anatomic development are unknown. We studied the mutation C677T-MTHFR in affected and normal fetuses, in order to evaluate a possible association between this mutation and fetal CNS malformations.

Methods

A case-control study included 78 fetuses with hydrocephalus, porencephaly, hydranencephaly, anencephaly, spina bifida, encephalocele and microcephaly (cases), and 100 normal fetuses (controls). All the cases were recruited from Fetal Medicine Outpatient Clinics of Campinas University between 2005 and 2010, and underwent a routine cordocentesis. All of them had normal karyotype results. 50 µL of cord blood were used to perform DNA extraction and test for the mutation C677T-MTHFR.

The controls blood was obtained from the Cord Blood Bank of Campinas University, comprising 100 normal fetuses. Exclusion criteria for controls were history of three or more subsequent miscarriages, fetal death, thromboembolism, gestational hypertension and fetal malformations. Data were obtained from mother's medical records and supplemented by telephone interviews, if necessary. Cord blood donors had previously signed an Informed Consent for the blood to be used in ethical research.

For cases group, data regarding women's age, parity and history of fetal malformation were collected by direct interview during cordocentesis procedure. All women were informed about the objectives and methodology of the study, read and signed the Informed Consent.

The Committee of Ethics in Research from CAISM-Campinas University approved this study on December 18th 2007 under the protocol 1.003/2007.

DNA extraction and analysis of C677T-MTHFR

Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol for whole blood.

The polymerase chain reaction (PCR) was used to assay the thermolabile MTHFR C677T mutation. Amplifications Were Performed in separate 50 ml reactions containing 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each nucleoside triphosphate, 0.4 mM each of forward and reverse primer and 2.5U of Taq polymerase. The PCR parameters Were 38 cycles of 94°C (30 seconds), 54°C (30 seconds) and 72°C (30 seconds). The initial cycle was Preceded by 9 minutes at 94°C, so as to activate AmpliTaq Gold polymerase in addition to denaturing the template, and the last cycle was Followed by 5 minutes at 72°C. The PCR products were digested with the appropriate restriction enzyme. After digestion, PCR products were submitted to electrophoresis on 2% agar minigels containing ethidium bromide at 120 V for 1 hour. For MTHFR, HynfI did not cleave the 198-bp PCR product of the normal allele, whereas the mutant allele yielded fragments of 175 bp and 23 bp after HinfI digestion. For each locus, heterozygous individuals exhibited both normal and mutant digestion products. The PCR assay controls included DNA from a subject with subject, normal subject and a blank water run for each analysis.

After extracting genomic DNA, the region where the MTHFR gene mutation can occur is amplified through CPR. The fragment of the MTHFR gene is amplified in a mixture of 54mm Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 mM EDTA, 13.3 mM (NH₄)₂SO₄, 8% DMSO, 8 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mg BSA / ml 0.8 mM each nucleoside triphosphate, 400 ng of each primer: sense (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3') and antisense (AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 5'-3'), 500 ng of genomic DNA and 2U Taq polymerase enzyme. The reaction involves 30 cycles of incubation at 94 ° C (1 minute), 55°C (1 minute) and 72°C (2 minutes). A fragment of 198 base pairs is obtained and 10-15µl of this amplified material is digested with 0.5U of enzyme Hinf I.

After digestion, the mutant allele (allele 677T) provides two fragments of 175 and 23 base pairs observed in agarose gel. When the normal allele (677C) is present, there is not the restriction site for the enzyme, and only the fragment of 198 bp is observed.

Statistical Analysis

The descriptive analysis of the variables was performed using Chi-square or Fisher's Exact Test. Univariate analysis compared each variable by group and identified discriminatory ones for fetal malformations, using Wilcoxon test for independent samples, and logistic regression was realized at a 5% significance level. The software SAS version 9.1.3 was used for the analysis and the power of the test was at least 80% for comparison between groups.

Results

Both groups were similar in mother's race, history of miscarriage and number of deliveries. The number of living children was lower in mothers from cases group, but we have to remember that having at least one living child was an inclusion criterion for the control group (Table 1). In cases group, 23% of the women had a history of fetal death, and this history was an exclusion criterion for the control group.

The distribution of C677T-MTHFR by type of fetal CNS malformation can be seen in Table 2. Table 3 shows a comparison of the C677T-MTHFR between both groups. The mutation was detected in 26 cases and in 7 controls. A statistically significant difference was detected between groups, both for heterozygous and homozygous form.

The results of multivariate analysis can be seen in Table 4. The CT and TT genotypes presented a significant association with fetal CNS malformations (OR 10.309 CI 3.344-32.258 and OR 12.346 CI 1.388-111.11, respectively).

Discussion

The etiology of CNS malformations, especially NTD, is multifactorial and involves genetic and environmental factors and their complex interactions (Harisha et al, 2010). Several studies have shown that the thermolabile variant of MTHFR has low activity and is associated with increased plasmatic homocysteine levels, which can be corrected by folate supplementation (Kang et al, 1988; Nelen et al, 1998). Folate stabilizes the labile enzyme (Frosst et al, 1995; Rozen, 1997) and neutralizes the effects of the mutation at 15.4 nM plasmatic level or higher (Jacques et al, 1996). The C677T-MTHFR mutation occurs at the exon 4 of the nucleotide 677, where thymine replaces cytosine (C → T), resulting in the substitution of alanine for valine at the folate-binding site (Frosst et al, 1995). The activity of the mutated enzyme decreases to 35% of normal (Harisha et al, 2010).

Another common genetic polymorphism in MTHFR is an A → C transition at nucleotide 1298, that results in the substitution of alanine by glutamate. This mutation does not seem to elevate plasmatic homocysteine levels, neither in homozygous nor in heterozygous form. The combination of both heterozygous mutations (C677T and A1298C), however, may result in an important elevation in plasmatic homocysteine level (van der Put et al, 1998).

Several meta-analyzes confirmed the association between C677T-MTHFR mutation and clinical diseases as congenital heart defects (Yin et al., 2012), acute myocardial

infarction in Caucasians (Xuan et al., 2011), ischemic stroke in Caucasians (Yu, Zhang, Shi, 2011), cerebral venous thrombosis (Marjot et al., 2011) and stroke in infants and children (Kenet et al., 2010), Alzheimer's disease in Asians (Hua et al., 2011); venous thromboembolism (Gohil, Peck, Sharma, 2009) and peripheral arterial disease (Khandanpour et al., 2009), diabetic nephropathy (Zintzaras et al., 2007) and migraine with aura (Rubino et al., 2009).

All these diseases have a strong vascular component, and several of them accompanied by elevated plasmatic homocysteine. The exact mechanism by which the mutation and/or hyperhomocysteinemia act in the vasculature, leading to such impact, is unknown. We question whether these unclear mechanisms could act during embryo development and lead to CNS malformations, as NTD or other ones with vascular origin, like hydrocephalus and hydranencephaly.

NTD, recurrent abortion and fetal death have been associated with hyperhomocysteinemia (Wouters et al., 1993; Nelen et al., 1998). Van der Put et al. suggested, for the first time, that the mutation C677T-MTHFR could be a risk factor for NTD (1995). Some studies showed a high prevalence of this mutation in NTD children and in their mothers (Shields et al., 1999; Rampersaud et al., 2003), but others did not (González-Herrera et al., 2002).

It is still unclear whether periconceptional folate supplementation can overcome the imbalance between homocysteine and the presence of the mutation in the mother or in the developing embryo. Van der Put et al. showed that the mutated genotype in the mother and in the embryo contributed to NTD development. In their study in German population, the mutation in the mother conferred greater risk than the mutation in the fetus (van der Put et al., 1996). However, a meta-analysis compared the prevalence of

C677T-MTHFR among international groups of patients, their mothers and controls, and detected a slightly higher risk for NTD when the mutation was present in the children than in their mothers (van der Put, Eskes, Blom, 1997).

The authors of a study with the Irish population (Shields et al., 1999) concluded that the TT genotype in the embryo was consistent with higher risk of NTD than the maternal altered genotype. Harisha et al. (2010) showed similar results: the frequency of homozygous C677T-MTHFR was significantly higher in children with NTD than in controls, whereas the difference between their mothers and controls was not significant.

The suggestion that a homozygous mutation in the embryo and in the mother could act synergistically has not been proved: some researchers showed higher risk when the combination was present (van der Put et al., 1996), but others did not (Shields et al., 1999).

Our results showed a significantly higher prevalence of C677T-MTHFR in fetuses with CNS malformations when compared with normal fetuses. Future studies could evaluate other mutations in the MTHFR gene, mutations in other components of folate and homocysteine metabolism, and NTD not preventable with folate. They represent approximately 30% of NTD and have been associated with disturbances of vitamin B12, methionine and inositol metabolism.

The evaluation of the presence of the C677T-MTHFR mutation for couples whose children have CNS malformations can help to estimate the risk of fetal thrombophilia, according to genetic inheritance, facilitating genetic counseling. In the same way, carriers of this mutation who wish to have children can be more consistently advised with the results of this study and future ones.

Declaration of Interest

The authors report no declarations of interest.

References

1. Sekhobo JP, Druschel CM. **An evaluation of Congenital malformations surveillance in New York State: an application of Centers for Disease Control and Prevention (CDC) guidelines for evaluating surveillance systems.** *Publ Health Rep* 2001;116(4):296-305.
2. Gunther G, Junker R, Strater R, Schobess R, Kurnik K, Kosch A. **Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates: role of acquired and genetic prothrombin risk factor.** *Stroke* 2000;31:2437-41.
3. Hesecker H. **Folic acid and other potential measures in the prevention of neural tube defects.** *Ann Nutr Metab* 2011;59(1):41-5.
4. Taruscio D, Carbone P, Granata O, Baldi F, Mantovani A. **Folic acid and primary prevention of birth defects.** *Biofactors* 2011;37(4):280-4.
5. Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B, Serre JL. **Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects.** *Hum Genet* 1997;100(5-6):512-4.
6. Dávalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Sandoval L, Morán MC, Gallegos MP, Chakraborty R, Rivas F. **The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations.** *Ann Genet* 2000;43(2):89-92.

7. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. **Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations.** Am J Hum Genet 2000;67:986-90.
8. Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, Jong ST, Rott EJ, Page TZ, Romaine NK, Northrup H. **Methylenetetrahydrofolate Reductase and Spina Bifida: Evaluation of Level of Defect and Maternal Genotypic Risk in Hispanics.** American Journal of Medical Genetics 2000;95:21–27.
9. Martínez de Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Valdéz-Leal R, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Limón-Benavides C, Sánchez-Peña MA, Ancer-Rodríguez J, Barrera-Saldaña HA, Villarreal-Pérez JZ. **Folate levels and N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study.** Arch Med Res 2001;32(4):277-82.
10. Harisha PM, Devi I, Christopher R, Kruthika-Vinod TP. **Impact of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects.** J Neurosurg Periatrics 2010;6:030640-300607.
11. Eskes TK. **Neural tube defects, vitamins and homocysteine.** Eur J Pediatr 1998;157:S139-41.
12. Boduroglu K, Alikasifoglu M, Anar B, Tunçbilek E. **Association of the 677C-T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkish patients with neural tube defects.** J Child Neurol 1999;14(3):159-61.

13. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. **Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase.** Am J Hum Genet 1988;43(4):414-21.
14. Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Eskes TK. **Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages.** J Nutr 1998;128(8):1336-41.
15. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. **A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase.** Nat Genet 1995;M10(1):111-3.
16. Rozen R. **Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).** Thromb Haemost 1997;78(1):523-6.
17. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. **Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations.** Circulation. 1996;93(1):7-9.
18. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. **A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?** Am J Hum Genet 1998;62(5):1044-51.

19. Yin M, Dong L, Zheng J, Zhang H, Liu J, Xu Z. **Meta analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects.** Ann Hum Genet 2012;76(1):9-16.
20. Xuan C, Bai XY, Gao G, Yang Q, He GW. **Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and risk of myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls.** Arch Med Res 2011;42(8):677-85.
21. Yu HH, Zhang WL, Shi JP. **Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and susceptibility of ischemic stroke: a meta-analysis.** Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2011;91(29):2060-4.
22. Marjot T, Yadav S, Hasan N, Bentley P, Sharma P. **Genes associated with adult cerebral venous thrombosis.** Stroke 2011;42(4):913-8.
23. Kenet G, Lütkehoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, et al. **Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies.** Circulation. 2010;121(16):1838-47.
24. Hua Y, Zhao H, Kong Y, Ye M. **Association between the MTHFR gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis.** Int J Neurosci 2011;121(8):462-71.
25. Gohil R, Peck G, Sharma P. **The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls.** Thromb Haemost 2009;102(2):360-70.

26. Khandanpour N, Willis G, Meyer FJ, Armon MP, Loke YK, Wright AJ, Finglas PM, Jennings BA. **Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis.** J Vasc Surg 2009;49(3):711-8.
27. Zintzaras E, Uhlig K, Koukoulis GN, Papathanasiou AA, Stefanidis I. **Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis.** J Hum Genet 2007;52(11):881-90.
28. Rubino E, Ferrero M, Rainero I, Binello E, Vaula G, Pinessi L. **Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with migraine: a meta-analysis.** Cephalalgia 2009;29(8):818-25.
29. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. **Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss.** Fertil Steril 1993;60(5):820-5.
30. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. **Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida.** Lancet 1995; 346(8982):1070-1.
31. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. **The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother.** Am J Hum Genet 1999;64(4):1045-55.

32. Rampersaud E, Melvin EC, Siegel D, Mehlretter L, Dickerson ME, George TM, Enterline D, Nye JS, Speer MC; NTD Collaborative Group. **Updated investigations of the role of methylenetetrahydrofolate reductase in human neural tube defects.** Clin Genet 2003;63(3):210-4.
33. González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Ceballos-Quintal J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, Del Angel RM, Orozco-Orozco L. **Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico.** Clin Genet 2002;62(5):394-8.
34. van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RP, Trijbels FJ, Eskes TK, Mariman EC, den Heyer M, Blom HJ. **Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C-->T mutation in families with spina bifida offspring.** J Mol Med (Berl) 1996;74(11):691-4.
35. van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ. **Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis.** QJM 1997;111:5.

Table 1. Median values, range and p-value resulting from the comparison between groups for sample characterization

Variable	Cases	Controls	p-value
Age	29 (18-43)	29 (16-43)	0.8683
Number of pregnancies	2 (1-10)	2 (2-4)	0.5072
Number of deliveries	1 (1-8)	2 (1-5)	0.2408
Number of abortions	0 (0-1)	0 (0-1)	0.0677
Number of living children	1 (0-8)	2 (1-4)	0.0003*
(n)	78	100	

* Wilcoxon test for independent samples

Table 2. Distribution of C677T-MTHFR by type of CNS malformation

MTHFR C677T*	1**	2**	3**	4**	5**	6**	7**
CC	32	11	4	1	1	2	1
CT	12	5	2	-	-	1	-
TT	3	1	-	-	-	1	1
(n)	47	17	6	1	1	4	2

* CC = wild CT = heterozygous TT = homozygous

** 1 – hydrocephalus 2 – anencephaly 3 – encephalocele 4 – porencephaly

5 – hydranencephaly 6 – spina bífida 7 - microcephaly

Table 3. Results of analyzes of fetal polymorphisms in Cases and Controls

MTHFR C677T*	Cases n (%)	Controls n = %	p-value
CC	52 (66.7)	93	< 0.0001
CT	20 (25.6)	6	
TT	6 (7.7)	1	
(n)	78 (100)	100	

* CC = wild CT = heterozygous TT = homozygous

Table 4. Risk of CNS malformations according to the result of the C677T-MTHFR mutation in fetal blood

MTHFR-C677T*	OR	95% CI	p-value
CC x CT	10.309	3.344-32.258	<0.0001
CC x TT	12.346	1.388-111.11	<0.0001

* CC = wild CT = heterozygous TT = homozygous

ARTIGO 2

4.2. Artigo 2

Fetal Diagnosis and Therapy **Ms. No. 201210001**

Dear Dr. Couto,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'MTHFR polymorphisms in Brazilian fetuses with gastroschisis' to Fetal Diagnosis and Therapy.

It will now be forwarded to the Editor-in-Chief, Prof. Eduard Gratacós, and we shall inform you as soon as possible of the decision reached by the editorial board. The manuscript reference number is 201210001. Please use this number on all correspondence about the manuscript, which should be sent to the Fetal Diagnosis and Therapy editorial office at the address listed below.

For information regarding the status of your manuscript and for future submissions to Fetal Diagnosis and Therapy, you can access this online system by going to the journal's homepage as follows:

<http://www.karger.com/fdt>

Logon Name: egle.couto@uol.com.br

Password: paju2112

With kind regards,

Patricia Bachmann
Editorial Office 'Fetal Diagnosis and Therapy'
t +41 61 306 1359
fdt@karger.ch

S. Karger AG, Medical and Scientific Publishers, Allschwilerstrasse 10, 4009 Basel, Switzerland t +41 61 306 1111, f +41 306 1234, www.karger.com

MTHFR polymorphisms in Brazilian fetuses with gastroschisis

Zaccaria R¹, Couto E¹, Francelin C², Barini R¹, ¹ Department of Gynecology and Obstetrics, University of Campinas, SP, Brazil, ² Biology Institute, University of Campinas, SP, Brazil

This research was conducted at the Department of Gynecology and Obstetrics, University of Campinas, SP, Brazil

Running head: MTHFR polymorphisms and gastroschisis in Brazil

For correspondence:

Egle Couto

Rua Alexander Flemming 101 - Cidade Universitária – Campinas – SP – Brazil

CEP 13083-881 Phone number +55-19-35219304 Fax number +551935219477

email: egle.couto@uol.com.br

Key-words: gastroschisis, fetal malformation, genetic disorder, abdominal wall defects, C677T-MTHFR, thrombophilia.

MTHFR polymorphisms in Brazilian fetuses with gastroschisis

Abstract

Objective: To evaluate the association between fetal gastroschisis and the C677T mutation in the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in fetal blood.

Methods: A case-control study was performed to compare the mutation C677T-MTHFR between 14 fetuses with gastroschisis and 100 normal fetuses. Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol. The polymerase chain reaction (PCR) was used to assay the thermolabile C677T-MTHFR. Descriptive analysis was realized using Chi-square, Fisher's Exact Test and Wilcoxon test.

Results: Cases and Controls were similar when concerning to maternal characteristics as age, race and number living children and previous abortions. Three (21.4%) cases and 6 controls had the heterozygous C677T-MTHFR and no case and one control presented the homozygous form. These differences were not significant. Allele distribution also showed no significant differences between groups.

Conclusion: There was no association between the presence of the mutation C677T-MTHFR in fetal blood and gastroschisis in this study.

Introduction

Gastroschisis is a congenital disease, which involves the extrusion of fetal bowels by a lateral defect, usually at the right side of the abdominal wall [1,2,3]. It occurs in 1 to 3 per 10,000 live births [1] and is responsible for approximately 12% of neonatal mortality in affected fetuses [4]. The incidence of gastroschisis is increasing in developed countries [5]; it is common in white young women and rare in black [6]. Children from European young mothers have a seven times higher prevalence of gastroschisis than those from mothers between 25 and 29 years old [7], but this difference can not be seen in black mothers [6,8,9].

Beyond the strong effect of maternal age on the incidence of gastroschisis, a negative correlation with maternal weight was described [10]. Women with high body mass index (BMI) had lower incidence of gastroschisis in their children than those with normal or low BMI.

The cause of this malformation is multifactorial, and several hypotheses were suggested, as the occlusion and rupture of omphalomesenteric artery leading to the rupture of the umbilical ring and herniation of abdominal contents. An asymmetric blood supply at the umbilical ring could origin a vulnerable area to vascular rupture [11]. This same mechanism was suggested for other malformations as optic hypoplasia, hydranencephaly and schizencephaly [12,13,14,15,16,17,18].

Gastroschisis appears with high frequency in children from cocaine abusers mothers. Cocaine is a potent vasoconstrictor [19], as does pseudoephedrine, and their effects could compromise the blood flow during fetal development and lead to malformations [20]. The observed pattern of risk of gastroschisis for young and old mothers who use

vasoactive drugs is intriguing. Despite the increased risk for gastroschisis and the high prevalence of smoking in young women, no effect of tobacco was noticed over the risk of fetal malformations for women less than 20 years old. For elder women, however, tobacco raised the risk from 1.3 for those between 20 and 24 years old to 4.3 for women more than 30 years old [3]. A similar effect was described in another study [21]. This effect is consistent with the hypothesis of vascular rupture. A continuous exposition to tobacco can contribute to vascular lesion at the uterus and lead to development of gastroschisis [3]. The association between this malformation and smoking, use of aspirin, cocaine and amphetamines supports the vascular theory [22,23].

Scientists discovered amniotic vacuoles of triglyceride rich in palmitic acid in fetuses with gastroschisis. It led to the hypothesis that thrombosis products could affect cellular signaling during early embryonic development, before the fusion of the abdominal wall [2].

Malnourishment, specially involving alpha-carotene and glutathione, has been demonstrated in mothers of fetuses with gastroschisis [24]. A poor diet [1] could be responsible for the high incidence of this malformation in fetuses from adolescent mothers [25]. Gastroschisis probably needs the interaction of genetic and intra-uterine factors to occur. Fetuses with genetic predisposition to thromboembolism can be affected intra-uterus by a deficient intake of folate and vitamin B6, and their supplementation supposedly reduces plasmatic homocysteine [1]. Elevations in plasmatic homocysteine are associated with coronary disease [26], and the mutation C677T in the methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene is a major cause of inherited hyperhomocysteinemia [27]. This mutation is common in patients with myocardial infarction, vascular peripheral disease and stroke [26]. Could fetuses carriers

of the mutation C677T-MTHFR accumulate homocysteine in an unfavorable environment and develop gastroschisis, fitting the vascular theory [1]?

Based on this question, we compared the presence of the mutation C677T-MTHFR between fetuses with gastroschisis and normal ones.

Methods

A case-control study included 14 fetuses with gastroschisis (cases), and 100 normal fetuses (controls). All the cases were recruited from Fetal Medicine Outpatient Clinics of Campinas University between 2005 and 2010, and underwent a routine cordocentesis. All of them had normal karyotype results. 50 µL of cord blood were used to perform DNA extraction and test for the mutation C677T-MTHFR.

The controls blood was obtained from the Cord Blood Bank of Campinas University, comprising 100 normal fetuses. Exclusion criteria for controls were history of three or more subsequent miscarriages, fetal death, thromboembolism, gestational hypertension and fetal malformations. Data were obtained from mother's medical records and supplemented by telephone interviews, if necessary. Cord blood donors had previously signed an Informed Consent for the blood to be used in ethical research.

For cases group, data regarding women's age, parity and history of fetal malformation were collected by direct interview during cordocentesis procedure. All women were informed about the objectives and methodology of the study, read and signed the Informed Consent.

The Committee of Ethics in Research from CAISM-Campinas University approved this study on December 18th 2007 under the protocol 1.003/2007.

DNA extraction and analysis of C677T-MTHFR

Genomic DNA was extracted and purified from fetal blood by means of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), according to manufacturer's protocol for whole blood.

The polymerase chain reaction (PCR) was used to assay the thermolabile MTHFR C677T mutation. Amplifications Were Performed in separate 50 µl reactions containing 10 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each nucleoside triphosphate, 0.4 mM each of forward and reverse primer and 2.5U of Taq polymerase. The PCR parameters Were 38 cycles of 94°C (30 seconds), 54°C (30 seconds) and 72°C (30 seconds). The initial cycle was Preceded by 9 minutes at 94°C, so as to activate AmpliTaq Gold polymerase in addition to denaturing the template, and the last cycle was Followed by 5 minutes at 72°C. The PCR products were digested with the appropriate restriction enzyme. After digestion, PCR products were submitted to electrophoresis on 2% agar minigels containing ethidium bromide at 120 V for 1 hour. For MTHFR, HynfI did not cleave the 198-bp PCR product of the normal allele, whereas the mutant allele yielded fragments of 175 bp and 23 bp after HinfI digestion. For each locus, heterozygous individuals exhibited both normal and mutant digestion products. The PCR assay controls included DNA from a subject with subject, normal subject and a blank water run for each analysis.

After extracting genomic DNA, the region where the MTHFR gene mutation can occur is amplified through CPR. The fragment of the MTHFR gene is amplified in a mixture of 54mM Tris-HCl, pH 8.8, 5.4 mM MgCl₂, 5.4 mM EDTA, 13.3 mM (NH₄)₂SO₄, 8% DMSO, 8 mM β-mercaptoethanol, 0.4 mg BSA / ml 0.8 mM each nucleoside triphosphate, 400 ng of each primer: sense (5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-

3') and antisense (AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 5'-3'), 500 ng of genomic DNA and 2U Taq polymerase enzyme. The reaction involves 30 cycles of incubation at 94 ° C (1 minute), 55°C (1 minute) and 72°C (2 minutes). A fragment of 198 base pairs is obtained and 10-15µl of this amplified material is digested with 0.5U of enzyme Hinf I. After digestion, the mutant allele (allele 677T) provides two fragments of 175 and 23 base pairs observed in agarose gel. When the normal allele (677C) is present, there is not the restriction site for the enzyme, and only the fragment of 198 bp is observed.

Statistical Analysis

The descriptive analysis of the variables was performed using Chi-square or Fisher's Exact Test. Univariate analysis compared each variable by group and identified discriminatory ones for fetal malformations, using Wilcoxon test for independent samples, at a 5% significance level. The software SAS version 9.1.3 was used for the analysis and the power of the test was at least 80% for comparison between groups.

Results

Both groups were similar in mother's race, age, history of miscarriage and number of living children (Table 1). Three women from cases group (21%) and eleven (11%) from control group were less than 21 years old ($p=0.5929$).

Table 2 shows the distribution of C677T-MTHFR by group. There were no significant differences between them ($p=0,0631$). The allele T was seen in 10.7% of fetuses with gastroschisis and in 4% of the controls, and the difference was not statistically significant ($p=0,2792$) (Table3).

Discussion

Our results showed no differences between fetuses with gastroschisis and fetuses without malformations, when concerning to the presence of the mutation C677T-MTHFR in fetal blood. The frequency of the T allele in cases and controls was similar. This study was based on the vascular hypothesis, which suggests that gastroschisis occurs in the beginning of embryo development, when there is a displacement of vascularization in the affected area [28] or interruption of blood flow in the vascular plexus, which forms right vitelline arteries [11]. Several environmental factors can adversely affect this process, such as anoxia, thrombosis, inflammation and a not correctable wound formation [29]

The first study to evaluate genetic polymorphisms in gastroschisis evolved 32 children, and the authors concluded that a multifactorial etiology for this malformation could combine genetic and environmental factors, such as smoking [29].

Gastroschisis has an uncommon epidemiology: its frequency is rising and it affects children from white mothers preferentially [30]. A negative correlation with maternal obesity was also described [10]. A three-part hypothesis was suggested to explain these results: (1) thrombus induction by estrogen in early pregnancy, with more elevated levels in young mothers with low body mass index (BMI); (2) different thrombotic responses between white and black women; (3) products of palmitic acid affecting cell signaling during early embryo development, before the fusion of the abdominal wall [2]. These products also explain the vacuoles rich in palmitic acid found in gastroschisis [31]. The hypothesis about micronutrient depletion proposes that consecutive pregnancies with small time interval between them may not allow enough maternal

nutrient reposition. Short inter-pregnancy intervals were associated with increasing risk for gastroschisis [32].

The small number of cases and lack of information about mother's nutritional condition and habits, which could influence vascular development during embryonic period, such as smoking and drug abuse, limited our study. We found no differences in race and age between mothers of fetuses with gastroschisis and normal ones.

Gastroschisis' origin seems to be heterogeneous. The differences related by several epidemiological studies about mother's age and a familial isolated form [33] suggest a specific vulnerability. Studies with larger number of cases, allowing mothers' stratification by age, risk factors and race before the evaluation of inherited fetal thrombophilia may help to clarify this question.

References

1. Cardonick E, Broth R, Kaufmann M, Seaton J, Henning D, Roberts N, Wapner R: **Genetic predispositions for thromboembolism as a possible etiology for gastroschisis.** Am J Obstet Gynecol 2005;193:426–8.
2. Lubinsky M: Hypothesis: **Estrogen related thrombosis explains the pathogenesis and epidemiology of gastroschisis.** Am J Med Genet A 2012;158A(4):808-11.
3. Werler M, Mitchell AA, Moore CA, Honein MA, the National Birth Defects and Prevention Study: **Is There Epidemiologic Evidence to Support Vascular Disruption as a Pathogenesis of Gastroschisis?** Am J Med Genet A 2009;149A(7): 1399–1406.
4. Reid KP, Dickinson JE, Doherty DA: **The epidemiologic incidence of congenital gastroschisis in Western Australia.** Am J Obstet Gynecol 2003;189:764-8.

5. Kazaura MR, Lie RT, Irgens LM, Didriksen A, Kapstad M, Egeaas J, Bjerkedal T: **Increasing risk of gastroschisis in Norway: an age-period-cohort analysis.** *Am J Epidemiol* 2004;159:358-63.
6. Benjamin BG, Ethen MK, Van Hook CL, Myers CA, Canfield MA: **Gastroschisis prevalence in Texas 1999–2003.** *Birth Defects Res A. Clin Mol Teratol* 2010;88:178–185.
7. Loane M, Dolk H, Bradbury I, a EUROCAT Working Group: **Increasing prevalence of gastroschisis in Europe 1980–2002: A phenomenon restricted to younger mothers?** *Paediatr Perinat Epidemiol* 2007;21:363–369.
8. Vu LT, Nobuhara KK, Laurent C, Shaw GM: **Increasing prevalence of gastroschisis: Population-based study in California.** *J Pediatr* 2008;152:807–811.
9. Chabra S, Gleason CA, Seidel K, Williams MA: **Rising prevalence of gastroschisis in Washington State.** *J Toxicol Environ Health A* 2011;74:336–345.
10. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J: **Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: A systematic review and meta-analysis.** *JAMA* 2009;301:636–650.
11. Hoyme HE, Higginbottom MC, Jones KL: **The vascular pathogenesis of gastroschisis: intrauterine interruption of the omphalomesenteric artery.** *J Pediatr.* 1981;98:228–231.
12. Lubinsky MS, Adkins W, Kaveggia EG: **Decreased maternal age and hydranencephaly.** *Am J Med Genet* 1997;69:232–234.
13. Lubinsky MS: Hypothesis: **Septo-optic dysplasia is a vascular disruption sequence.** *Am J Med Genet* 1997;69:235–236.

14. Lubinsky MS: Association of prenatal vascular disruptions with decreased maternal age. *Am J Med Genet* 1997;69:237–239.
15. Curry CJ, Lammer EJ, Nelson V, Shaw GM: **Schizencephaly: Heterogeneous etiologies in a population of 4 million California births.** *Am J Med Genet Part A* 2005;137A:181–189.
16. Murray PG, Paterson WF, Donaldson MD: **Maternal age in patients with septo-optic dysplasia.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18:471–476.
17. Riedl S, Vosahlo J, Battelino T, Stirn-Kranjc B, Brugger PC, Prayer D, Mullner-Eidenbock A, Kapelari K, Blumel P, Waldhor T, Krasny J, Lebl J, Frisch H: **Refining clinical phenotypes in septo-optic dysplasia based on MRI findings.** *Eur J Pediatr* 2008;167:1269–1276.
18. Howe DT, Rankin J, Draper ES: **Schizencephaly prevalence, prenatal diagnosis and clues to aetiology; a register based study.** *Ultrasound. Obstet Gynecol* 2012;39(1):75-82.
19. Hume RF, Gingras JL, Martin LS, Hertzberg BS, O'Donnell K, Killam AP: **Ultrasound diagnosis of fetal anomalies associated with in utero cocaine exposure.** *Fetal Diag Ther* 1994;9:239-45.
20. Werler MM, Mitchell AA, Shapiro S: **First trimester maternal medication use in relation to gastroschisis.** *Teratology* 1992;45:361–367.
21. Feldkamp ML, Alder SC, Carey JC: **A case control population-based study investigating smoking as a risk factor for gastroschisis in Utah, 1997-2005.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82:768–775.

22. Torfs CP, Katz EA, Bateson TF, Lam PK, Curry CJR: **Maternal medications and environmental exposures as risk factors for gastroschisis.** *Teratology* 1996;54:84–92.
23. Werler MM, Sheehan JE, Mitchell AA: **Association of vasoconstrictive exposures with risks of gastroschisis and small intestinal atresia.** *Epidemiology* 2003;14:349–354.
24. Torfs C, Lam PK, Schaffer DM, Brand RJ: **Association between mothers' nutrient intake and their offsprings' risk of gastroschisis.** *Teratology* 1998;58:241-50.
25. Nichols CR, Dickenson JE, Pemberdon PJ: **Rising incidence of gastroschisis in teenage pregnancies.** *J Matern Fetal Med* 1997;6:225-9.
26. De Stefano VD, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood*. 1996;87(9):3531-44.
27. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost*. 1996;76(5):651-62.
28. deVries PA: **The pathogenesis of gastroschisis and omphalocele.** *J Pediatr Surg* 1980;15(3):245-51.
29. Torfs CP, Christianson RE, Iovannisci DM, Shaw GM, Lammer EJ: **Selected gene polymorphisms and their interaction with maternal smoking, as risk factors for gastroschisis.** *Birth Defects Res A*. *Clin Mol Teratol* 2006;76:723–730.
30. Benjamin BG, Ethen MK, Van Hook CL, Myers CA, Canfield MA: **Gastroschisis prevalence in Texas 1999-2003.** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010;88(3):178-85.

31. Jones KL, Benirschke K, Chambers CD: **Gastroschisis: etiology and developmental pathogenesis.** Clin Genet 2009;75(4):322-5.
32. Getz KD, Anderka MT, Werler MM, Case AP. **Short interpregnancy interval and gastroschisis risk in the national birth defects prevention study.** Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2012;94(9):714-20.
33. Kohl M, Wiesel A, Schier F: **Familial recurrence of gastroschisis: literature review and data from the population-based birth registry "Mainz Model".** J Pediatr Surg 2010;45(9):1907-12.

Table 1 - Demographic and obstetric history of the studied mothers

Variable	Cases n (%)	Controls	p-value
Mean age (years)	26 (18-39)	29 (16-43)	0.3686
White	6 (42.8)	58	0.2849
First pregnancy	5 (35.7)	39	0.8130
One spontaneous abortion	0	7	0.5944
(n)	14	100	

Table 2. Results of fetal polymorphisms for cases and controls

C677T-MTHFR*	Cases n (%)	Controls n = %	p-value
CC	11 (78.6)	93	0.0631
CT	3 (21.4)	6	
TT	0	1	
(n)	14 (100)	100	
* CC = wild CT = heterozygous TT = homozygous			

Table 3. Allele distribution between cases and controls

Allele	Cases n (%)	Controls n (%)	p-value
T	3 (10.7)	8 (4)	0.279
C	25 (89.3)	192 (96)	
(n)	28	200	

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para avaliar o papel de fatores herdados de trombofilia (Fator V de Leiden, mutações G20210A-FII e C677T-MTHFR) em malformações fetais de origem vascular.

Apenas nas malformações de SNC foi encontrada associação com um dos fatores de trombofilia estudados, a mutação C677T-MTHFR, tanto em sua forma homozigota TT (OR 12.346) quanto heterozigota CT (OR 10.309). O Fator V de Leiden e a mutação G20210A-FII não foram detectados nos casos e controles estudados.

Várias malformações fetais foram descritas na literatura como de possível origem vascular, como aquelas de SNC (34, 57, 59), de parede abdominal (45), redução de membros (50, 54) e *limb body wall* (16).

A etiologia das malformações do SNC é multifatorial e envolve componentes genéticos e ambientais, e suas interações complexas (59). Vários estudos demonstraram que a variante termolábil da MTHFR tem baixa atividade e induz o aumento da homocisteína plasmática, o que pode ser corrigido com a suplementação de folato (79, 80), o qual estabiliza a enzima termolábil (81, 82).

Com base em dados publicados anteriormente, pode-se afirmar que aproximadamente 59% da população europeia e 53% da população da América do Norte apresentam os genótipos CT ou TT (128). No Brasil, a presença do alelo T foi demonstrada em 37% da população branca de São Paulo (60), em 23% da população

miscigenada de São Paulo (28), em 28% da população do Pará (61) e em 39,7% das mulheres férteis de Campinas, SP (129). Esta alta prevalência também foi descrita em vários países da Europa e América no Norte (Quadro 1).

A maioria dos estudos sobre a mutação C677T-MTHFR e malformações de SNC e outras avaliou o risco associado à homozigose. Ela é a causa herdada mais comum de hiperhomocistemia moderada, e foi associada a maior risco de doença cardiovascular e acidente vascular cerebral em jovens (130).

A possibilidade de que a heterozigose para a mutação da MTHFR também pudesse aumentar tais riscos não foi reconhecida por muito tempo, exceto por um pequeno estudo, no qual a associação entre a mutação CT e algumas doenças foi atribuída à alta proporção de homozigotos selvagens (CC) nos controles (131).

A contribuição da C677T-MTHFR na diátese protrombótica foi contestada por Bertina (132), que questionou se os ensaios de DNA para esta enzima deveriam fazer parte da investigação para trombofilia. Kirke et al. (133) afirmaram que a heterozigose, presente em 38% da população, aumentou o risco para defeitos de tubo neural.

Os genótipos CT (heterozigoto) e TT (homozigoto) respondem por 26% dos defeitos de tubo neural na Irlanda. Aproximadamente metade desses defeitos relacionados ao metabolismo de folato pode ser explicada por estas variantes genéticas (133). Um outro polimorfismo comum na MTHFR é uma transição A → C no nucleotídeo 1298, que resulta na substituição de alanina por glutamato. Esta mutação não parece elevar os níveis plasmáticos de homocisteína, mas a combinação das duas formas heterozigotas (C677T e A1298C) pode induzir hiperhomocistemia (83).

Tais achados têm duas implicações importantes. Primeiro, a C677T-MTHFR heterozigota precisa ser também considerada fator de risco para situações em que a homozigose foi associada a risco aumentado, como a doença coronariana isquêmica (134). Segundo, a população sob risco e a população que se beneficiará da fortificação alimentar com ácido fólico é muito maior do que se acreditava previamente.

Ainda não está claro o quando a suplementação de folato periconcepcional pode superar o desequilíbrio decorrente da hiperhomocisteinemia na presença da mutação C677T-MTHFR na mãe ou no embrião em desenvolvimento. Van der Put et al. avaliaram a presença da mutação na mãe e no embrião, e viram que ambas contribuíram para o surgimento de DTN, mas a mutação na mãe conferiu maior risco do que no embrião (98). Entretanto, em uma metanálise em que a prevalência da mutação C677T-MTHFR foi comparada entre vários grupos de pacientes, suas mães e controles, foi detectado um risco discretamente maior para DTN quando a mutação estava presente nas crianças, quando comparadas com suas mães (99).

Os autores de um estudo com a população irlandesa (95) concluíram que o genótipo TT no embrião conferiu maior risco de DTN do que o genótipo materno alterado. Harisha et al. (59) mostraram resultados similares: a frequência da mutação C677T-MTHFR homozigota foi significativamente mais alta em crianças com DTN do que em controles, enquanto as diferenças entre suas mães e controles não foram significativas. A sugestão de que a mutação homozigota no embrião e na mãe poderiam agir de forma sinérgica não foi comprovada: alguns pesquisadores mostraram maior risco na presença desta combinação (98), enquanto outros não (95).

Nossos resultados mostraram uma prevalência significativamente mais alta da mutação C677T-MTHFR em fetos com malformações de SNC, quando comparados com fetos sem malformação.

Em nosso estudo, assim como em outros citados previamente, a associação entre a presença do alelo mutante T no gene da enzima MTHFR e as malformações de SNC fetal foi demonstrada de forma bastante clara. Altas prevalências nas populações avaliadas significam possibilidade de transmissão genética dos pais para os fetos, e maior chance de malformação fetal.

Tanto o folato baixo quanto a homocisteína aumentada associados aos genótipos CT e TT podem ser corrigidos com o uso de ácido fólico, mesmo em pequenas doses. Nosso estudo fornece novos dados para realçar a importância de programas de saúde pública de suplementação de ácido fólico para todas as mulheres em idade fértil. Estudos futuros poderiam avaliar outras mutações no gene da MTHFR, além de mutações em outros componentes do metabolismo do folato e da homocisteína, de DTN não preveníveis com folato, que representam aproximadamente 30% do total de DTN.

A avaliação da presença da mutação C677T-MTHFR em casais que tiveram filhos com malformações de possível origem vascular poderia ajudar a estimar o risco de trombofilia fetal de acordo com a transmissão genética, facilitando o aconselhamento para uma futura gestação. Da mesma forma, portadores da mutação que desejam ter filhos poderão ser aconselhados de forma mais consistente de acordo com os resultados deste estudo e de estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

- A presença da mutação C677T-MTHFR no sangue fetal mostrou associação com as malformações de SNC estudadas (hidrocefalia, anencefalia, hidranencefalia, porencefalia, encefalocele, microcefalia e espinha bífida), tanto na forma homozigota quanto heterozigota
- Não foi encontrada associação entre as mutações Fator V de Leiden, G20210A-FII e C677T-MTHFR e as outras malformações estudadas (gastrosquise, *limb body wall* e redução de membros fetais)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sekhobo JP, Druschel CM. An evaluation of congenital malformations surveillance in New York State: an application of Centers for Disease Control and Prevention (CDC) guidelines for evaluating surveillance systems. *Publ Health Rep.* 2001;116(4):296-305.
2. De Vigan C, Khoshnood B, Lhomme A, Vodovar V, Goujard J, Goffinet F. Prevalence and prenatal diagnosis of congenital malformations in the Parisian population: twenty years of surveillance by the Paris Registry of congenital malformations. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2005;34(1):8-16.
3. Gunther G, Junker R, Strater R, Schobess R, Kurnik K, Kosch A. Symptomatic ischemic stroke in full-term neonates: role of acquired and genetic prothrombin risk factor. *Stroke*. 2000;31(10):2437-41.
4. Girard NJ, Raybaud CA. Ventriculomegaly and pericerebral CSF collection in the fetus: early stage of benign external hydrocephalus? *Childs Nerv Syst*. 2001;17(4-5):239-45.
5. Girard NJ, Ozanne A, Gire C, Millet V, Mancini J, Raybaud C. Management of ventricular dilatation]. *Arch Pediatr*. 2001;8(2):436s-437s.
6. Gerard N. Fetal MR imaging. *Eur Radiol*. 2002;12(8):1869 -1871.
7. Williams H. The venous hypothesis of hydrocephalus. *Med Hypotheses*. 2008;70(4):743-7.

8. Febrasgo - Anencefalia: opinião Brasil [Internet]. Febrasgo, Brasil; 2008 December; Available from <http://www.febrasgo.org.br/anencefalia2.htm/>. Accessed in August 28th 2012.
9. Persaud TV. Abnormal development of the central nervous system. *Anat Anz.* 1981;150(1-2):44-62.
10. Dias MS, Partington M. Embryology of myelomeningocele and anencephaly. *Neurosurg Focus.* 2004;15;16(2):E1.
11. Sepulveda W, Wong AE, Fauchon DE. Fetal spinal anomalies in a first-trimester sonographic screening program for aneuploidy. *Prenat Diagn.* 2011;31(1):107-14.
12. Thompson DN. Postnatal management and outcome for neural tube defects including spina bifida and encephaloceles. *Prenat Diagn.* 2009;29(4):412-9.
13. McAbee GN, Chan A, Erde EL. Prolonged survival with hydranencephaly: report of two patients and literature review. *Pediatr Neurol.* 2000;23(1):80-4.
14. Weir E. Congenital abdominal wall defects. *CMAJ.* 2003;169(8):809-10.
15. Mortellaro VE, St Peter SD, Fike FB, Islam S. Review of the evidence on the closure of abdominal wall defects. *Pediatr Surg Int.* 2011;27(4):391-7.
16. Hunter AG, Seaver LH, Stevenson RE. Limb-body wall defect. Is there a defensible hypothesis and can it explain all the associated anomalies? *Am J Med Genet.* 2011;155A(9):2045-59.

17. Stevenson RE, May M, Arena JF, Millar EA, Scott CI Jr, Schoer RJ, Simensen RJ, Lubs HA, Schwartz, CE. Asrskog-Scott syndrome: confirmation of linkage to the pericentromeric region of the X chromosome. *Am J Med Genet.* 1994;52(3):339-45.
18. Hoyme HE, Higginbottom MC, Jones KL: The vascular pathogenesis of gastroschisis: intrauterine interruption of the omphalomesenteric artery. *J Pediatr.* 1981;98(2):228–231.
19. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyenkov V, Chandy M, Dahlback B, Ginter EK, Miletich JP, Rosendaal FR, Seligsohn U. Inherited thrombophilia: Part 1. *Thromb Haemost.* 1996;76(5):651-62.
20. Glueck CJ, Awadalla SG, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN. Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hypofibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos , and miscarriage. *Fertil Steril.* 2000;74(2):394-7.
21. Dahlback B. New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):139-48.
22. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369(6475):64-7.
23. De Stefano VD, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood.* 1996;87(9):3531-44.

24. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ 506) is common in a Brazilian population. *Am J Hematol.* 1995;49(3):242-3.
25. Koster T, Rosendaal FR, De Ronde H, Briet E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet.* 1993;342(8886-8887):1503-6:1203-6.
26. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88(10):3698-703.
27. Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillap A, Watzke JJ, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost.* 1998;79(4):706-8.
28. Arruda VR, Von Zuben PM, Chiaparini LC, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF. The mutation Ala677-Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 1997;77(5):818-21.
29. Nelen WLD, Blom HJ, Steegers EAP, Heijer MD, Thomas CMG, Eskes TKAB. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 2000;95(4):519-24.
30. Eskes TK. Neural tube defects, vitamins and homocysteine. *Eur J Pediatr.* 1998;157 Suppl 2:S139-41.

31. Dávalos IP, Olivares N, Castillo MT, Cantú JM, Ibarra B, Sandoval L, Morán MC, Gallegos MP, Chakraborty R, Rivas F. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Ann Genet.* 2000;43(2):89-92.
32. Martínez de Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Valdéz-Leal R, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, Limón-Benavides C, Sánchez-Peña MA, Ancer-Rodríguez J, Barrera-Saldaña HA, Villarreal-Pérez JZ. Folate levels and N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of spring with neural tube defects: a case-control study. *Arch Med Res.* 2001;32(4):277-82.
33. Boduroglu K, Alikasifoglu M, Anar B, Tunçbilek E. Association of the 677C-T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkish patients with neural tube defects. *J Child Neurol.* 1999;14(3):159-61.
34. Volcik KA, Blanton SH, Tyerman GH, Jong ST, Rott EJ, Page TZ, Romaine NK, Northrup H. Methylenetetrahydrofolate Reductase and Spina Bifida: Evaluation of Level of Defect and Maternal Genotypic Risk in Hispanics. *American Journal of Medical Genetics.* 2000;95(1):21-27.
35. Ansari SA, Hunter JV, Nassif LM, Clark GD, Ramocki MB. Bilateral in utero cerebellar infarction. *J Child Neurol.* 2011; 26(7):895-9.
36. Ergenekon E, Gücüyener K, Atalay Y, Serdaroğlu A, Tali T, Koç E, Türkyilmaz C. Neonatal cerebral venous thrombosis coexisting with bilateral adrenal hemorrhage. *Indian J Pediatr.* 2000;67(8):591-4.
37. Goez H, Zelnik N. Schizencephaly in infants with thrombophilia. *J Child Neurol.* 2009;24(4):421-4.

38. Riikonen RS, Kekomaki R. Resistance to activated protein C (APC) in childhood hydrocephalus. *Thromb Haemost.* 1998;79(5):1059-60.
39. Debus O, Koch HG, Kurlemann G, Straeter R, Vielhaber H, Weber P, Nowac-Gottl U. Factor V Leiden and genetic defects of thrombophilia in childhood porecephaly. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1998;78(2):F121-4.
40. Parma M, Belotti D, Marinoni S, Pogliani EM. Congenital absence of the inferior vena cava and genetic coagulation abnormalities: a rare associated risk fator for recurrent idiopathic deep vein thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2003;9(4):347-8.
41. Kamerath J, Morgan WE. Absent inferior vena cava resultinf in exercise-induced epidural venous plexus congestion and lower extremity numbness: a case report and review of the literature. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010;35(18):E921-4.
42. Garg K, Cayne N, Jacobowitz G. Mechanical and pharmacologic cateter-directed thrombolysis treatment of severe, sympomatic, bilateral deep vein thrombosis with congenital absence of the inferior vena cava. *J Vasc Surg.* 2011;53(6):1707-10.
43. Abrams JS. Experimental intestinal atresia. *Surgery.* 1968;64(1):185-91.
44. Johnson SM, Meyers RL. Inherited thrombophilia: a possible cause of in útero vascular thrombosis in children with intestinal atresia. *J Pediatr Surg.* 2011;36(8):1146-9.
45. Lubinsky M: Hypothesis: Estrogen related thrombosis explains the pathogenesis and epidemiology of gastroschisis. *Am J Med Genet A.* 2012;158A(4):808-11.
46. Lichy C, Reuner KH, Buggle F, Litfin F, Rickmann H, Kunze A, Brandt T, Grau A. Prothrombin G20210A mutation, but not FV Leiden, is a risk factor in patients with

- persistent foramen ovale and otherwise unexplained cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis.* 2003;16(1):83-7.
47. Karttunen V, Hiltunen L, Rasi V, Vahtera E, Hillbom M. Factor V Leiden and prothrombin gene mutation may predispose to paradoxical embolism in subjects with patent foramen ovale. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003;14(3):261-8.
48. Pezzini A, Del Zotto E, Magoni M, Costa A, Archetti S, Grassi M, Akkawi NM, Albertini A, Vognolo LA, Padovani A. Inherited thrombophilic disorders in young adults with ischemic stroke and patent foramen ovale. *Stroke.* 2003;34(1):28-33.
49. Pezzini A, Grassi M, Zotto ED, Giossi A, Volonghi I, Costa P, Grau A, Magoni M, Padovani A, Lichy C. Do common prothrombotic mutations influence the risk of cerebral ischaemia in patients with patent foramen ovale? Systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2009;101(5):813-7.
50. Genc G, Atay NE, Kepenekli E, Yarali N. May thrombosis be a cause of congenital extremity absence? *Indian J Pediatr* 2007;74(5):497-9.
51. McGuirk CK, Westgate MN, Holmes LB. Limb deficiencies in newborn infants. *Pediatrics.* 2001;108(4):64-76.
52. Bavinck JN, Weaver DD. Subclavian artery supply disruption sequence: Hypothesis of a vascular etiology for Poland, Klippel-Feil and Mobius anomalies. *Am J Med Genetics.* 1986;23(4):903-18.
53. Hoyme HE, Jones KL, Van Allen MI, Saunders BS, Benirschke K. Vascular pathogenesis of transverse limb reduction defects. *J Pediatr.* 1982;101(5):839-43.
54. Hunter AG. A pilot study of the possible role of familial defects in anticoagulation as a cause for terminal limb reduction malformations. *Clin Genet.* 2000;57(3):197-204.

55. Hesecker H. Folic acid and other potential measures in the prevention of neural tube defects. *Ann Nutr Metab.* 2011;59(1):41-5.
56. Taruscio D, Carbone P, Granata O, Baldi F, Mantovani A. Folic acid and primary prevention of birth defects. *Biofactors.* 2011;37(4):280-4.
57. Mornet E, Muller F, Lenvoise-Furet A, Delezoide AL, Col JY, Simon-Bouy B, Serre JL. Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects. *Hum Genet.* 1997;100(5-6):512-4.
58. Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000;67(4):986-90.
59. Harisha PM, Devi I, Christopher R, Kruthika-Vinod TP. Impact of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects. *J Neurosurg Pediatr.* 2010;6(4):364-7.
60. Franco RF, Araújo AG, Guerreiro JL, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C-T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost.* 1998;79(1):119-21.
61. Ribeiro EM. Polimorfismo do gene da metiltetrahydrofolato redutase (MTHFR) na população de Belém. 1999. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Pará, Belém, 1999.
62. Rady PL, Tying SK, Hudnall SD, Vargas T, Kellner LH, Nitowsky H, Matalon RK. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutation C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Med Genet.* 1999;86(4):380-84.

63. Stevenson RE, Schwartz CE, Du Yz, Adams MJ Jr. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet.* 1997;60(1):229-30.
64. Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH, Selhub J, Rozen R. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996;93(1):7-9.
65. Brulhart MC, Dussoix P, Ruiz J, Passa P, Froguel P, James RW. The (Ala-Val) mutation of methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a major risk of vascular disease in non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Hum Genet.* 1997;60(1):228-9.
66. De Franchis R, Sebastio G, Mandato C, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bífida, 677T-C mutation, and role of folate. *Lancet.* 1995;346(8991-8992):1703.
67. Adams M, Smith PD, Martin D, Thompson JR, Lodwick D, Samanj NJ. Genetic analysis of thermolabil methylenetetrahydrofolate reductase as risk for myocardial infarction. *Q J Med.* 1996;89(6):437-44.
68. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygard O, Schneede J, Vollset SE, Refsum H. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (equal to or greater than 40 micromole/liter): the Hordaland homocysteine study. *J Clin Invest.* 1996;98(9):2174-83.

69. van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet*. 1995; 346(8982):1070-1.
70. Pepe G, Camacho Vanegas OC, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, Rickards O, De Stefano GF, Prisco D, Gensini GF, Abbate R. Heterogeneity in world distribution of thermolabile C677T mutation in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*. 1998;63(3):917-20.
71. Gallagher PM, Meleady R, Shields DC, Tan KS, McMaster D, Rozen R, Evans A, Graham IM, Whitehead AS. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation*. 1996;94(2):2154-8.
72. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Thermolabile variant of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates; implications for folate intake recommendations. *Lancet*. 1997;349(9065):1591-3.
73. Corrêa ASM. Polimorfismo da metiltetrahidrofolato redutase (MTHFR) em três populações Afro-Brasileiras: Curiaú, Pontal e Pacoval. 2001. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Pará, Belém, 2001.
74. McAndrew PE, Brandt JT, Pearl DK, Prior TW. The incidence of the gene for thermolabile methylene tetrahydrofolate reductase in African Americans. *Thromb Res*. 1996;83(2):195-8.

75. Hill LM. Defeitos do sistema nervoso central e cranioespinhal. In: Rodeck CH, Whitle MJ, editores. *Medicina Fetal Fundamentos e Prática Clínica*. Rio de Janeiro: Revinter; 2005. p. 599-640.
76. Mandel H, Brenner B, Rosenberg N, Lanir N, Jakobs C, Fowler B, Seligsohn U. Coexistence of hereditary homocystinuria and factor V Leiden – effect on thrombosis. *N Engl J Med*. 1996;334(12):763-8.
77. Ridker PM, Miletich JP, Hennekens CH, Buring JE. Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women. Implications for thromboembolism screening. *JAMA*. 1997;277(16):1305-7.
78. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. *Inf. Epidemiol. do SUS* 1996; ano V nº 2.
79. Kang SS, Zhou J, Wong PW, Kowalisyn J, Strokosch G. Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*. 1988;43(4):414-21.
80. Nelen WL, Blom HJ, Thomas CM, Steegers EA, Boers GH, Eskes TK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. *J Nutr*. 1998;128(8):1336-41.
81. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995;M10(1):111-3.

82. Rozen R. Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost.* 1997;78(1):523-6.
83. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998;62(5):1044-51.
84. Yin M, Dong L, Zheng J, Zhang H, Liu J, Xu Z. Meta analysis of the association between MTHFR C677T polymorphism and the risk of congenital heart defects. *Ann Hum Genet.* 2012;76(1):9-16.
85. Xuan C, Bai XY, Gao G, Yang Q, He GW. Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and risk of myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls. *Arch Med Res.* 2011;42(8):677-85.
86. Yu HH, Zhang WL, Shi JP. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and susceptibility of ischemic stroke: a meta-analysis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011;91(29):2060-4.
87. Marjot T, Yadav S, Hasan N, Bentley P, Sharma P. Genes associated with adult cerebral venous thrombosis. *Stroke.* 2011;42(4):913-8.
88. Kenet G, Lütkehoff LK, Albisetti M, Bernard T, Bonduel M, Brandao L, et al. Impact of thrombophilia on risk of arterial ischemic stroke or cerebral sinovenous thrombosis in neonates and children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation.* 2010;121(16):1838-47.
89. Hua Y, Zhao H, Kong Y, Ye M. Association between the MTHFR gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Neurosci.* 2011;121(8):462-71.
90. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-

- analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):360-70.
91. Khandanpour N, Willis G, Meyer FJ, Armon MP, Loke YK, Wright AJ, Finglas PM, Jennings BA. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. *J Vasc Surg.* 2009;49(3):711-8.
92. Zintzaras E, Uhlig K, Koukoulis GN, Papathanasiou AA, Stefanidis I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism as a risk factor for diabetic nephropathy: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2007;52(11):881-90.
93. Rubino E, Ferrero M, Rainero I, Binello E, Vaula G, Pinessi L. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with migraine: a meta-analysis. *Cephalalgia.* 2009;29(8):818-25.
94. Wouters MG, Boers GH, Blom HJ, Trijbels FJ, Thomas CM, Borm GF, Steegers-Theunissen RP, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia: a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1993;60(5):820-5.
95. Shields DC, Kirke PN, Mills JL, Ramsbottom D, Molloy AM, Burke H, Weir DG, Scott JM, Whitehead AS. The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother. *Am J Hum Genet.* 1999;64(4):1045-55.
96. Rampersaud E, Melvin EC, Siegel D, Mehlretter L, Dickerson ME, George TM, Enterline D, Nye JS, Speer MC; NTD Collaborative Group. Updated investigations of the role of methylenetetrahydrofolate reductase in human neural tube defects. *Clin Genet.* 2003;63(3):210-4.

97. González-Herrera L, García-Escalante G, Castillo-Zapata I, Canto-Herrera J, Ceballos-Quintal J, Pinto-Escalante D, Díaz-Rubio F, Del Angel RM, Orozco-Orozco L. Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clin Genet*. 2002;62(5):394-8.
98. van der Put NM, van den Heuvel LP, Steegers-Theunissen RP, Trijbels FJ, Eskes TK, Mariman EC, den Heyer M, Blom HJ. Decreased methylene tetrahydrofolate reductase activity due to the 677C→T mutation in families with spina bifida offspring. *J Mol Med (Berl)*. 1996;74(11):691-4
99. van der Put NM, Eskes TK, Blom HJ. Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta-analysis. *QJM*. 1997;90(2):111-5.
100. Cardonick E, Broth R, Kaufmann M, Seaton J, Henning D, Roberts N, Wapner R: Genetic predispositions for thromboembolism as a possible etiology for gastroschisis. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;193(2):426–8.
101. Werler M, Mitchell AA, Moore CA, Honein MA, the National Birth Defects and Prevention Study: Is There Epidemiologic Evidence to Support Vascular Disruption as a Pathogenesis of Gastroschisis? *Am J Med Genet*. 2009;149A(7): 1399–1406.
102. Reid KP, Dickinson JE, Doherty DA: The epidemiologic incidence of congenital gastroschisis in Western Australia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189(3):764-8.
103. Kazaura MR, Lie RT, Irgens LM, Didriksen A, Kapstad M, Egeaas J, Bjerkedal T: Increasing risk of gastroschisis in Norway: an age-period-cohort analysis. *Am J Epidemiol*. 2004;159(4):358-63.

104. Benjamin BG, Ethen MK, Van Hook CL, Myers CA, Canfield MA: Gastroschisis prevalence in Texas 1999–2003. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(3):178–85.
105. Loane M, Dolk H, Bradbury I; EUROCAT Working Group: Increasing prevalence of gastroschisis in Europe 1980–2002: A phenomenon restricted to younger mothers? *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2007;21(4):363–9.
106. Vu LT, Nobuhara KK, Laurent C, Shaw GM: Increasing prevalence of gastroschisis: Population-based study in California. *J Pediatr.* 2008;152(6):807–811.
107. Chabra S, Gleason CA, Seidel K, Williams MA: Rising prevalence of gastroschisis in Washington State. *J Toxicol Environ Health.* 2011;74(5):336–345.
108. Stothard KJ, Tennant PW, Bell R, Rankin J: Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: A systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2009;301(6):636–650.
109. Lubinsky MS, Adkins W, Kaveggia EG: Decreased maternal age and hydranencephaly. *Am J Med Genet.* 1997;69(3):232–234.
110. Lubinsky MS: Hypothesis: Septo-optic dysplasia is a vascular disruption sequence. *Am J Med Genet.* 1997;69(3):235–236.
111. Lubinsky MS: Association of prenatal vascular disruptions with decreased maternal age. *Am J Med Genet.* 1997;69(3):237–239.
112. Curry CJ, Lammer EJ, Nelson V, Shaw GM: Schizencephaly: Heterogeneous etiologies in a population of 4 million California births. *Am J Med Genet Part A.* 2005;137(2):181–189.
113. Murray PG, Paterson WF, Donaldson MD: Maternal age in patients with septo-optic dysplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005;18(5):471–476.

114. Riedl S, Vosahlo J, Battelino T, Stirn-Kranjc B, Brugger PC, Prayer D, Mullner-Eidenbock A, Kapelari K, Blumel P, Waldhor T, Krasny J, Lebl J, Frisch H: Refining clinical phenotypes in septo-optic dysplasia based on MRI findings. *Eur J Pediatr.* 2008;167(11):1269–1276.
115. Howe DT, Rankin J, Draper ES: Schizencephaly prevalence, prenatal diagnosis and clues to aetiology; a register based study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012;39(1):75–82.
116. Hume RF, Gingras JL, Martin LS, Hertzberg BS, O'Donnell K, Killam AP: Ultrasound diagnosis of fetal anomalies associated with in utero cocaine exposure. *Fetal Diag Ther.* 1994;9(4):239–45.
117. Werler MM, Mitchell AA, Shapiro S: First trimester maternal medication use in relation to gastroschisis. *Teratology.* 1992;45(4):361–367.
118. Feldkamp ML, Alder SC, Carey JC: A case control population-based study investigating smoking as a risk factor for gastroschisis in Utah, 1997–2005. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2008;82(11):768–775.
119. Torfs CP, Katz EA, Bateson TF, Lam PK, Curry CJR: Maternal medications and environmental exposures as risk factors for gastroschisis. *Teratology.* 1996;54(2):84–92.
120. Werler MM, Sheehan JE, Mitchell AA: Association of vasoconstrictive exposures with risks of gastroschisis and small intestinal atresia. *Epidemiology.* 2003;14(3):349–354.
121. Torfs C, Lam PK, Schaffer DM, Brand RJ: Association between mothers' nutrient intake and their offsprings' risk of gastroschisis. *Teratology.* 1998;58(6):241–50.
122. Nichols CR, Dickinson JE, Pemberton PJ: Rising incidence of gastroschisis in teenage pregnancies. *J Matern Fetal Med.* 1997;6(4):225–9.

123. deVries PA: The pathogenesis of gastroschisis and omphalocele. *J Pediatr Surg.* 1980;15(3):245-51.
124. Torfs CP, Christianson RE, Iovannisci DM, Shaw GM, Lammer EJ: Selected gene polymorphisms and their interaction with maternal smoking, as risk factors for gastroschisis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2006;76(10):723–730.
125. Jones KL, Benirschke K, Chambers CD: Gastroschisis: etiology and developmental pathogenesis. *Clin Genet.* 2009;75(4):322-5.
126. Getz KD, Anderka MT, Werler MM, Case AP. Short interpregnancy interval and gastroschisis risk in the national birth defects prevention study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012;94(9):714-20.
127. Kohl M, Wiesel A, Schier F: Familial recurrence of gastroschisis: literature review and data from the population-based birth registry "Mainz Model". *J Pediatr Surg.* 2010;45(9):1907-12.
128. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):862-77.
129. Couto E, Barini R, Zaccaria R, Annichino-Bizzacchi JM, Passini Junior R, Pereira BG, Silva JC, Pinto e Silva JL. Association of anticardiolipin antibody and C677T in methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation in women with recurrent spontaneous abortion: a new path to thrombophilia? *Sao Paulo Med J.* 2005;123(1):15-20.
130. Cardo E, Monrós E, Colomé C, Artuch R, Campistol J, Pineda M, Vilaseca MA. Children with stroke: polymorphism of the MTHFR gene, mild hyperhomocysteinemia, and vitamin status. *J Child Neurol.* 2000;15(5):295-8.

131. Johanning GL, Tamura T, Johnston KE, Wenstrom KD. Comorbidity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms and risk for neural tube defects. *J Med Genet*. 2000;37(12):949-51.
132. Bertina RM. Genetic approach to thrombophilia. *Thromb Haemost*. 2001;86(1):92-103.
133. Kirke PN, Mills JL, Molloy AM, Brody LC, O'Leary VB, Daly L, Murray S, Conley M, Mayne PD, Smith O, Scott JM. Impact of the MTHFR C677T polymorphism on risk of neural tube defects: case-control study. *BMJ*. 2004;328(7455):1535-6.
134. Wald DS, Law M, Morris JL. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ*. 2002;325(7374):1202.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Ficha para coleta de dados

Polimorfismos genéticos fetais em malformações de origem vascular

Número do caso _____ Grupo _____

- 1) Qual é a sua idade hoje? _____
- 2) A senhora definiria a sua cor de pele em:
1-preta 2- parda 3-branca 4-amarela 5-indígena _____
- 3) Quantas vezes a senhora ficou grávida? _____
- 4) Quantos partos ou cesáreas a senhora teve? _____
- 5) A senhora já teve aborto? _____ Quantos? _____
- 6) Quantos filhos vivos a senhora tem? _____
- 7) A senhora teve filhos que nasceram mortos? _____ Quantos? _____
- 8) A senhora já teve algum filho malformado? _____
- 9) A senhora sabe qual malformação ele apresentava, ou apresenta? _____

Resultados de exames:

- | | | | |
|------------------------|------------------|--------------------|---------------|
| 1) Fator V de Leiden | _____ homozigoto | _____ heterozigoto | _____ ausente |
| 2) Mutação C677T-MTHFR | _____ homozigoto | _____ heterozigoto | _____ ausente |
| 3) Mutação G20210A | _____ homozigoto | _____ heterozigoto | _____ ausente |

.....

Nome: _____

HC: _____

Numero no estudo: _____

Telefone: _____

Anexo 2- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, morador
a da Rua: _____, número _____
bairro _____ CEP _____
cidade _____, _____ anos, telefone _____ aceito

colaborar nesse estudo realizado pela Dra. Renata Zaccaria Simoni sobre mal formação fetal e trombofilia hereditária de possível origem vascular, após explicação desse projeto realizado por ela mesma, com compromisso de manter meu nome em sigilo e que os resultados não permitirão minha identificação. Caso não queira participar, isso não prejudicará meu atendimento atual e futuro nesse hospital. A médica pesquisadora Dra Renata Zaccaria Simoni teêm o compromisso de me informar o resultado do exame realizado através de punção cordão umbilical intra-útero ou após nascimento antes do desprendimento da placenta por carta ou telefone. E também recebo um cartão com o nome da pesquisadora Dra. Renata Zaccaria Simoni, seu telefone e seu e-mail para contato que seja oportuno.

Minha participação nesse estudo não irá trazer nenhum benefício imediato, mas fui informada que posso não responder a qualquer pergunta e posso desistir durante entrevista.

Assinatura

Dra Renata Zaccaria Simoni

Campinas, _____ de _____ de 2007.

Dra Renata Zaccaria Simoni

Em caso de dúvidas favor ligar às sextas-feiras no período da tarde
19 35219336/ 35219304
ou por e-mail renataz@unicamp.br

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Banco de Sangue do Cordão do Hemocentro da Unicamp

Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP Hemocentro – Unicamp

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu,.....
..... Registro
Hospitalar:..... Data de
nascimento:...../...../....., Portadora dos documentos de
Identidade (RG): e
CPF:.....; Residente
à.....
.....
Bairro:.....Cidade.....
.....Estado

Concordo em colaborar com o Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hemocentro da UNICAMP. Para isso, autorizo a coleta após o nascimento de meu (minha) filho (a), do sangue do cordão umbilical e ou da placenta. Fui orientada que a coleta do sangue ocorre após o nascimento do bebê e poderá ser feita de duas formas: Durante o período de dequitação placentária, quando o bebê já foi para o berçário e o médico está aguardando a saída da placenta do organismo materno, a veia do cordão umbilical, que é uma continuação da placenta e se encontra do lado de fora do corpo da mãe, será puncionada, ou após a dequitação, quando a placenta estiver fora do organismo da mãe. Portanto, como você pode perceber, a coleta não irá interferir com o trabalho de parto de seu bebê e nem com a saúde dele. Este material seria jogado fora, como ocorre normalmente, mas será guardado em nitrogênio líquido, sendo usado para criar um Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical que pode ajudar pessoas com alguns tipos de doenças do sangue.

Estou ciente que mesmo tendo concordado com a doação, o sangue de cordão só será coletado se no parto eu não apresentar alteração clínica ou obstétrica que impeça a coleta, se o trabalho de parto se desenvolver normalmente sem risco para mim e ou para meu (minha) filho (a) e ocorrer em horário de coleta.

Sei também que tanto o sangue do cordão como a placenta serão examinados para ver se não apresentam infecção ou outra doença, sendo depois congelados. O sangue de cordão somente será utilizado se aparecer uma pessoa que apresente uma doença que possa se beneficiar desse sangue armazenado e que seja compatível. Atualmente, este material é utilizado para reconstituir tecido

hematopoiético (transplante de células progenitoras), podendo ser no futuro, utilizado em terapia gênica nas doenças hematológicas como talassemia, anemia falciforme dentre outras.

Fui informada que se coleta for maior ou igual à 50 ml, isto é, se o sangue do cordão for congelado, a equipe de enfermagem do BSCUP fará contato telefônico a partir de 60 dias após o parto para saber se foi realizado o teste do pezinho (PKU) e se está tudo bem comigo e com o bebê.

Estou ciente que se a quantidade de sangue de cordão coletado for menor que 50ml, este não será armazenado para o banco de sangue de cordão e poderá ser utilizado em pesquisas relacionadas a células tronco em andamento na instituição, que tenham sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FCM/Unicamp. As pesquisas que atualmente utilizam sangue de cordão são: *“Células beta pancreáticas diferenciadas de células mesenquimais de tecido adiposo e sangue de cordão umbilical, na presença de conofilina e betacelulina: Maior produção de insulina? Alternativa terapêutica para o Diabetes Mellitus?”*; *“Avaliação da capacidade das células neuronais originárias de células mesenquimais provenientes de tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical humanos na regeneração do nervo óptico de coelhos”*; *“Avaliação da capacidade de diferenciação de células tronco mesenquimais, obtidas de tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical humanos, na diferenciação para células de ducto biliar”*, *“Avaliação da capacidade de células mesenquimais obtidas de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo humanos na diferenciação para hepatócitos”*, *“Investigação funcional e caracterização do envolvimento de novos genes alvo na hematopoese normal utilizando células CD34+ de cordão umbilical”*. As amostras armazenadas para pesquisa serão desprezadas após o término destas.

Tenho ciência que serão coletados aproximadamente 40ml do meu sangue após o parto, para realização de sorologia para as seguintes doenças: sífilis, SIDA, hepatite B e C, HTLV 1 e 2, doença de Chagas, citomegalovírus, toxoplasmose e tipagem HLA. Estes exames são necessários para melhor identificar o meu sangue. Caso alguma doença seja encontrada, serei comunicada pela equipe do BSCUP e receberei encaminhamento para tratamento médico dentro do complexo hospitalar HC, CAISM, Hospital Estadual de Sumaré e Hemocentro da UNICAMP.

Será respeitado o sigilo e confidencialidade dos resultados dos exames que irei fazer, não sendo revelada minha identidade a não ser para a equipe médica responsável pelo atendimento. Esse respeito ao sigilo, será mantido no caso da utilização do sangue do cordão para transplante, em caso de publicação dos resultados sobre o banco de sangue de cordão ou se for utilizado para pesquisa.

Autorizo a consulta do meu prontuário médico e do meu (minha) filho (a) pela equipe médica do BSCUP e do Serviço de Transplante solicitante, se houver necessidade da obtenção do histórico e ou dados clínicos no momento do

transplante onde a bolsa coletada for utilizada. O BSCUP fica autorizado a transferir a unidade coletada, assim como todos os dados a ela relacionados para os Centros de Registro e/ou Serviços de Transplante solicitantes.

Autorizo também, o descarte da bolsa se o período de validade vencer ou se algum exame detectar algo que impeça sua utilização.

Estou ciente que minha doação é livre e voluntária, podendo desistir da doação a qualquer momento, inclusive na hora do parto, não havendo qualquer prejuízo para o meu atendimento nos hospitais da UNICAMP, se eu não quiser participar. Não receberei nenhuma remuneração, compensação material ou financeira ou privilégio pela doação da unidade de SCUP.

Uma vez realizada a doação, estou ciente que se porventura alguém de minha família necessitar deste material, ele já poderá ter sido utilizado para outra pessoa.

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas pelos telefones ou endereços abaixo.

Assinatura da doadora:

.....

..... Aplicador do Termo de

Consentimento:..... Responsável pelo serviço:

..... Testemunhas:

1.....

2.....

Campinas,...../...../.....

Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – Hemocentro - Unicamp

Rua Vital Brasil, 251 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas – SP Fone: (19) 3521-7003

Comitê de Ética em Pesquisa – FCM - Unicamp

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária "Zeferino Vaz" - Campinas - SP Fone: (19) 3521-8936

Comissão de Ética do CAISM: 3521-7910

MATERNIDADE DE CAMPINAS: 3306-6036/3306-6161

HOSPITAL ESTADUAL DE SUMARÉ: 3883-8900 ramal 1145

Ambulatório de Pré-natal do CAISM: 3521-8535

Anexo 4. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM – UNICAMP

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 29/01/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1.003/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0740.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ASSOCIAÇÃO ENTRE TROMBOFILIA HEREDITÁRIA E MALFORMAÇÕES FETAIS DE ORIGEM VASCULAR”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Zaccaria

INSTITUIÇÃO: Ambulatório de Pré-Natal Especializado - Medicina Fetal/CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/12/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/12/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a associação entre trombofilia hereditária fetal e malformações fetais de origem vascular.

III - SUMÁRIO

Em um estudo caso-controle, as mutações fator V de Leiden, G20210A no gene da protrombina e a mutação C677T no gene da enzima metileno tetraidrofolato redutase serão avaliadas em dois grupos de pacientes. O primeiro grupo será composto por 100 fetos de mulheres atendidas no Ambulatório de Pré-Natal Especializado – Medicina Fetal do CAISM-UNICAMP, que apresentam malformações de origem vascular, ou seja, defeitos da parede abdominal, defeitos do tubo neural, porencefalia, hidranencefalia, microcefalia e redução de membros, submetidos a cordocentese para realização de cariótipo, como rotina de atendimento, entre dezembro de 2007 e novembro de 2008 e /ou coleta de sangue de cordão umbilical fetal antes da dequitação. O DNA do sangue fetal destas punções será utilizado para a pesquisa das trombofilias hereditárias. O segundo grupo será composto por 100 recém-nascidos cujo parto tenha ocorrido no CAISM-UNICAMP entre outubro de 2007 e março de 2008, que não apresentem malformações. Será colhido sangue de cordão umbilical imediatamente após nascimento antes da dequitação, que será utilizado para a pesquisa das trombofilias. As pacientes dos dois grupos serão pareadas por idade e raça. A análise estatística será feita através do cálculo de Odds ratio e por Regressão Logística.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto encontra-se adequado à Resolução CNS/MS 196/96 e complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de dezembro de 2007.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 5. Resultados da avaliação das outras malformações

Foram incluídos no estudo 100 fetos com malformações (hidrocefalia, porencefalia, hidranencefalia, anencefalia, espinha bífida, encefalocele, microcefalia, gastrosquise, limb body wall e redução de membros) e 100 fetos sem malformações. Em três dos fetos com malformações não foi possível obter os resultados das mutações estudadas (Fator V de Leiden, mutação G20210A-FII e C677T-MTHFR), e eles foram excluídos do estudo. Restaram, portanto, 97 fetos no grupo com malformações de 100 fetos no grupo controle. Em nenhum dos fetos estudados, tanto para o grupo de malformações quanto para o grupo controle, foram encontradas as mutações fator V de Leiden e G20210A-FII.

A distribuição das malformações estudadas pode ser vista na Tabela 1, assim como o resultado da mutação C677T-MTHFR para aquelas malformações que não foram descritas nos artigos enviados para publicação e apresentados previamente neste trabalho.

Tabela 1. Resultado da mutação C677T-MTHFR nas outras malformações estudadas

Tipo de malformação	Número no estudo	C677T-MTHFR
Limb body wall	9	Não mutante (CC)
Redução de membros	12	Não mutante (CC)
Limb body wall	41	Não mutante (CC)
Redução de membros	61	Homozigota (TT)
Redução de membros	99	Não mutante