

Daniela Prudente Teixeira Nunes

Polimorfismo *G22A* do gene *ADA* e
abortamento espontâneo recorrente:
ausência de associação

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de São José do Rio Preto
para obtenção do Título de Mestre no
Curso de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, Eixo Temático: Medicina e
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto
2010

DANIELA PRUDENTE TEIXEIRA NUNES

**Polimorfismo G22A do gene ADA e
abortamento espontâneo recorrente:
ausência de associação**

BANCA EXAMINADORA

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

2º Examinador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

3º Examinador: Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

Suplentes: Profa. Dra. Nilce Barril

Profa. Dra. Vânia Belintani Piatto

São José do Rio Preto, 16 / 12 / 2010.

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1. Introdução.....	01
1.1 Abortamento espontâneo recorrente.....	01
1.2 Adenosina deaminase.....	07
1.3 Objetivos.....	15
2. Casuística e Método.....	16
2.1 Aspectos éticos.....	16
2.2 Casuística.....	16
2.2.1 Coleta de amostras de sangue.....	17
2.3 Métodos.....	17
2.3.1 Extração de DNA genômico.....	17
2.3.2 Avaliação da qualidade do DNA genômico.....	17
2.3.3 Identificação dos alelos <i>ADA*01</i> e <i>ADA*02</i> do gene <i>ADA</i>	18
2.3.4 Análise estatística.....	21

3. Artigo: Alelo ADA*02 do gene ADA (20q13.11) e abortamento espontâneo recorrente: ausência de associação.....	22
4. Conclusão.....	38
5. Referências Bibliográficas.....	39
Anexo.....	56
Anexo 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	56
Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	57
Anexo 3 - Formulário de Dados Clínicos.....	60
Anexo 4 - Resumo apresentado em forma de pôster durante o XII ECIF – Encontro Científico da FAMERP & VI CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e 1ª Mostra das Ligas Acadêmicas da FAMERP. São José do Rio Preto, SP, 2009.....	61
Anexo 5 - Resumo de Projeto apresentado em forma de pôster durante o XII ECIF – Encontro Científico da FAMERP & VI CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e 1ª Mostra das Ligas Acadêmicas da FAMERP. São José do Rio Preto, SP, 2009.....	62
Anexo 6 - Resumo apresentado em forma de pôster durante o X Workshop de Genética e IX Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Distrito de Rubião Júnior, SP, 2010.....	63
Anexo 7 - Resumo apresentado e premiado em 1º LUGAR na apresentação em forma de pôster durante a IV Jornada de Ginecologia e Obstetrícia da SOGESP – Região Noroeste / Sudoeste, Centro de Convenções UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2010.....	65

Anexo 8 - Resumo apresentado em forma de pôster durante o VII CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e 2ª Mostra das Ligas Acadêmicas da FAMERP. São José do Rio Preto, SP, 2010.....	67
--	-----------

“Dedico este trabalho aos meus pais,
Ramon Lombardi Teixeira Nunes e
Myriam Daniele Prudente Teixeira Nunes.”

Agradecimentos

À Diretoria geral da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e seus Coordenadores: Prof. Dr. Domingo Marcolino Braile e Prof. Dr. Reinaldo Azoubel. À FAMERP, pelo apoio e suporte financeiro, especialmente ao Departamento de Biologia Molecular.

À Fundação Faculdade Regional de Medicina – Hospital de Base, pela parceria e apoio. Aos funcionários, residentes e médicos do Ambulatório de Gestação de Alto Risco do HB.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMERP pela grande parceira, especialmente   Dra. Lígia Spegiorin, Dr. Antonio Helio Oliani e Dra. Denise Oliani, que colaboraram com o projeto, com o acesso   casuística e pelos ensinamentos transmitidos, meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, pela orienta o e oportunidade de desenvolvimento deste trabalho, pela paciência, dedica o, carinho, e compreensão; pelos ensinamentos para a carreira e para a vida e pela confiança depositada.

Ao Ministério da Educa o, Coordena o de Aperfei amento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;

Aos médicos e funcionários do Instituto de Medicina Reprodutiva e Fetal de São José do Rio Preto, por todo o apoio, sempre muito atenciosos e respeitosos.

Às funcionárias do Laboratório de Imunogenética Molecular do Hemocentro de São José do Rio Preto, que foram fundamentais, especialmente à MSc. Juliana Rodrigues Cintra e Denise Haddad, obrigada pela disponibilidade, ensinamentos e apoio!

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Biologia Molecular da FAMERP, pelo apoio e solidariedade.

À Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos e aos colegas do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE / UNESP, pelo respeito e carinho com que sempre nos recebeu e pelo apoio técnico nas PCRs. Especialmente à Ana Carolina Bonini Domingos, que foi uma “professora”, e vai ser sempre uma grande amiga que está guardada no meu coração;

Aos docentes e discentes do Curso de Pós-Graduação, pela experiência, pelo convívio e pela amizade;

Aos colegas do Laboratório de Virologia; Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular, especialmente à Greice e Michele, e da Upgen, Anelise,

Amanda, Gustavo e a todos os outros que direta ou indiretamente contribuíram com apoio, amizade e carinho.

À Profa. Dra. Nilce Barril, que me ensinou os primeiros passos na Graduação, com muito carinho sempre confiou em mim e me apoiou e se tornou um grande exemplo. Também pela sua participação na Banca do meu Exame Geral de Qualificação do Mestrado, juntamente com a Dra Vânia Belintani Piatto, pela disponibilidade e considerações, que enriqueceram este trabalho. À Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza e Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira, membros da Banca da Defesa da Dissertação de Mestrado, que contribuíram de maneira dedicada e inteligente com a finalização deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por todos os esclarecimentos e suporte.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética da FAMERP: Fabiana Nakashima, que me deu exemplos e apoio, que me ajudou a entender melhor a mim e à vida, que me apoiou nos melhores e também nos piores momentos. Ana Iara Costa Ferreira, pelos ensinamentos e paciência, por ter tido tanta boa vontade em todos os momentos em que precisei. À Cássia Rúbia Bernardo, pelas reflexões, apoio e cuidados. Ao Márcio Roberto Rodrigues, pelos géis, pelas piadas, pelas risadas, pelos cafés! Ao Edson Pavan, pelas discussões e amizade. Ao Maurício Cândido, pelos detalhes técnicos. Obrigada pela amizade, carinho, compreensão e apoio de todos vocês! Vocês são especiais.

À Cinara de Cássia Brandão de Mattos pelo auxílio na realização deste trabalho, pelos conselhos e ensinamentos;

Aos meus pais, Ramon Lombardi Teixeira Nunes e Myriam Daniele Prudente Teixeira Nunes, pelo incentivo aos estudos e por tudo o que sempre fizeram por mim. E não tem como retribuir tudo isso. São meu grande exemplo e meus grandes amores. À minha irmã Débora Prudente Teixeira Nunes, que sempre me deu muito apoio e conforto, além de ser uma grande amiga. Aos meus tios, Lúcio Lombardi Teixeira Nunes e Josane Cavalari, por sempre terem me incentivado e acreditado em mim. Vocês são especiais, obrigada pela família maravilhosa! A todos aqueles que moram longe, mas também estão no meu coração, Vovó Ione, tios, tias, primos e anexos. Saudades da Vovó Maria Thereza Lombardi Teixeira Nunes, Vovô William Teixeira Nunes e Oswaldo Leite Prudente, onde quer que estejam, obrigada pelos momentos que passamos juntos.

Enfim, agradeço especialmente e de coração a todas as gestantes que participaram deste projeto, que sem elas não seria possível. Parabéns a todas aquelas que deram o dom da vida aos seus bebezinhos e também para aquelas que tentaram com tanta convicção e amor que nunca se comparará a nada nesse mundo. Meus sinceros agradecimentos.

Enfim, a todos que acreditaram e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“Pais e filhos, somente companheiros.

Nem guias, nem professores, muito menos proprietários...

*Pais e filhos, o maior e mais belo encontro da vida, cúmplices no aprender a
desvendar os mistérios de cada um.”*

(Roberto Shinyashiki)

Lista de Figuras

Figura 1. Frequência das etiologias dos abortamentos espontâneos recorrentes.....	4
Figura 2. Papel da ADA no metabolismo da adenosina.....	8
Figura 3. Papel da ADA no metabolismo da deoxiadenosina.....	9
Figura 4. Consequências da deficiência de ADA em humanos.....	11
Figura 5. Perfil eletroforético de oito amostras de DNA genômico avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2%. M indica o marcador de 100 pb e 01 a 08 as amostras de DNA genômico.....	18
Figura 6. Perfil eletroforético de seis amostras de produto de PCR avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2%. M indica o marcador de 100 pb e 01 a 06 fragmentos de 397 pb do gene <i>ADA</i>	20
Figura 7. Perfil eletroforético do fragmento de 397 pb do exon 1 do gene <i>ADA</i> após digestão com a enzima <i>TaqI</i> evidenciando os genótipos <i>ADA</i> *01;*01 (01), <i>ADA</i> *01;*02 (02) e <i>ADA</i> *02;*02 (03); e Marcador (M) de 100 pares de bases.....	20

Figura do Manuscrito

- Figura 1.** Perfil eletroforético do fragmento de 397 pares de bases (pb) do exon 1 do gene *ADA* após digestão com a enzima *TaqI* evidenciando os genótipos *ADA*01;*01* (01), *ADA*01;*02* (02) e *ADA*02;*02* (03); e Marcador (M) de 100 pares de bases..... 35

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fatores etiológicos mais frequentemente associados aos AERs e suas especificações.....	6
---	---

Tabelas do Manuscrito

Tabela 1. Características demográficas e frequências dos genótipos <i>ADA</i> , Odds Ratio, intervalo de confiança e valor p calculados para os grupos G1 e G2.....	36
Tabela 2. Características demográficas das mulheres com dois ou mais abortamentos espontâneos de acordo com os genótipos <i>ADA*01;*01</i> e <i>ADA*01;*02</i>	37

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μL	Microlitro
A1	Receptor de adenosina A1
A2	Receptor de adenosina A2
A3	Receptor de adenosina A3
A4	Receptor de adenosina A4
ECA	Enzima conversora de Angiotensina (<i>Angiotensin Conversion Enzyme</i>)
ACP1	Polimorfismo da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular
ADA	Enzima Adenosina Deaminase
<i>ADA</i>	Gene da Adenosina Deaminase
ADA1	Adenosina deaminase 1
ADA2	Adenosina deaminase 2
ADAcP	Adenosina deaminase complexo de proteínas
ADGF	Fator de crescimento com atividade Adenosina Deaminase (<i>ADA-related Growth Factors</i>)
ADP	Adenosina difosfato
AER	Abortamento espontâneo recorrente
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BHYS	Betaina – homocisteína
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

dADP	Deoxiadenosina difosfato
dAMP	Deoxiadenosina monofosfato
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
HLA-G	Antígenos Leucocitários Humanos (<i>Human Leucocyte Antigen</i>) Classe I, G
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IMP	Inosina monofosfato
Kb	Kilobases
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
mg/mL	Miligramas por mililitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimol

MTHFR	Metilenotetraidrofolato redutase
NK	Natural Killer
PAI-1	Inibidor da Ativação do Plasminogênio – 1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
pb	Pares de bases
PCR-RFLP	Reação em cadeia da Polimerase - Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (<i>Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
pM	Picomolar
SAAF	Síndrome de anticorpos antifosfolípidos
SAH	S - adenosil - homocisteína
SCID	Síndrome da Imunodeficiência Combinada Grave (<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>)
TBE	Tris (Tris hidroximetil aminometano), Ácido Bórico e EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
TFN	Fator de necrose tumoral
T _H 1	Linfócitos T helper 1
T _H 2	Linfócitos T helper 2
U	Unidade

Resumo

Polimorfismo G22A do gene ADA e abortamento espontâneo recorrente: ausência de associação

Introdução: A adenosina deaminase (ADA), uma enzima codificada pelo gene *ADA* (20q13.11), atua no metabolismo da adenosina e modula a resposta imune. O polimorfismo G22A deste gene origina os alelos co-dominantes *ADA*01* e *ADA*02* e influencia o nível de expressão da enzima ADA, que possui papel fundamental na manutenção da gestação. O alelo *ADA*02* tem sido associado a um efeito protetor contra o abortamento espontâneo recorrente (AER) em mulheres caucasianas européias. **Objetivo:** Investigar se o polimorfismo G22A do gene *ADA* se associa à ocorrência de AER em brasileiras. **Métodos:** Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parecer CEP FAMERP 308/2008), 311 mulheres foram selecionadas para compor dois grupos: G1 com histórico de AER (N=129) e G2 sem histórico de AER (N=182). O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico com o uso kit comercial. O polimorfismo G22A do gene *ADA* foi identificado com o uso do método PCR-RFLP. O valor $p > 0,005$ foi considerado significativo. **Resultados:** As frequências dos genótipos *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02* foram semelhantes entre os grupos e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,7170$; $\chi^2 = 0,6653$; GL = 2). As frequências dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* em G1 foram iguais a 95,6% e 4,4%; em G2, 94,9% e 5,1%, respectivamente ($p=0,8433$; OR=1,179; IC 95%: 0,5340-2.601). **Conclusões:** Os resultados sugerem que

os alelos *ADA*01* e *ADA*02* do gene *ADA* não estão associados ao AER. É possível que a redução nos níveis da ADA resultantes do alelo *ADA*02* não apresente um efeito protetor contra o AER em brasileiras.

Palavras-chave: Aborto Habitual, Adenosina desaminase, Polimorfismo de Fragmento de Restrição.

Abstract

ADA gene G22A Polymorphism and recurrent spontaneous abortion: lack of association

Introduction: Adenosine deaminase (ADA), an enzyme coded by *ADA* gene (20q13.11) acts in adenosine metabolism and it is involved in the modulation of the immune response. *ADA* gene G22A polymorphism originates two co-dominants alleles *ADA*01* and *ADA*02* and influences the level of ADA enzyme in the organism. Apparently it has a fundamental role in gestational maintenance. The *ADA*02* allele has been associated as protector effect against recurrent spontaneous abortion (RSA) in European Caucasian women.

Aim: To investigate if *ADA* gene G22A polymorphism is associated with occurrence of RSA in Brazilian women. **Methods:** After obtaining the written consent 311 women were selected to compose two groups: G1 with previous history of RSA (n=129) and G2 without previous history of RSA (n=182). Genomic DNA was isolated from peripheral blood using commercial kits. The PCR-RFLP method was used to identify *ADA* gene G22A polymorphism. $p > 0.005$ was considered statistically significant. **Results:** The frequencies of *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* and *ADA*02;*02* genotypes were similar in both groups (G1 and G2) with no statistically significance differences observed ($p = 0,7170$; $\chi^2 = 0,6653$; GL = 2). *ADA*01* and *ADA*02* alleles frequencies were 95,6% and 4,4% in G1 group and 94,9% and 5,1% in G2 group, respectively ($p = 0,8433$; OR = 1,179; CI 95%: 0,5340 – 2.601). **Conclusion:** The results suggest that *ADA* alleles *ADA*01* and *ADA*02* are not associated with RSA. It

is possible that the reduction of ADA levels resulting from the presence of at least one *ADA*02* allele do not have a role against abortion in Brazilian women.

Keywords: Habitual Abortion, Adenosine Deaminase, Polymorphism of Restriction Fragments.

1. Introdução

1.1 Abortamento espontâneo recorrente

O abortamento espontâneo recorrente (AER) é definido atualmente como duas ou mais perdas gestacionais⁽¹⁾ anteriores a 20 semanas (ou o concepto pesando menos de 500 gramas), sem feto viável intercalado⁽²⁾ e compromete 1 a 5% dos casais que desejam reproduzir.⁽³⁻⁵⁾ De fato, a maior porcentagem de falhas na reprodução humana se relaciona a gestações que terminam antes mesmo da sua detecção.⁽⁶⁾ Além disso, considerando que a probabilidade de concepção durante um ciclo menstrual é de apenas 40% e que 10 a 15% das gestações terminam em abortamento,^(7,8) é provável que a frequência real de AER entre casais em idade reprodutiva esteja subestimada.⁽⁹⁾

Os abortamentos espontâneos podem apresentar diferentes formas clínicas. O abortamento evitável ou ameaça de abortamento é caracterizado pela chance de reversão do quadro clínico, enquanto no inevitável não é possível prosseguir com a gestação. Quando ocorre a eliminação integral do ovo considera-se abortamento completo, embora no incompleto possa haver a expulsão do feto e permanência da placenta e a eliminação parcial do ovo. O abortamento infectado normalmente se relaciona a casos de abortamento provocado, e o retido é aquele em que o ovo sem vitalidade permanece no útero por mais de trinta dias.^(2,10)

O AER primário é caracterizado pela ausência de gestação de evolução normal anterior à sequência de perdas. Se houver gestação a termo

antes dos abortamentos, é classificado como AER secundário. Os abortamentos espontâneos também podem ser classificados em precoces (80% dos casos), se ocorrerem até 12 semanas de gestação, ou como tardios (20% dos casos), se ocorrerem após esse período. Esta classificação é importante para a identificação de possíveis patologias relacionadas aos abortamentos, que tendem a se repetir no mesmo período do desenvolvimento fetal. O hipotireoidismo materno e as alterações cromossômicas, por exemplo, são causas de perdas precoces, enquanto a incompetência istmo cervical é responsável por abortamentos tardios.⁽²⁾

O abortamento espontâneo é a complicação mais frequente da gestação, responsável pelo óbito de mais mulheres que as neoplasias ginecológicas e os riscos de parto combinados.⁽¹¹⁾ Além da alta taxa de mortalidade, é importante considerar a morbidade a que essas mulheres estão sujeitas, como dor pélvica crônica, aderências, obstruções tubárias, grandes hemorragias, perfurações uterinas, ulcerações do colo e vagina, infecções, complicações tardias e transtornos da menstruação.⁽¹⁰⁾

Vários fatores se relacionam a taxas elevadas de abortamento espontâneo, independente da situação clínica materna. Dentre os fatores inespecíficos, alguns são mais frequentes e merecem destaques.

A idade avançada do casal, especialmente a da mulher, é o principal fator de risco para o AER em mulheres saudáveis. Analgésicos, como os antiinflamatórios não esteróides, por exemplo a aspirina e o acetaminofen, somente devem ser utilizados em baixas dosagens e após o segundo trimestre gestacional na prática clínica obstétrica para prevenção da pré-eclâmpsia em mulheres com gestação de risco, evitando assim possíveis complicações.

O consumo de cafeína em excesso, álcool e tabaco também aumentam consideravelmente o risco de abortamento.⁽¹⁰⁾ Além desses fatores, cada perda gestacional aumenta o risco de um novo abortamento.^(12,13) Para uma segunda perda é observado o risco de 16%, sendo estimado em 25-30% para terceira perda, 45% para a quarta e 54% para uma quinta perda.^(2,14)

A etiologia dos AERs envolve diversos fatores relacionados à reprodução humana, destacando-se os auto-imunes, anatômicos, endócrinos, genéticos e infecciosos⁽¹⁵⁾ que podem atuar na seleção do conceito de maneira a impedir a implantação do zigoto ou prevenindo a fertilização.⁽¹⁶⁾ Além disso, a causa idiopática ocorre com grande frequência.⁽¹⁵⁾ Como muitas vezes é possível se identificar mais de um fator etiológico num mesmo casal, os AERs podem também ser considerados distúrbios multifatoriais.⁽¹⁷⁾ A figura 1 apresenta as frequências destes fatores etiológicos de AER.

Alguns polimorfismos genéticos foram associados ao AER, tais como o Antígeno Leucocitária Humano-G (HLA-G),⁽¹⁸⁾ Metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) e Transcobalamina⁽¹⁹⁾, Inibidor de ativação do plasminogênio-1 (PAI-1) e Enzima conversora de angiotensina (ECA).⁽²⁰⁾ Além disso, as inversões, inserções e translocações cromossômicas também possuem papel de destaque na etiologia dos AERs.⁽¹⁰⁾

Os principais fatores anatômicos que causam AER são as malformações uterinas e a incompetência istmo-cervical.^(2,10,21,22) A endometriose é frequentemente associada a casos de abortamento,⁽²³⁾ mas seu papel como fator etiológico não está devidamente estabelecido. Apesar de mulheres inférteis com endometriose apresentarem altas taxas de

abortamentos espontâneos,^(24,25) um estudo posterior sugere que os abortamentos não resultam diretamente da endometriose.⁽²⁶⁾

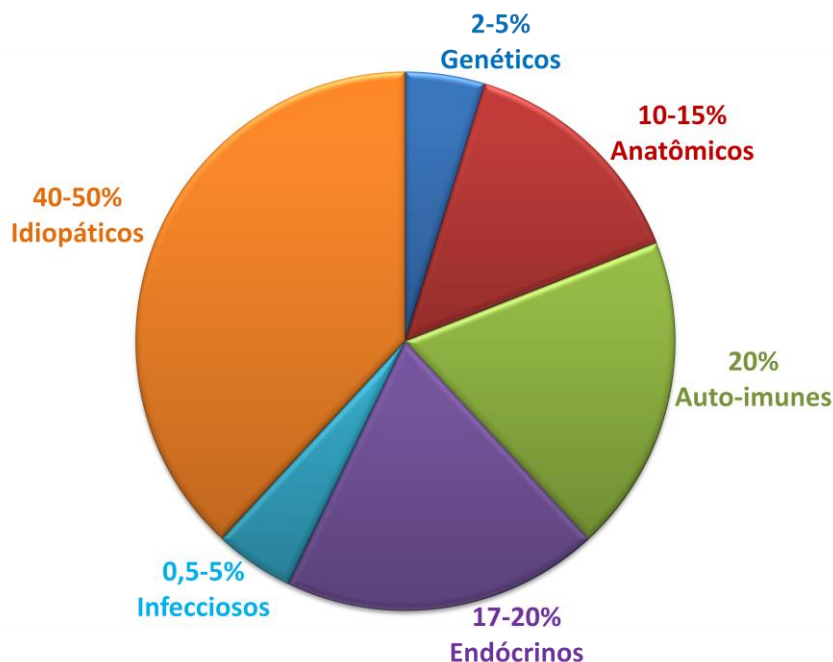


Figura 1. Frequência das etiologias dos abortamentos espontâneos recorrentes.⁽¹⁵⁾

Os fatores imunológicos são muito pesquisados por apresentarem os melhores resultados ao tratamento e também por serem intimamente relacionados ao abortamento recorrente. Estudos apontam que o padrão de citocinas produzidas pelo organismo materno no período pré-implantacional parece influenciar diferentes eventos nas etapas iniciais da reprodução. Enquanto as citocinas expressas por células T helper 1 (T_H1) apresentam um efeito deletério no desenvolvimento gestacional, aquelas expressas por células T helper 2 (T_H2) possuem papel benéfico nos eventos reprodutivos.^(2,9)

Dentre os fatores auto-imunes envolvidos no AER, destacam-se a Síndrome de anticorpos antifosfolípidos (SAAF) e o Lúpus eritematoso sistêmico (LES) por apresentarem uma forte e evidente associação com o AER. A SAAF é caracterizada por trombose, perda fetal e trombocitopenia, que normalmente ocorrem associados a anticorpos antifosfolípidos. Enquanto a SAAF primária é desencadeada sem nenhuma doença subjacente, a secundária se associa a uma doença prévia existente, comumente o LES.⁽²⁷⁾ Este também se apresenta na presença de auto-anticorpos e disfunções do sistema imune, resultando em inflamação e danos teciduais.⁽²⁸⁾

Estudos caso-controle pareados demonstram que ovários policísticos são encontrados frequentemente em mulheres com AER. Apesar da morfologia ovariana não estar associada ao sucesso gestacional, ainda não foi estabelecido algum defeito endócrino associado com ovários policísticos como causa de perda fetal.^(29,30)

O diabetes tipo I⁽³¹⁾ e tipo II⁽³²⁾ estão relacionados à presença de adversidades na gestação, incluindo a perda fetal, embora diabéticas insulino-dependentes com a taxa de glicose controlada não apresentam risco gestacional.⁽³³⁻³⁵⁾

Cheng e colaboradores⁽³⁶⁾ demonstraram que a taxa de detecção de *Ureaplasma urealyticum* em mulheres aumenta de acordo com o número de abortamentos espontâneos. *Chlamydia trachomatis* é indicada como uma possível causa de abortamento espontâneo, porém não necessariamente AER.⁽³⁷⁾ No entanto, outros estudos associaram a infecção como causa de abortamentos espontâneos^(38,39) e AERs.^(40,41)

Na tabela 1 estão apresentados os fatores etiológicos que são mais frequentemente associados ao AER, bem como suas respectivas especificações.

Tabela 1. Fatores etiológicos mais frequentemente associados aos abortamentos espontâneos recorrentes e suas especificações.

Fatores	Especificações
Genéticos	Translocações cromossômicas Inversões cromossômicas Inserções cromossômicas Polimorfismos genéticos
Anatômicos	Malformações uterinas Incompetência istmo cervical Sinéquias Endometriose
Endócrinos	Deficiência de corpo lúteo Hipotireoidismo Síndrome do ovário policístico Diabetes mellitus
Imunológicos	Lúpus eritematoso sistêmico Síndrome de anticorpos antifosfolípides

Adaptado de Rezende & Montenegro⁽²⁾ e Ford & Schust.⁽¹⁵⁾

Os casais que passam por processos de sucessivas perdas gestacionais normalmente são cercados por muitas conturbações psicológicas, sendo a mulher muitas vezes mais suscetível por ser a gestante do feto. É comum o acúmulo de sentimentos de ansiedade, tristeza, depressão, culpa, medo, raiva, desespero, entre outros. A atenção psicológica dispensada a estes casais é muito importante, sendo que o aconselhamento e a terapia

podem ajudar a lidar com os sentimentos de falecimento e luto, com as dificuldades que podem surgir no relacionamento conjugal ou com amigos, familiares e colegas de trabalho, com o sentimento de culpa e outros tantos envolvidos no processo, e a decidir o futuro em relação a tratamentos e novas tentativas de ter filhos.^(42,43)

1.2 Adenosina deaminase

A adenosina deaminase (ADA) é uma enzima presente em todos os tecidos humanos, principalmente no tecido linfóide, e participa da via de recaptção de purinas catalisando a deaminação hidrolítica irreversível da adenosina e deoxiadenosina para inosina e deoxiinosina, respectivamente, com excreção de amônia.⁽⁴⁴⁾ A ação da ADA é responsável pela conversão da adenosina em outras purinas para reutilização (recaptção) ou remoção por degradação eventual a ácido úrico. A via de recaptção parece ser de importância fundamental para células tais como linfócitos e eritrócitos, tanto pela total ausência ou pela baixa atividade de recaptção das purinas.⁽⁴⁵⁾

A via de metabolismo da adenosina envolve várias outras enzimas e se inicia quando a S-adenosil-homocisteína (SAH) é utilizada como substrato pela SAH-hidrolase para produzir homocisteína e adenosina. A partir de então, a adenosina será utilizada como substrato para a ADA realizar a deaminação hidrolítica irreversível da adenosina para inosina, que formará a hipoxantina sob ação da enzima nucleotídeo fosforilase. Esta etapa da via metabólica ocorre em direção à excreção de ácido úrico, por meio da ação da xantina

oxidase. A homocisteína passa por várias reações enzimáticas até um processo de metilação que a converte em adenina. Tanto a adenosina como a adenina são utilizadas como substrato para a formação de adenosina monofosfato (AMP), no entanto a adenosina-fosforibosil-transferase catalisa uma reação irreversível da adenina, enquanto a 5'-nucleotidase é responsável por metabolizar uma reação reversível de adenosina em AMP (Figura 2).⁽⁴⁶⁾

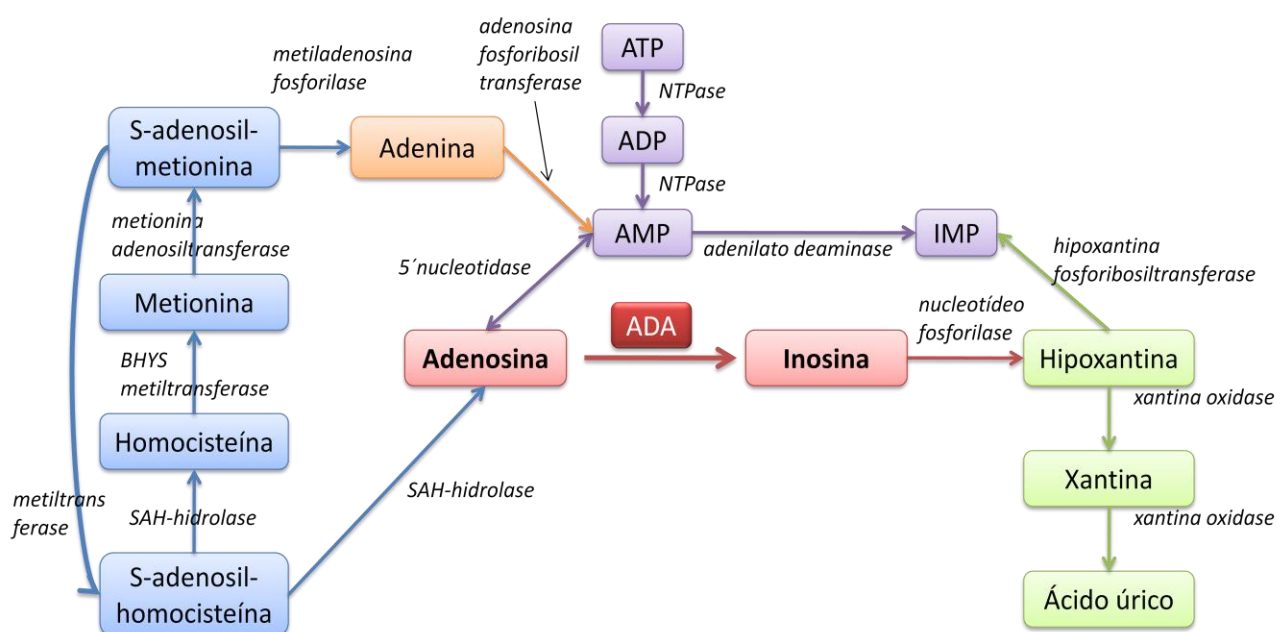


Figura 2. Papel da ADA no metabolismo da adenosina. ATP = adenosina trifosfato; ADP = adenosina difosfato; AMP = adenosina monofosfato; IMP = inosina monofosfato; SAH-hidrolase = S-adenosil-homocisteína hidrolase; BHYS-metiltransferase = betaina-homocisteína-metiltransferase. Modificado de Franco et al.⁽⁴⁶⁾

A ADA catalisa a deaminação hidrolítica irreversível da deoxiadenosina, proveniente da quebra de ácido nucléico, em deoxiinosina. A desoxinucleosídeo kinase também pode utilizar a deoxiadenosina como substrato para formar deoxiadenosina monofosfato. Neste caso, é utilizada como substrato para a ribonucleotídeo redutase, passando por deoxiadenosina difosfato e chegando a deoxiadenosina trifosfato. Ao seguir para a formação de hipoxantina por ação da nucleotídeo fosforilase, será excretada na forma de ácido úrico da mesma forma como ocorre com a inosina (Figura 3).⁽⁴⁷⁾

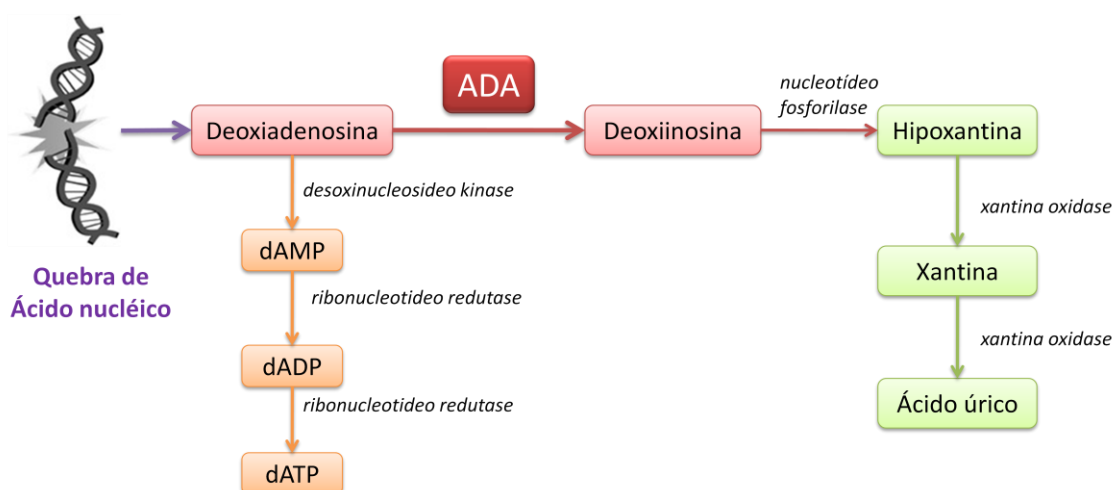


Figura 3. Papel da ADA no metabolismo da deoxiadenosina. dATP = deoxiadenosina trifosfato; dADP = deoxiadenosina difosfato; dAMP = deoxiadenosina monofosfato. Adaptado de Curto et al.⁽⁴⁷⁾

A inflamação é um componente essencial da defesa do organismo, embora seu excesso possa causar lesão tecidual e necrose dentre outros efeitos indesejados. A adenosina é capaz de regular negativamente a resposta

inflamatória e serve como um importante mecanismo inato que protege os tecidos em situações de doença, tais como isquemia, hipóxia e infecções.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ Nessas condições ocorre o aumento dos níveis extracelulares de adenosina, que normalmente resulta em atividade de cAMP (adenosina monofosfato cíclica) elevada, fazendo a regulação negativa da ativação da célula hospedeira. A adenosina possui um efeito protetor evidente, além de ser importante para proteção na isquemia e dano tecidual asséptico.⁽⁵¹⁾ Este catabólito comum é, portanto, denominado nucleosídeo de retaliação, devido a sua defesa ativa contra o estresse celular.^(49,50) O efeito supressor da adenosina regula, portanto, as funções imunes.^(52,53)

Ao atuar como hormônio local, a adenosina ainda promove a regulação do fluxo sanguíneo, da neurotransmissão, da agregação plaquetária e da atividade da musculatura lisa.⁽⁵⁴⁾

Atualmente são conhecidos quatro receptores de adenosina A1, A2, A3 e A4, porém a relação destes com as funções celulares ainda não são bem conhecidas.⁽⁵⁵⁾ No entanto, sabe-se que o receptor A1 ativa, enquanto o A2 inibe algumas células inflamatórias.⁽⁵⁶⁾ Em camundongos e humanos, a sinalização da adenosina, principalmente via receptores P1 A2A e A2B em macrófagos inibe citocinas inflamatórias enquanto estimula a produção de Interleucina (IL)-10.^(52,53) Além disso, reduz a produção do fator de necrose tumoral (TFN) e aumenta a de IL-6 de monócitos de cordão umbilical, o que parece conferir suscetibilidade a infecções microbianas em recém nascidos humanos.⁽⁵⁷⁾

Variações mínimas nos níveis da ADA podem ter efeitos significantes nas funções celulares e nas reações imunológicas.⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾ O

acúmulo de adenosina decorrente da redução da atividade da ADA é responsável pela elevação dos níveis de cAMP, conseqüentemente aumentando a regulação negativa da resposta inflamatória, o que acaba por inibir a resposta celular. A inativação irreversível da SAH-hidrolase é outra consequência do acúmulo de adenosina, refletindo em inibição das reações de metilação mediadas pela S-adenosil-metionina, alterando o crescimento e diferenciação celular, promovendo a apoptose principalmente de células T. Por outro lado, o acúmulo de deoxiadenosina é responsável pelo acúmulo de dATP, que ao interagir com a enzima ribonucleotídeo redutase, promove a inibição da replicação de DNA (Figura 4).⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾

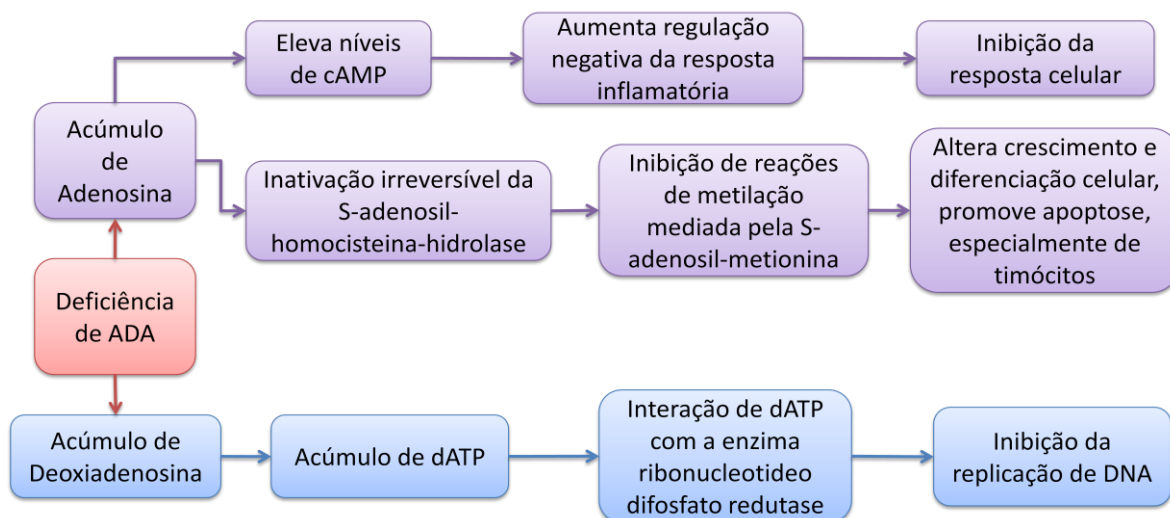


Figura 4. Consequências da deficiência de ADA em humanos. cAMP = adenosina monofosfato cíclica; dATP = adenosina trifosfato. Adaptado de Hershfield et al.⁽⁶¹⁾ Siaw et al.⁽⁶²⁾ e Benveniste et al.⁽⁶³⁾

A atividade da ADA se modifica em várias doenças em que há alteração do status imune, tais como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, tuberculose e mononucleose infecciosa,^(65,66) sendo utilizada como um adequado marcador de resposta celular.⁽⁶⁷⁾

A ADA é encontrada em humanos intra e extracelularmente em diferentes isoformas. A isoforma ADA1 ocorre principalmente no citosol, com função de proteção celular contra a apoptose por meio da eliminação de derivados tóxicos intracelulares de adenosina e deoxiadenosina, embora seja encontrada na superfície celular associada a um complexo de proteínas idêntico ao antígeno CD26, denominado ADAcp, formando a ecto-ADA, que regula os níveis de adenosina extracelular e liberação de citocinas. A isoforma ADA2 é encontrada em monócitos e difere da ADA1 em relação ao peso molecular e parâmetros catalíticos. A ADA2 pertence a uma nova Família de fatores de crescimento com atividade adenosina deaminase (ADGF), estimulando a diferenciação de monócitos em macrófagos e a proliferação de células T_H e macrófagos.^(68,69)

O bloqueio da ADA extracelular melhora a sinalização da adenosina nas células T.⁽⁷⁰⁾ A importância funcional do antígeno CD26, presente na ecto-ADA, na cascata de ativação da célula T, juntamente com o papel essencial da ADA no desenvolvimento humano de resposta imunológica normal sugere um envolvimento direto da ecto-ADA na ativação da célula T.⁽⁷¹⁾ A expressão da ecto-ADA é regulada por citocinas endógenas pela ativação de células T, positivamente por IL-2 e IL-12 e negativamente por IL-4.⁽⁶⁵⁾

A deficiência genética de ADA resulta na síndrome da imunodeficiência combinada grave (SCID), uma doença de herança

autossômica recessiva, fatal na infância quando não tratada.⁽⁴⁵⁾ Compreende um grupo de distúrbios que afeta gravemente tanto a imunidade celular como a humoral, pois seus portadores apresentam deficiência de linfócitos T e B e de células Natural Killer (NK).⁽⁷²⁾ Grande parte da atenção voltada ao estudo desta enzima e do gene *ADA*, que controla sua expressão, se deve à importância desta doença, que afeta de um a cada 200 mil a um a cada milhão de nascimentos.⁽⁷³⁾

O gene *ADA* se localiza no cromossomo humano 20q13.11 e contém 12 exons e 11 introns distribuídos em aproximadamente 32 kilobases (kb) de DNA. Este gene é incomum por possuir um primeiro intron relativamente muito grande (15 kb) e um grande número de sequências Alu repetitivas, 13 das quais se localizam no primeiro intron.⁽⁴⁵⁾

Mais de 70 mutações já foram identificadas em indivíduos com deficiência de *ADA* com imunodeficiência e em indivíduos saudáveis com deficiência parcial de *ADA*.⁽⁷³⁻⁷⁵⁾ Aproximadamente 60% dessas mutações são *missense*, 20% *splicing*, 9% deleções intra-exônicas, 7% mutações sem sentido e 3% deleções de um ou vários exons.⁽⁷³⁾

Diversas variantes eletroforéticas da *ADA* já foram descritas em populações no mundo todo. A variante mais comum, conhecida como *ADA2*, resulta em atividade enzimática reduzida. Esta é herdada codominantemente com a *ADA1*, e já foi encontrada em todas as populações estudadas.⁽⁷⁷⁾

O polimorfismo *G22A* do gene *ADA* origina a isoenzima *ADA2*^(45,78) e afeta o sistema imune devido à redução da atividade da *ADA*.^(79,80) Em portadores de um alelo *ADA*02*, a *ADA* é 15 a 20% menos ativa em relação a homozigotos *ADA*01;*01*. A substituição de uma guanina por uma adenina no

nucleotídeo 22 do exon 1 leva à síntese do ácido aspártico ao invés da asparagina no aminoácido 8. ^(45,78)

O alelo *ADA*02* é menos comum que o *ADA*01*, sendo encontrado com frequência igual a 0,12 (12%) em caucasianos^(77,81) e varia entre 0,03 (3%) e 0,04 (4%) em negros e afro-descendentes.^(45,77)

A regulação da atividade da ADA é fundamental na manutenção da gestação normal,^(66;82) visto que o sistema imunológico materno pode rejeitar o embrião durante o a pré-implantação ou após o período implantacional devido à imunidade celular e após esse período, tanto as respostas celular como humoral podem causar abortamento.⁽⁶⁾ Enquanto os linfócitos T_H1 estimulam os T_H2 inibem a expressão da ecto-ADA nos linfócitos.⁽⁶⁶⁾ O predomínio da resposta humoral (T_H2) é necessário para a manutenção da gestação normal e a dominância de resposta celular (T_H1) se associa a casos de AER.⁽⁸³⁾

Um estudo realizado na Itália encontrou a frequência do alelo *ADA*02* de 0,09 (9,3%) em mulheres com AER e 0,19 (19,1%) nas mulheres sem histórico de abortamento.⁽⁸⁴⁾ Como as europeias com AER apresentaram menor proporção do alelo *ADA*02* que gestantes normais, estes autores sugerem um efeito protetor deste alelo contra o AER, além de maiores taxas de fertilidade. Recentemente, este mesmo grupo observou um efeito cooperativo do polimorfismo da ACP1 (proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular) e da ADA no desenvolvimento do AER.⁽⁸⁵⁾ Estes autores concluíram que mulheres com alta atividade da ADA e baixa atividade da ACP1 apresentaram maior suscetibilidade ao AER.

1.3 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi testar a hipótese de que o polimorfismo G22A do gene *ADA* está associado ao AER.

Seus objetivos específicos foram:

1 - Selecionar dois grupos de gestantes, um com (G1) e outro sem (G2) histórico de AER;

2 - Identificar, com o uso do método PCR-RFLP, os alelos *ADA*01* (G) e *ADA*02* (A) em ambos os grupos;

3 - Comparar o perfil demográfico e clínico das gestantes do grupo G1 de acordo com os genótipos *ADA*01;*01* e *ADA*01;*02*.

2. Casuística e método

2.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP sob o Parecer 308/2008 (Anexo 1). Todas as pacientes selecionadas receberam orientações sobre os objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

2.2 Casuística

Foram selecionados dois grupos de gestantes, um com (G1; N=129) e outro sem (G2; N=182) história prévia de AER, atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto. As gestantes foram selecionadas consecutivamente. Os critérios de inclusão adotados foram: no grupo G1 foram incluídos apenas gestantes com pelo menos dois abortamentos espontâneos consecutivos com o mesmo parceiro, de acordo com os registros médicos e relatos das próprias pacientes; no grupo G2 foram incluídas apenas gestantes com pelo menos duas gestações prévias bem sucedidas e nenhum histórico de abortamento.

2.2.1 Coleta de amostras de sangue

Após a obtenção dos dados clínicos, foram coletados 5 mL de sangue periférico com anticoagulante EDTA de cada participante.

2.3 Métodos

2.3.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 μ L de sangue total, com o uso de kit comercial (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). O protocolo do fabricante foi rigorosamente obedecido.

2.3.2 Avaliação da qualidade do DNA genômico

Utilizou-se o método de eletroforese em gel de agarose para avaliar a qualidade das amostras de DNA genômico, com a finalidade de conhecer sua integridade e o nível relativo de aparente degradação. O gel foi preparado com agarose ultra pura (Invitrogen) na concentração de 2%, dissolvida em tampão TBE 1X e corado com brometo de etídeo (10 mg / mL, Invitrogen). Na primeira canaleta foram aplicados 2,0 μ L do marcador de 100 pares de bases (100 pb DNA - Ladder, Invitrogen). Nas demais, aplicou-se 5,0 μ L de DNA genômico misturado com 2,0 μ L de azul de bromofenol. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal (GIBCO BRL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus – Life Technologies) por uma hora a 110 volts. A Figura 5 representa o perfil eletroforético de oito amostras (das 311) avaliadas por esta

técnica. Todos os géis preparados nesta etapa foram fotografados para registro e arquivo dos resultados.

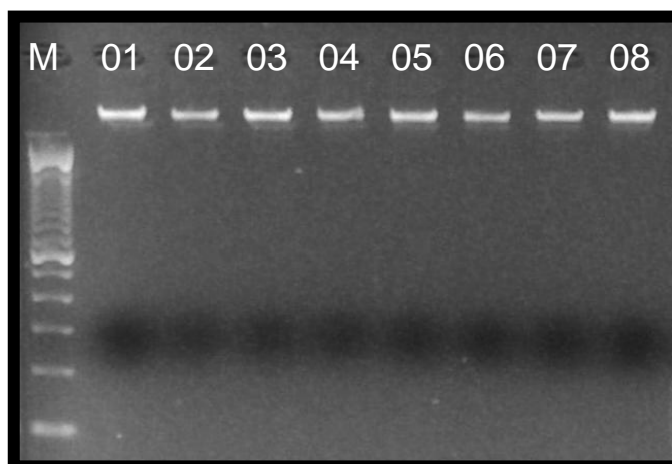


Figura 5. Perfil eletroforético de oito amostras de DNA genômico avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2%. M indica o marcador de 100 pb e 01 a 08 as amostras de DNA genômico.

2.3.3 Identificação dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* do gene *ADA*

A identificação dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* do gene *ADA* foi realizada com o uso do método PCR-RFLP, de acordo com o protocolo de Safranow e colaboradores (2007).⁽⁸⁶⁾

Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica com volume final de 25 μ L, nas seguintes condições: 7,2 μ L de água MilliQ, 5,0 μ L de PCR Buffer Green (5x, Promega), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM, Promega), 2,1 μ L de DMSO (Nuclear), 1,0 μ L de 2-mercapto-etanol (200 mM, Vetec), 1,0 μ L de *primer* sense (5 pM, IDT; 5'-

GCCCCGCCCCGTTAAGAAGAGC-3'), 1,0 µL de *primer* anti sense (5 pM, IDT; 5'- GGTCAAGTCAGGGGCAGAAGCAGA-3'), 4,0 µL de dNTP (1,25 mM, Invitrogen), 0,2 µL de Go Taq Hot Start DNA polimerase (5U, Promega), 2,0 µL de DNA genômico. Como controle interno de contaminação foi preparado para cada mix um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de amplificação foram 94°C 15 minutos, 36 ciclos de 94°C 40 segundos, 66°C 80 segundos, 72°C 80 segundos e 1 ciclo de 72°C 8 minutos, permanecendo em 4°C infinito. O fragmento amplificado contendo 397 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 2%, corado com brometo de etídeo (Invitrogen) (Figura 6). Uma alíquota de 7,0 µL de produto de PCR foi incubada a 65°C com 0,7 µL de *TaqI* Fast Digest (1U, Fermentas) e 1,34 µL do tampão da enzima (10x, Fermentas) por 20 minutos. Os fragmentos foram observados em gel de agarose (Invitrogen) a 2% corado com brometo de etídeo. A corrida eletroforética foi por 30 minutos a 100 volts. O produto de PCR referente ao alelo *ADA*01* (G22) foi clivado em dois fragmentos: um de 245 e outro de 152 pares de bases, enquanto o alelo *ADA*02* (22A) foi identificado pela ausência do sítio de restrição *TaqI*. A Figura 7 ilustra o perfil eletroforético do fragmento de 397 pares de bases do exon 1 do gene *ADA* após digestão com a enzima *TaqI*.

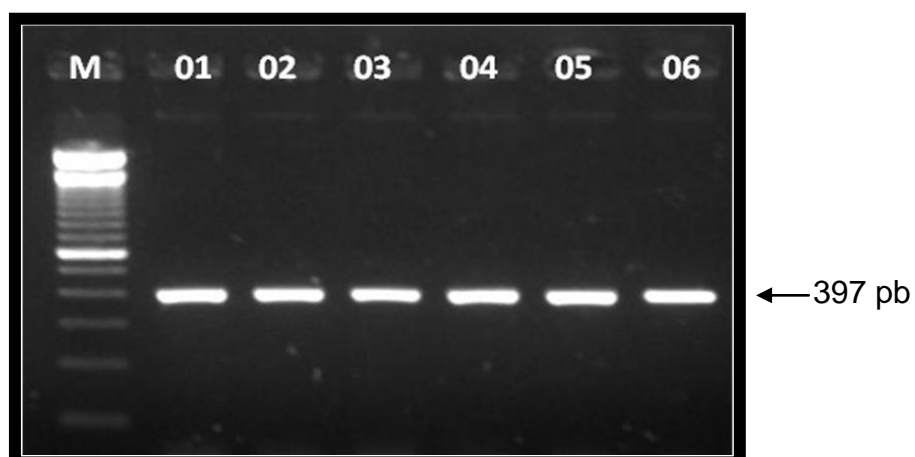


Figura 6. Perfil eletroforético de seis amostras de produto de PCR avaliadas por eletroforese em gel de agarose 2%. M indica o marcador de 100 pb e 01 a 06 os fragmentos de 397 pb do gene *ADA*.

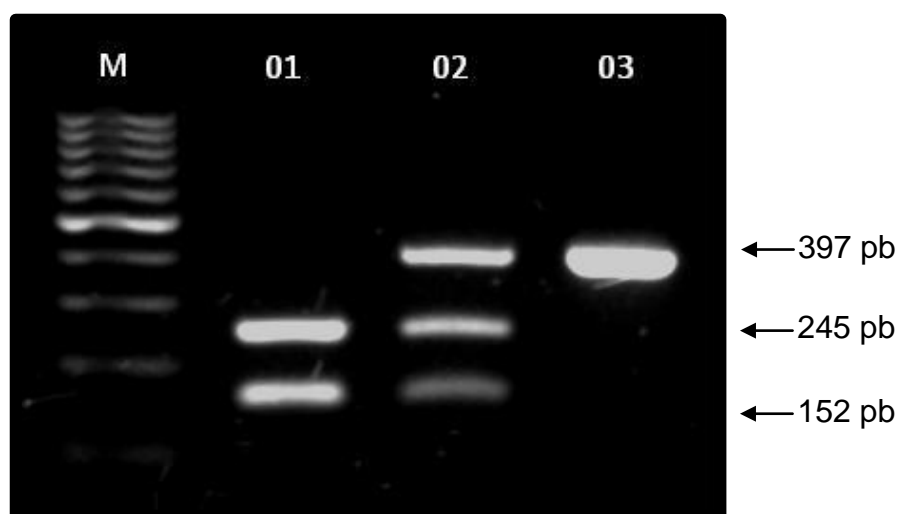


Figura 7. Perfil eletroforético do fragmento de 397 pb do exon 1 do gene *ADA* após digestão com a enzima *TaqI* evidenciando os genótipos *ADA**01;*01 (01), *ADA**01;*02 (02) e *ADA**02;*02 (03); e Marcador (M) de 100 pares de bases.

2.3.4 Análise estatística

Os dados resultantes dos grupos analisados foram comparados com o uso dos testes dos testes Qui-quadrado e teste exato de Fisher, aceitando-se um erro alfa de 5%. O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar se a distribuição dos genótipos *ADA* se encontrava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste exato de Fisher foi aplicado a fim de verificar as diferenças na distribuição dos genótipos e alelos *ADA* na presença e na ausência de AER. Os valores de Odds Ratio e o Intervalo de Confiança a 95% também foram calculados.

3. Artigo

Manuscrito a ser submetido à publicação na Revista *Molecular Human Reproduction* online (Fator de Impacto 3.005; ISSN 1560-2407; Print ISSN 1360-9947).

1 Gene ADA e abortamento espontâneo recorrente

2 **Alelo *ADA*02* do gene *ADA* (20q13.11) e abortamento espontâneo recorrente:**
3 **ausência de associação**

4

5 Daniela Prudente Teixeira Nunes¹, Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin²,
6 Cinara Cássia Brandão de Mattos¹, Antonio Helio Oliani², Denise Cristina Mós Vaz-
7 Oliani², Luiz Carlos de Mattos¹

8

9 ¹Laboratório de Imunogenética – Departamento de Biologia Molecular – FAMERP

10 ²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FAMERP

11

12 **Endereço para correspondência**

13 Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

14 luiz.carlos@famerp.br

15

16 Laboratório de Imunogenética

17 Departamento de Biologia Molecular

18 Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

19 Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416

20 15090-000 – São José do Rio Preto, SP - Brasil

21 Fone: 55 17 3201-5857

22 Fax: 55 17 3229-1777

23 **Resumo**

24

25 **INTRODUÇÃO:** A adenosina deaminase (ADA), uma enzima codificada pelo gene
26 *ADA* (20q13.11), atua no metabolismo da adenosina e deoxiadenosina e modula a
27 resposta imune. O polimorfismo *G22A* do gene *ADA* origina os alelos co-dominantes
28 *ADA*01* e *ADA*02* e influencia o nível de expressão da enzima ADA, a qual possui
29 papel fundamental na manutenção da gestação. O alelo *ADA*02* tem sido associado
30 ao efeito protetor contra o abortamento espontâneo recorrente (AER) em mulheres
31 caucasianas européias. **OBJETIVO:** Investigar se o polimorfismo *G22A* do gene *ADA*
32 está associado à ocorrência de AER em brasileiras. **MÉTODOS:** Foram selecionadas
33 311 mulheres para a composição de dois grupos: G1 com histórico de AER (N=129) e
34 G2 sem histórico de AER (N=182). O DNA genômico foi extraído de sangue periférico
35 com o uso kit comercial para a identificação do polimorfismo *G22A* do gene *ADA*, com
36 o uso do método PCR-RFLP. **RESULTADOS:** As frequências dos genótipos
37 *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02* foram semelhantes entre os grupos e não
38 apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,7170$; $\chi^2 = 0,6653$; GL =
39 2). As frequências dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* em G1 foram iguais a 95,74% e
40 4,26%; em G2 foram iguais a 94,78% e 5,22%, respectivamente ($p = 0,7050$; OR =
41 1,237; IC 95%: 0,5780 - 2,646). **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que os alelos
42 *ADA*01* e *ADA*02* do gene *ADA* não estão associados ao AER. É possível que a
43 redução nos níveis da ADA resultantes do alelo *ADA*02* não apresente um efeito
44 protetor contra o AER em brasileiras.

45

46 **Palavras-chave:** Adenosina deaminase, Abortamento espontâneo recorrente,
47 **Gene ADA**

48

49 **Introdução**

50 O abortamento espontâneo recorrente (AER) é identificado após episódios
51 consecutivos de duas ou mais perdas gestacionais (Rai & Regan, 2006) anteriores a
52 20 semanas, sem feto viável intercalado (Rezende & Montenegro, 2007). Sua etiologia
53 é variada, destacando-se os fatores imunológicos, anatômicos, endócrinos e genéticos
54 (Ford & Schust, 2009), que podem atuar na seleção do conceito de maneira a impedir
55 a implantação do zigoto ou prevenindo a fertilização (Diamond, 1987).

56 A adenosina deaminase (ADA) participa da via de recaptação de purinas e catalisa a
57 deaminação hidrolítica irreversível da adenosina e deoxiadenosina para inosina e
58 deoxiinosina, respectivamente (Frederiksen, 1966). A deficiência da ADA leva ao
59 acúmulo de adenosina e deoxiadenosina, que interferem com processos de metilação,
60 alterando o crescimento e diferenciação celulares (Hershfield & Kredich, 1979), e
61 promovem a apoptose, especialmente dos timócitos (Benveniste & Cohen, 1995).
62 Além disso, a interação da deoxiadenosina trifosfato (dATP) com a enzima
63 ribonucleotídeo redutase é um potente inibidor da replicação de DNA (Siaw et al.,
64 1980). A deficiência genética de ADA resulta na síndrome da imunodeficiência
65 combinada severa (SCID) que compreende um grupo de distúrbios, afetando
66 gravemente tanto a imunidade celular como a humoral, sendo fatal na infância quando
67 não tratada (Hirschhorn et al., 1994).

68 O polimorfismo do gene *ADA* (20q13.11), resultante da substituição G22A, origina a
69 isoenzima ADA 2 (Battistuzzi et al., 1981; Hirschhorn et al., 1994) e parece afetar o
70 sistema imune devido à redução da atividade da ADA (Bottini et al., 2005; Hirschhorn,
71 2006). Portadores do alelo *ADA**02 expressam menores níveis de ADA em
72 comparação aos homozigotos *ADA**01;*01 (Battistuzzi et al., 1981; Hirschhorn et al.,
73 1994).

74 A regulação da atividade da ADA é fundamental na manutenção da gestação normal
75 (Yoneyama et al., 2002; Lee et al., 2007). Nicotra e colaboradores (1998) observaram
76 que mulheres européias com AER apresentam menor proporção do alelo *ADA*02* que
77 gestantes normais, sugerindo um efeito protetor deste alelo contra o AER, além de
78 maiores taxas de fertilidade. Recentemente, este mesmo grupo observou um efeito
79 cooperativo do polimorfismo da ACP1 (proteína tirosina fosfatase de baixo peso
80 molecular) e da ADA no desenvolvimento do AER (Nicotra et al., 2007). Estes autores
81 concluíram que mulheres com alta atividade da ADA e baixa atividade da ACP1
82 apresentaram maior suscetibilidade ao AER.

83 O background europeu está presente na população brasileira (Bertonha, 1997), porém
84 são escassos dados sobre a importância do polimorfismo *G22A* do gene *ADA* no AER
85 em mulheres brasileiras. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre os
86 alelos *ADA*01* e *ADA*02* e a ocorrência de AER em mulheres brasileiras,
87 considerando o perfil demográfico e clínico, comparado àquelas com gestações bem
88 sucedidas.

89

90 **Casuística e Métodos**

91 ***Aspectos éticos***

92 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
93 de São José do Rio Preto - FAMERP sob o Parecer 308/2008. Todas as pacientes
94 selecionadas receberam orientações sobre os objetivos do estudo, assinaram o termo
95 de consentimento livre e esclarecido. Dados epidemiológicos e clínicos foram
96 investigados e anotados em um formulário específico.

97

98 ***Seleção da casuística***

99 Foram selecionados dois grupos de gestantes, um com (G1; N=129) e outro sem (G2;
100 N=182) história prévia de AER, atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia
101 do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do
102 Rio Preto. Os critérios de inclusão adotados foram: no grupo G1 foram incluídos
103 apenas gestantes com pelo menos dois abortamentos espontâneos consecutivos com
104 o mesmo parceiro, de acordo com os registros médicos e relatos das próprias
105 pacientes; no grupo G2 foram incluídas apenas gestantes com pelo menos duas
106 gestações prévias bem sucedidas e nenhum histórico de abortamento.

107

108 ***Coleta de amostras de sangue e extração do DNA genômico***

109 Foram coletados 5 mL de sangue periférico com anticoagulante EDTA de cada
110 participante. O DNA genômico foi extraído de 200 µL de sangue total, com o uso de kit
111 comercial (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen). O protocolo do fabricante foi
112 rigorosamente obedecido.

113

114 ***Identificação dos alelos ADA*01 e ADA*02 do gene ADA***

115 A identificação dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* do gene *ADA* foi realizada com o uso do
116 método PCR-RFLP, de acordo com o protocolo de Safranow e colaboradores (2007).
117 Para cada amostra de DNA genômico foi realizada uma reação de amplificação gênica
118 com volume final de 25 µl, nas seguintes condições: 7,2 µL de água MilliQ, 5,0 µL de
119 PCR Buffer Green (5x, Promega), 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM, Promega), 2,1 µL de
120 DMSO (Nuclear), 1 µL de 2-mercapto-etanol (200 mM, Vetec), 1,0 µL de *primer* sense

121 (5 pM, IDT; 5'-GCCCGGCCCGTTAAGAAGAGC-3'), 1,0 µL de *primer* anti sense (5
122 pM, IDT; 5'-GGTCAAGTCAGGGGCAGAAGCAGA-3'), 4,0 µL de dNTP (1,25 mM,
123 Invitrogen), 0,2 µL de Go Taq Hot Start DNA polimerase (5U, Promega), 2,0 µL de
124 DNA genômico. Como controle interno de contaminação, foi realizado para cada mix,
125 um tubo de reação sem adição de DNA genômico (branco). As condições de
126 amplificação foram 94°C 15 minutos, 36 ciclos de 94°C 40 segundos, 66°C 80
127 segundos, 72°C 80 segundos e 1 ciclo de 72°C 8 minutos, permanecendo em 4°C
128 infinito. O fragmento amplificado contendo 397 pb foi analisado por eletroforese em gel
129 de agarose (Invitrogen) a 2%, corado com brometo de etídeo (Invitrogen). Uma
130 alíquota de 7,0 µL de produto de PCR foi incubada a 65°C com 0,7 µL de *TaqI* Fast
131 Digest (1U, Fermentas) e 1,34 µL do tampão da enzima (10x, Fermentas) por 20
132 minutos. Os fragmentos foram observados em gel de agarose (Invitrogen) a 2%
133 corado com brometo de etídeo. A corrida eletroforética foi por 30 minutos a 100 volts.
134 O produto de PCR referente ao alelo *ADA*01* (G22) foi clivado em dois fragmentos:
135 um de 245 e outro de 152 pares de bases, enquanto o alelo *ADA*02* (22A) foi
136 identificado pela ausência do sítio de restrição *TaqI*. A Figura 1 ilustra o perfil
137 eletroforético do fragmento de 397 pares de bases do exon 1 do gene *ADA* após
138 digestão com a enzima *TaqI*.

139

140 ***Análise estatística***

141 Os dados dos grupos analisados foram comparados com o uso do teste Qui-quadrado
142 e teste exato de Fisher, aceitando-se um erro alfa de 5%. O teste Qui-quadrado foi
143 aplicado para verificar a distribuição dos genótipos *ADA* encontrava-se de acordo com
144 o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste exato de Fisher foi utilizado para se verificar

145 as diferenças na distribuição dos genótipos e alelos *ADA* na presença e na ausência
146 de AER.

147

148 **Resultados**

149 As características demográficas das gestantes selecionadas para composição dos
150 grupos G1 e G2 estão contidas na Tabela I. As médias de idade e o número médio de
151 gestações apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre G1 e G2. A
152 média de AER no grupo G1 foi igual a 2,68 ($\pm 0,86$), variando de 2 a 6. O número
153 médio de filhos nascidos vivos em G1 e G2 foi igual a 0,5 e 2,57, respectivamente ($p =$
154 $0,0001$).

155 A distribuição dos genótipos *ADA* mostrou-se de acordo com o equilíbrio de Hardy-
156 Weinberg nos grupos G1 ($\chi^2 = 0,26$; DF 1) e G2 ($\chi^2 = 0,57$; DF 1). As frequências dos
157 genótipos *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02* foram semelhantes e não
158 apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,6771$; $\chi^2 = 0,7798$; GL =
159 2). As diferenças mantiveram-se não significantes mesmo quando a comparação entre
160 os grupos G1 e G2 restringiu-se aos genótipos *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02* ($p = 0,8342$;
161 OR = 1.177; IC 95% = 0,5361 – 2.586). Embora os alelos *ADA*01* e *ADA*02* tenham
162 apresentado diferentes frequências em G1 e G2, estas não foram estatisticamente
163 significantes ($p = 0,7050$; OR: 1.237; IC 95%: 0,5780 – 2,646).

164 As características demográficas e os dados clínicos das pacientes de G1, subdivididas
165 de acordo com os genótipos *ADA* (*ADA*01;*01* e *ADA*01;*02*) estão mostradas na
166 Tabela II. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre estes
167 genótipos e média de idade, número médio de gestações e abortamentos, diabetes,
168 hipertensão arterial, ovário policístico, malformação uterina, anticorpos antifosfolípidos

169 e endometriose. Não foram observadas diferenças estatisticamente quanto ao número
170 de filhos nascidos vivos em relação aos genótipos *ADA*01;*01* e *ADA*01;*02* ($p =$
171 $0,1789$).

172

173 **Discussão**

174 O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo *G22A* do gene
175 *ADA*, o qual modula a resposta imune adaptativa por meio do nível de expressão da
176 enzima *ADA*, em mulheres brasileiras com história prévia de AER.

177 Este polimorfismo *G22A* foi associado à menor suscetibilidade à asma brônquica
178 (Ronchetti et al., 1984; Bottini et al., 2005), à doença de Crohn (Bottini et al., 2005), à
179 doença arterial coronariana, (Safranow et al, 2007) e ao autismo (Hettinger et al., 2008
180). Além disso, foi observado que variações no nível da *ADA* resultantes do fenótipo
181 *ADA 2*, o qual está relacionado à presença de pelo menos um alelo *ADA*02*, estão
182 associadas ao menor risco de AER em mulheres europeias (Nicotra et al., 1998;
183 Nicotra et al., 2007).

184 Considerando que a população brasileira possui marcante *background* europeu em
185 suas bases formadoras (Bertonha, 1997), postulamos que o polimorfismo *G22A* do
186 gene *ADA* poderia influenciar a ocorrência de AER em mulheres brasileiras.

187 A casuística selecionada para este estudo é representativa da região noroeste do
188 Estado de São Paulo, a qual se compõe de descendentes de italianos, espanhóis,
189 portugueses e africanos (Perfil Regional da Região Administrativa de São José do Rio
190 Preto, 2009). Para evitar possíveis vieses, selecionamos um grupo controle constituído
191 de mulheres com pelo menos duas gestações prévias bem sucedidas e sem histórico
192 de abortamento.

193 As mulheres com história prévia de AER apresentaram média de idade maior que
194 aquelas sem AER. Esta diferença pode ser resultante do fato de que mulheres que
195 não apresentam fatores de risco para abortamento atingem sucesso reprodutivo e
196 número de filhos desejados em idade precoce (Bottini et al., 2002). Por outro lado,
197 mulheres com alguma dificuldade reprodutiva são estimuladas a persistirem por mais
198 tempo nas tentativas de engravidar e reproduzir, o que contribui para a elevação da
199 média de idade. Além disso, idade elevada é um fator de risco para o AER. Estas
200 observações são corroboradas pelos dados apresentados em um recente inquérito
201 demográfico realizado no Brasil que demonstrou a idade materna elevada como
202 contribuinte para o aumento da prevalência de AER (Cecatti et al., 2010).

203 Neste estudo observamos maior número de gestações nas mulheres com AER em
204 comparação àquelas sem aborto e a diferença entre ambas foi estatisticamente
205 significativa. A ocorrência de abortamento espontâneo é confirmada com base na
206 perda fetal clinicamente reconhecida antes da 20^a semana de gestação e esta
207 condição possui grande valor preditivo para se estabelecer a ocorrência de uma
208 gestação sem sucesso (Rezende & Montenegro, 2007). Mulheres com história de AER
209 persistem na tentativa de engravidar mesmo que muitas vezes, a gestação não vá a
210 termo. Por outro lado, há evidências de que perdas fetais precoces e que não são
211 clinicamente reconhecidas ocorram nas mulheres com predisposição para AER, mas
212 como não chegam a caracterizar gestação propriamente dita, não são incluídas nas
213 estatísticas de abortamento sendo, portanto, subestimadas (Choudhury & Knapp,
214 2000).

215 Várias mulheres do grupo G1 geraram filhos vivos, porém o número médio foi menor
216 em comparação àquelas do G2. Esta observação é concordante com a constatação de
217 que mulheres sem risco de AER apresentam maior chance de gerar filhos vivos
218 (Knudsen et al., 1991). Por outro lado, em mulheres com risco de AER, a chance de

219 abortamentos aumenta a cada nova perda fetal (Knudsen et al., 1991; Rezende &
220 Montenegro, 2007). Parece, portanto, que o sucesso reprodutivo pode ser alcançado
221 em idade mais jovem, especialmente quando as gestantes não apresentam fatores de
222 risco para o AER, contribuindo para o maior número de filhos nascidos vivos neste
223 grupo de mulheres (Andersen et al., 2000; Bottini et al., 2002).

224 As frequências dos genótipos *ADA* foram similares entre G1 e G2 e não se mostraram
225 associadas à ocorrência de AER. Portanto, os resultados apresentados neste estudo
226 são divergentes daqueles observados em mulheres italianas nas quais o alelo *ADA*02*
227 mostrou-se associado ao menor risco de AER (Nicotra et al., 1998; Nicotra et al.,
228 2007). É possível que esta discordância seja decorrente do fato de que o alelo *ADA*02*
229 apresente baixa frequência na população brasileira feminina e que seu efeito protetor
230 seja obscurecido por outros fatores determinantes de AER.

231 Análises populacionais revelaram que a frequência do alelo *ADA*02* é igual 0,12 em
232 caucasianos (Spencer et al., 1968; Weissmann et al., 1982) e varia entre 0,03 a 0,04
233 em negros e afro-descendentes (Weissmann et al., 1982; Hirschhorn et al., 1994). As
234 frequências do alelo *ADA*02* em ambos os grupos foram menores que as relatadas
235 para caucasianos, mas situaram-se muito próximas àquelas observadas em afro-
236 descendentes. Ressalta-se que a casuística que compõe este estudo possui forte
237 influência afro-descendente (Perfil Regional da Região Administrativa de São José do
238 Rio Preto, 2009).

239 A frequência do polimorfismo *G22A* do gene *ADA* ainda foi pouco estudada nas
240 diferentes regiões brasileiras. Um recente estudo observou que a frequência do alelo
241 *ADA*02* em indivíduos saudáveis de ambos os sexos do Estado de Rio Grande do Sul
242 é igual a 11,7% (Dutra et al., 2010). Este valor é aproximadamente duas vezes maior
243 que aquele encontrado no presente estudo, porém o background da população do sul

244 do Brasil é diferente daquele da região noroeste do Estado de São Paulo (Perfil
245 Regional da Região Administrativa de São José do Rio Preto, 2009; Correa, 2007;
246 IBGE, 2010). Portanto, é possível que a frequência do alelo *ADA*02* e sua influencia
247 no AER seja dependente de etnia e que a miscigenação racial brasileira amenize seu
248 impacto no sucesso reprodutivo.

249 A presença de um alelo *ADA*02* no genótipo reduz a expressão da enzima ADA entre
250 15 a 20% em comparação com homozigotos *ADA*01;*01* (Battistuzzi et al., 1981;
251 Hirschhorn et al., 1994). Embora esta enzima tenha importante papel na modulação da
252 resposta imune (Hirschhorn, 1993), a redução de sua expressão não parece afetar os
253 índices de fertilidade das mulheres brasileiras.

254 Para avaliar o efeito diferencial dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* no abortamento, várias
255 características demográficas e dados clínicos das gestantes do grupo G1 com
256 genótipo *ADA*01;*01* e *ADA*01;*02* foram comparadas. Não foram observadas
257 diferenças estatisticamente significantes na média de idade, no número médio de
258 gestações e de abortos, número médio de filhos nascidos vivos, quanto a diabetes,
259 incluindo a forma gestacional e a tipo II, hipertensão arterial, ovário policístico,
260 malformação uterina, anticorpos antifosfolípides e endometriose. Vários destes fatores
261 demográficos estão associados ao aborto porém os mesmos podem atuar de maneira
262 independente dos genótipos ADA.

263 O pequeno número de mulheres *ADA*01;*02* no grupo G1 não permite analisar se um
264 ou outro alelo oferece vantagem biológica no que diz respeito à perda fetal precoce
265 determinada por outros fatores determinantes de AER. O aumento dos níveis de ADA
266 é necessário para a detoxificação da adenosina durante a gestação (Sim & Maguire,
267 1970). Assim, pode-se presumir que a expressão da enzima ADA nos homozigotos

268 *ADA*01;*01* module a resposta imune materna sem necessariamente interferir com a
 269 perda fetal precoce (Hirschhorn, 1993).

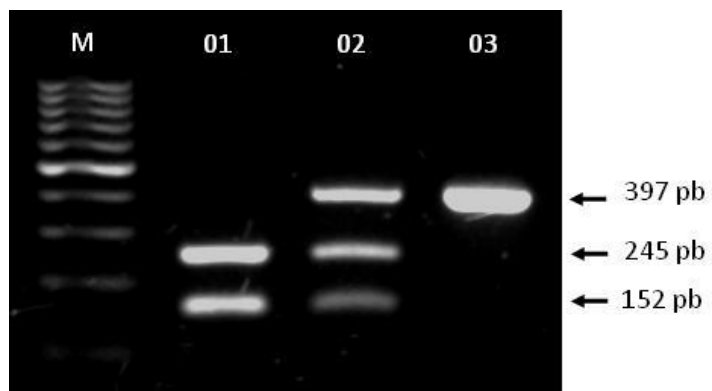
270 Em síntese, os dados deste estudo sugerem que os alelos *ADA*01* e *ADA*02* do gene
 271 *ADA* não estão associados ao maior risco de AER e que as variações nos níveis de
 272 *ADA* resultantes destes alelos não se associam à perda fetal precoce em mulheres
 273 brasileiras.

274

275 Referências

- 276 Rai R and Regan L (2006) Recurrent Miscarriage. *Lancet* 368, 601-611.
 277 Rezende J e Montenegro CAB (2007) Aborto espontâneo. In Rezende J (ed)
 278 Obstetrícia. 10^a ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, BR, pp. 749-775.
 279 Ford HB and Schust DJ (2009) Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, diagnosis and
 280 therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2, 76-83.
 281 Diamond JM (1987) Causes of death before birth. *Nature* 329, 487-488.
 282 Frederiksen S (1966) Specificity of adenosine deaminase toward adenosine and 2'-
 283 deoxyadenosine analogues. *Arch Biochem Biophys* 113, 383-388.
 284 Hershfield MS, Kredich NM, Ownby DR, Ownby H, Buckley R (1979) In vivo
 285 inactivation of erythrocyte S-adenosylhomocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine in
 286 adenosine deaminase-deficient patients. *J Clin Invest* 63, 807-811.
 287 Benveniste P and Cohen A (1995) p53 expression is required for thymocyte apoptosis
 288 induced by adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8373-8377.
 289 Siaw MFE, Mitchello BS, Koller CA, Coleman MS and Hutton JJ (1980) ATP depletion
 290 as a consequence of adenosine deaminase inhibition in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*
 291 77, 6157-6161.
 292 Hirschhorn R, Yang DR and Israni A (1994) An Asp8Asn substitution results in the
 293 adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA 2 allozyme): occurrence on
 294 different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Ann Hum*
 295 *Genet* 58, 1-9.
 296 Battistuzzi G, Ludicone P, Santolamazza P and Petrucci R (1981) Activity of adenosine
 297 deaminase allelic forms in intact erythrocytes and in lymphocytes. *Ann Hum Genet* 45,
 298 15-19.
 299 Bottini N, Gloria-Bottini F, Amante A, Saccucci P and Bottini E (2005) Genetic
 300 polymorphism and Th1/Th2 orientation. *Int Arch Allergy Immunol* 138, 328-333.
 301 Hirschhorn R and Candotti F (2006) Immunodeficiency due to defects of purine
 302 metabolism. In Ochs HD, Smith CIE and Puck JM (eds) *Primary Immunodeficiency*
 303 *diseases: A molecular and genetic approach*. 2nd edn. Oxford University Press, Nova
 304 Iorque, USA, pp. 169-196.
 305 Yoneyama Y, Sawa R, Suzuki S, Miura A, Kobayashi H, Doi D, Yoneyama K and Araki
 306 T (2002) Regulation of plasma adenosine deaminase levels in normal pregnancy.
 307 *Gynecol Obstet Invest* 53, 71-74.
 308 Lee SJ, Hwang HS, Kim BNR, Kim MA, Lee JW, Park YW and Kim YH (2007)
 309 Changes in serum adenosine deaminase activity during normal pregnancy. *J Korean*
 310 *Med Sci* 22, 718-721.

- 311 Nicotra M, Bottini N, Grasso M, Gimelfarb A, Lucarini N, Cosmi E and Bottini E (1998)
312 Adenosine deaminase and human reproduction: A comparative study of fertile women
313 and women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 39:266-270.
- 314 Nicotra M, Bottini N, La Torre M, Amante A, Bottini E, Gloria-Bottini F (2007) Repeated
315 spontaneous abortion: Cooperative effects of ADA and ACP1 genetic polymorphisms.
316 *Am J Reprod Immunol* 58, 1–10.
- 317 Bertonha JF (1997) O Brasil, os imigrantes italianos e a política externa fascista, 1922-
318 1943. *Rev bras polit int* 40, 106-130.
- 319 Safranow K, Rzeuski R, Binczak-Kuleta A, Czyzycka E, Skowronek J, Jakubowska K,
320 Wojtarowicz A, Loniewska B, Ciechanowicz A, Kornacewicz-Jach Z et al. (2007) ADA *
321 2 Allele of the Adenosine Deaminase Gene May Protect against Coronary Artery
322 Disease. *Cardiology* 108, 275–281.
- 323 Ronchetti R, Lucanini N, Lucarelli P, Martinez F, Macri F, Carapella E and Bottini E
324 (1984) A genetic basis for heterogeneity of asthma syndrome in pediatric ages:
325 adenosine deaminase phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 74, 81-84.
- 326 Hettinger JA, Liu X, Holden JJ (2008) The G22A polymorphism of the ADA gene and
327 susceptibility to autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 38, 14-19.
- 328 Nicotra M, Bottini N, Grasso M, Gimelfarb A, Lucarini N, Cosmi E and Bottini E (1998)
329 Adenosine deaminase and human reproduction: A comparative study of fertile women
330 and women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 39, 266-270.
- 331 Perfil Regional Região Administrativa de São José do Rio Preto.
332 <http://www.planejamento.sp.gov.br/des/textos8/SJRioPreto.pdf> (acessado em
333 14.10.09).
- 334 Bottini N, Magrini A, MacMurray J, Cosmi E, Nicotra M, Gloria-Bottini F and
335 Bergamaschi A (2002) Smoking, haptoglobin and fertility in humans. *Tob Induc Dis* 1,
336 3-6.
- 337 Cecatti JG, Guerra GVQL, Sousa MH e Menezes GMS. Aborto no Brasil: um enfoque
338 demográfico (2010) *Rev Bras Ginecol Obstet* 32, 105-111.
- 339 Choudhury SR and Knapp LA (2000) Human reproductive failure I: Immunological
340 factors. *Hum Reprod Update* 7, 113-134.
- 341 Knudsen UB, Hansen V, Juul S and Secher NJ (1991) Prognosis of a new pregnancy
342 following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 39, 31-
343 36.
- 344 Andersen AMN, Wohlfahrt J, Cristens P, Olsen J and Melbye M (2000) Maternal age
345 and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320, 1708–1712.
- 346 Spencer N, Hopkinson A and Harris H (1968) Adenosine deaminase polymorphism in
347 man. *Ann Hum Genet* 32, 9-14.
- 348 Weissmann J, Vollmer M and Pribilla O (1982) Survey of the distribution of adenosine
349 deaminase and superoxide dismutase markers in different populations. *Hum Hered* 32,
350 344–356.
- 351 Dutra GP, Ottoni GL, Lara DR and Bogo MR (2010) Lower frequency of the low activity
352 adenosine deaminase allelic variant (ADA1*2) in schizophrenic patients. *Rev Bras*
353 *Psiquiatr* 32, 275-278.
- 354 Correa SMS (2007) Linha étnica entre “alemães” e “brasileiros” em área de
355 colonização no Rio Grande do Sul. XXIV Simpósio Nacional de História.
356 IBGE (Brasil); Histórico de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
357 [http://www.ibge.gov.br/cidadesat/historicos_cidades/historico_conteudo.php?codmun=](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/historicos_cidades/historico_conteudo.php?codmun=431490)
358 [431490](http://www.ibge.gov.br/cidadesat/historicos_cidades/historico_conteudo.php?codmun=431490) (acessado em 20.07.2010).
- 359 Hirschhorn R (1993) Overview of Biochemical Abnormalities and Molecular Genetics of
360 Adenosine Deaminase Deficiency. *Pediatr Res* 33, 35-41.
- 361 Sim MK and Maguire MH (1970) Variation in placental adenosine deaminase activity
362 during gestation. *Biol Reprod* 2, 291-298.
- 363



364

365 Figura 1: Perfil eletroforético do fragmento de 397 pares de bases (pb) do exon 1 do
366 gene *ADA* após digestão com a enzima *TaqI* evidenciando os genótipos *ADA*01;*01*
367 (*01*), *ADA*01;*02* (*02*) e *ADA*02;*02* (*03*); e Marcador (M) de 100 pares de bases.

368

369 Tabela I. Características demográficas e frequências dos genótipos ADA, Odds Ratio, intervalo de
370 confiança e valor p calculados para os grupos G1 e G2.

	G1 (N=129)		G2 (N=182)				p
Média de idade (SD)	31,97 (±5,7)		29,27 (±5,8)				0,0001
Gestações (SD)	4,6 (±1,5)		3,5(±0,98)				0,0001
Genótipos ADA	N	%	N	%	OR	IC 95%	p*
<i>ADA*01;*01</i>	118	91,47	164	90,20	1,177	0,5361 – 2,586	0,8435
<i>ADA*01;*02</i>	11	8,52	17	9,30	0,9048	0,4088 – 2,003	0,8436
<i>ADA*02;*02</i>	0	0,00	1	0,50	0,4260	0,01720 - 10552	1,000
Alelos							
<i>ADA*01</i>	247	95,74	345	94,78	1,237	0,5780 – 2,646	0,7050
<i>ADA*02</i>	11	04,26	19	05,22			

371 * Calculado com o uso do teste exato de Fisher.

372

373 Tabela 2. Características demográficas das mulheres com dois ou mais abortamentos espontâneos de
 374 acordo com os genótipos *ADA*01;*01* e *ADA*01;*02*.

Características	Total	<i>ADA*01;*01</i>	<i>ADA*01;*02</i>	p
Média de idade	31,9 (±5,7)	32,1 (±5,7)	30,0 (±5,1)	0,2301
Gestações	4,42 (±1,6)	4,71 (±1,53)	3,6 (±1,14)	0,2417
Abortamentos	-	2,68 (±0,86)	2,5 (±0,57)	0,6765
Diabetes	4/129 (3,1%)	3/118 (1,9%)	1/11 (9,1%)	0,3030
Hipertensão arterial	17/129 (13,1%)	16/118 (13,3%)	1/11 (9,1%)	1,0000
Ovário policístico	18/129 (14%)	18/118 (15,2%)	0/11 (0,0%)	0,3607
Malformação uterina	6/129 (4,6%)	6/118 (2,8%)	0/11 (0,0%)	1,0000
Anticorpos antifosfolípidos	10/129 (7,7%)	9/118 (8,5%)	1/11 (9,1%)	1,0000
Endometriose	17/129 (13,2%)	14/118 (9,5%)	3/11 (27,3%)	0,1602

375

4. Conclusão

O polimorfismo *G22A* do gene *ADA* não está associado ao AER na casuística analisada.

1 – A prática clínica obstétrica é importante para se confirmar a perda fetal antes da 20ª semana de gestação, caracterizando o abortamento espontâneo. O grupo G1, com histórico de AER foi composto por 129 gestantes, enquanto o grupo G2, com gestações bem sucedidas e sem AER foi formado por 182 gestantes.

2 - A frequência do alelo *ADA*02* é semelhante em mulheres com e sem histórico de AER.

3 – O perfil demográfico e clínico das mulheres do grupo G1 não se associa aos genótipos *ADA*01;*01* e *ADA*01;*02* do gene *ADA*.

5. Referências Bibliográficas

1. Rai R, Regan L. Recurrent Miscarriage. *Lancet* 2006;368 (9535):601-11.
2. Rezende J, Montenegro CAB. Aborto espontâneo. In: Rezende J, editor. *Obstetrícia*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p. 749-775.
3. Lejeune V. Early recurrent spontaneous abortion: how to take care in 2006? *Gynecol Obstet Fertil* 2006;34 (10):927-37.
4. Stephenson MD. Management of recurrent early pregnancy loss. *J Reprod Med* 2006;51 (4):303-10.
5. Stephenson MD, Sierra S. Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod* 2006;21 (4):1076-82.
6. Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update* 1996;2 (2):118-136.

7. United Nations. Department of Social Affairs, Fetal, Infant, And Early Childhood Mortality - I. The Statistics. J Am Med Assoc 1955;158 (9):795-6.

8. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. Fertil Steril 2003;79 (3):577-84.

9. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. Hum Reprod Update 2001;7 (2):113-34.

10. Costa CFF, Costa HLFF. Abortamento. In: Benzecry, editor. Tratado de Obstetrícia. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.413-21.

11. Randall CL, Birtch PK. Spontaneous abortion – Diagnosis and treatment. Can Med Assoc J 1952;66 (2):132-7.

12. Roth DB. The frequency of spontaneous abortion. Int J Fertil 1963;8:431-4.

13. Hill JA, Anderson DJ. Immunological mechanisms in recurrent spontaneous abortion. *Arch Immunol Ther Exp* 1990;38 (1-2):111–9.

14. Knudsen UB, Hansen V, Juul S, Secher NJ. Prognosis of a new pregnancy following previous spontaneous abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991;39 (1):31-6.

15. Ford HB, Schust DJ. Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, diagnosis and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009;2 (2):76-83.

16. Diamond JM. Causes of death before birth. *Nature* 1987;329 (6139):487-8.

17. Christiansen OB, Steffensen R, Nielsen HS, Varming K. Multifactorial etiology of recurrent miscarriage and its scientific and clinical implications. *Gynecol Obstet Invest* 2008;66 (4):257–67.

18. Abbas A, Tripathi P, Naik S, Agrawal S. Analysis of human leukocyte antigen (HLA)-G polymorphism in normal women and in women with recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogenet* 2004;31 (6):275–8.

19. Zettenberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:7.

20. Buchholz T, Lohse P, Rogenhofer N, Kosian E, Pihusch R, Thaler CJ. Polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes are associated with recurrent spontaneous miscarriages. *Hum Reprod* 2003;18 (11):2473-77.

21. Somigliana E, Viganò P, Vignali M. Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function? *Hum Reprod Update* 1999;5 (1):40-51.

22. Parveiz T. Recurrent pregnancy loss, recurrent abortion, recurrent miscarriage, habitual abortion. *JK-Practitioner* 2003;10 (4):323-26.

23. Dicker D, Goldman JA, Levy T, Feldberg D, Ashkenazi J. The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing in vitro fertilization–embryo transfer. *Fertil Steril* 1992;57 (3):597–600.

24. Wheeler JM, Johnston BM, Malinak LR. The relationship of endometriosis to spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1983;39 (5):656–60.

25. Metzger DA, Olive DL, Stohs GF, Franklin RR. Association of endometriosis and spontaneous abortion: effect of control group selection. *Fertil Steril* 1986;45 (1):18–22.

26. Pittaway DE, Vernon C, Fayez JA. Spontaneous abortion in women with endometriosis. *Fertil Steril* 1988;50 (5):711–5.

27. Louzada Jr. P, Simon SM, Voltarelli JC, Donaldi EA. Síndrome do anticorpo antifosfolípide. *Medicina, Ribeirão Preto* 1998;31:305-15.

28. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25 (11):1271-7.

29. Howles CM, Macnamee MC, Edwards RG. Follicular development and early luteal function of conception and non-conceptional cycles after human in-vitro fertilization: endocrine correlates. *Hum Reprod* 1987;2 (1):17-21.

30. Homburg R, Armar NA, Eshel A, Adams J, Jacobs HS. Influence of serum luteinising hormone concentrations on ovulation, conception and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *BMJ* 1988;297 (6655):1024-6.
31. Evers IM, de Valk HW, Visser GHA. Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands. *BMJ* 2004;328 (7445):915-9.
32. Valk HW, van Nieuwaali NHG, Visser GHA. Pregnancy Outcome in Type 2 Diabetes Mellitus: A Retrospective Analysis from the Netherlands. *Rev Diabet Stud* 2006;3 (3):134-42.
33. Casson IF, Clarke CA, Howard CV, McKendrick O, Pennycook S, Pharoah POD, et al. Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: results of a five year population cohort study. *BMJ* 1997;315 (7103):275-8.
34. Mills JL, Simpson JL, Driscoll SG, Jovanovic-Peterson L, Allen MV, Aarons JH, et al. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N Engl J Med* 1988;319 (25):1617-23.

35. Lorenzen T, Pociot F, Johannesen J, Kristiansen OP, Nerup J. A population-based survey of frequencies of self-reported spontaneous and induced abortions in Danish women with Type 1 diabetes mellitus. Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group. *Diabet Med* 1999;16 (6):472-6.
36. Cheng SY, Ling TS, Fu QH. *Ureaplasma urealyticum* infection in spontaneous abortion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1994;29 (4):230-1.
37. Tadmor OP, Shaia M, Rosenman H, Livshin Y, Chonkroun C, Barr I, et al. Pregnancy outcome in serologically indicated active *Chlamydia trachomatis* infection. *Isr J Med Sci* 1993;29 (5):280-4.
38. Naessens A, Foulon W, Cammu H, Goossens A, Lauwers S. Epidemiology and pathogenesis of *Ureaplasma urealyticum* in spontaneous abortion and early preterm labour. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987;66 (6):513-6.
39. Quinn PA, Petric M, Barkin M, Butany J, Derzko C, Gysler M, et al. Prevalence of antibodies to *Chlamydia trachomatis* in spontaneous abortion and infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156 (2):291-6.

40. Harger JH, Archer DF, Marchese SG, Muracca-Clemens M, Garver KL. Etiology of recurrent pregnancy losses and outcome of subsequent pregnancies. *Obstet Gynecol* 1983;62 (5):574–81.

41. Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1984;148 (2):140–6.

42. Liddell HS, Pattison NS, Zanderigo A. Recurrent Miscarriage – Outcome after supportive care in early pregnancy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1991;31 (4):320-2.

43. Nery IS, Monteiro CFS, Luz MHBA, Crizóstomo CD. Vivências de mulheres em situação de aborto espontâneo. *R Enferm UERJ* 2006;14 (1):67-73.

44. Frederiksen S. Specificity of adenosine deaminase toward adenosine and 2'- deoxyadenosine analogues. *Arch Biochem Biophys* 1966;113 (2):383-88.

45. Hirschhorn R, Yang DR, Israni A. An Asp8Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA 2 allozyme): occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Ann Hum Genet* 1994;58(Pt 1):1-9.
46. Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev* 1998;161: 27-42.
47. Curto R, Voit EO, Sorribas A, Cascante M. Validation and steady-state analysis of a power-law model of purine metabolism in man. *Biochem J* 1997;324(pt 3):761-775.
48. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshihara M, Caldwell C, et al. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22:657–82.
49. Haskó G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 2004;25 (1):33-39.

50. Sitkovsky MV, Ohta A. The 'danger' sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 2005;26 (6):299-304.

51. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in down-regulation of inflammation and protection from tissue damage [Carta]. *Nature* 2001;414:916–20.

52. Haskó G, Kuhel DG, Chen JF, Schwarzschild MA, Deitch EA, Mabley JG, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 2000;14 (13):2065–74

53. Németh ZH, Lutz CS, Csóka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 2005;175 (12):8260–70.

54. Arch JRS, Newsholme EA. The control of the metabolism and the hormonal role of adenosine. *Essays Biochem* 1978;14:182-183.

55. Dixon AK, Gubitzi AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 1996;118 (6):1461-8.
56. Richardson PJ. Blocking adenosine with antisense. *Nature* 1997;385 (6618):684-5.
57. Levy O, Coughlin M, Cronstein BN, Roy RM, Desai A, Wessels MR. The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J. Immunol* 2006;177 (3):1956-66.
58. Bottini E, Carapella E, Cataldi L, Nicotra M, Lucarelli P, Lucarini N et al. Adenosine deaminase polymorphism: Associations at clinical level suggest a role in cell functions and immune reactions. *J Med Genet* 1981;18 (5):331-4.
59. Bottini E. Interaction between adenosine deaminase and ABO system polymorphisms: effects on intrauterine survival and reproduction. *Exp Clin Immunogenet* 1985;2 (2):70-6.

60. Lepore A, Lucarini NM, Evangelista MA, Palombaro G, Londrillo A, Ballarim P et al. Enzyme variability and neonatal jaundice. The role of adenosine deaminase and acid phosphatase. *J Perinat Med* 1989;17 (3):195-201.

61. Hershfield MS, Kredich NM, Ownby DR, Ownby H, Buckley R. In vivo inactivation of erythrocyte S-adenosyl homocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine in adenosine deaminase-deficient patients. *J Clin Invest* 1979;63 (4):807-11.

62. Siaw MFE, Mitchello BS, Koller CA, Coleman MS, Hutton JJ. ATP depletion as a consequence of adenosine deaminase inhibition in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77 (10):6157-61.

63. Benveniste P, Cohen A. p53 expression is required for thymocyte apoptosis induced by adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92 (18):8373-77.

64. Hirschhorn R. Adenosine deaminase deficiency: Molecular basis and recent developments. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76 (3 Pt 2):219-27.

65. Cordero OJ, Salgado FJ, Fernández-Alonso CM, Herrera C, Lluís C, Franco R et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001;70 (6):920-30.
66. Yoneyama Y, Sawa R, Suzuki S, Miura A, Kobayashi H, Doi D, et al. Regulation of plasma adenosine deaminase levels in normal pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53 (2):71-4.
67. Baganha MF, Pêgo A, Lima MA, Gaspar EV, Cordeiro AR. Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic populations. *Chest* 1990;97 (3):605-10.
68. Ungerer JPJ, Oosthuizen HM, Blssbort SH, Vermaak JHW. Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic Application. *Clin Chem* 1992;38 (7):1322-26.
69. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J* 1996;9 (4):632–3.

70. Apasov SG, Sitkovsky MV. The extracellular versus intracellular mechanisms of inhibition of TCR-triggered activation in thymocytes by adenosine under conditions of inhibited adenosine deaminase. *Int Immunol* 1999;11 (2):179–89.
71. Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* 1993;261 (5120):466-9.
72. Blackburn MR, Volmer JB, Thrasher JL, Zhong H, Crosby JR, Lee JJ, et al. Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *J Exp Med* 2000;192 (2):159-70.
73. Hershfield MS, Mitchell BS. Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AI, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill; 2006. p. 2585-625.

74. Hirschhorn R. Immunodeficiency disease due to deficiency of adenosine deaminase. In: Ochs HD, Smith CIE, Puck JM, editors. Primary Immunodeficiency Diseases: A molecular and genetic approach. New York: Oxford University Press; 1999. p. 121-39.

75. Vihinen M, Arredondo-Vega FX, Casanova JL, Etzioni A, Giliani S, Hammarstrom L et al. Primary immunodeficiency mutation databases. *Adv Genet* 2001;43:103-88.

76. Hershfield M. Adenosine deaminase deficiency. *Gene Reviews* [periodico na Internet]. 2009 Jul [acesso em 2010 Jul 10]; [aproximadamente 17 p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=ada>.

77. Weissmann J, Vollmer M, Pribilla O. Survey of the distribution of adenosine deaminase and superoxide dismutase markers in different populations. *Hum Hered* 1982;32 (5):344–56.

78. Battistuzzi G, Ludicone P, Santolamazza P, Petrucci R. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and in lymphocytes. *Ann Hum Genet* 1981;45(pt1):15–9.

79. Bottini N, Gloria-Bottini F, Amante A, Saccucci P, Bottini E. Genetic polymorphism and Th1/Th2 orientation. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;138 (4):328–33.
80. Hirschorn R, Candotti F. Immunodeficiency due to defects of purine metabolism. In: Ochs H, Smith C, Puck J, eds. *Primary immunodeficiency diseases*. Oxford, England: Oxford University Press; 2006. p.169-96.
81. Spencer N, Hopkinson A, Harris H. Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 1968;32:9-14.
82. Lee SJ, Hwang HS, Kim BNR, Kim MA, Lee JW, Park YW et al. Changes in serum adenosine deaminase activity during normal pregnancy. *J Korean Med Sci* 2007;22 (4):718-21.
83. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15 (3):713-8.

84. Nicotra M, Bottini N, Grasso M, Gimelfarb A, Lucarini N, Cosmi E, et al. Adenosine deaminase and human reproduction: A comparative study of fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 1998;39 (4):266-70.
85. Nicotra M, Bottini N, La Torre M, Amante A, Bottini E, Gloria-Bottini F. Repeated spontaneous abortion. Cooperative effects of ADA and ACP1 genetic polymorphisms. *Am J Reprod Immunol* 2007;58 (1):1–10.
86. Safranow K, Rzeuski R, Binczak-Kuleta A, Czyzycka E, Skowronek J, Jakubowska K, et al. ADA*2 Allele of the Adenosine Deaminase Gene may protect against coronary artery disease. *Cardiology* 2007;108 (4):275–81.

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

Parecer n.º 308/2008

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo n.º 3120/2008 sob a responsabilidade de Luiz Carlos de Mattos com o título "Efeito cooperativo das incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO e do gene ADA (20q13.11) no aborto espontâneo recorrente" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 11 de agosto de 2008.

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CEP/FAMERP

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Conselho Nacional de Saúde - Resolução CNS 196/96)



Vocês estão sendo convidados a participar de uma pesquisa denominada “Efeito cooperativo das incompatibilidades pelo sistema histo-sangüíneo ABO e do gene ADA (20q13.11) no aborto espontâneo recorrente.” O aborto espontâneo recorrente resulta de fatores complexos tais como as alterações dos cromossomos, dos hormônios, do útero e também genéticas. Alguns desses fatores agem de forma conjunta aumentando o risco de ocorrência de aborto espontâneo recorrente.

Essa pesquisa tem como objetivos identificar os tipos sangüíneos ABO e o polimorfismo (variação genética) do fator genético ADA (Adenosina Deaminase) em casais com e sem história de aborto espontâneo recorrente. Os resultados dessa pesquisa poderão ajudar na compreensão dos fatores genéticos que aumentam o risco de aborto espontâneo recorrente.

A vossa participação nessa pesquisa é voluntária e de extrema importância e vocês não perderão os benefícios do atendimento médico aos quais tem direito, caso decidam não participar ou mesmo se retirarem dessa pesquisa a qualquer momento.

Para participar como voluntários nessa pesquisa será necessário:

1. Vocês responderem um questionário sobre suas histórias de gravidez normal ou de aborto espontâneo recorrente. Todas as informações prestadas serão mantidas em absoluto sigilo.
2. Vocês nos autorizarem a colher amostras de sangue de vocês e de seus recém-nascidos (quando for o caso) para exames de identificação dos tipos sangüíneos ABO e do fator genético ADA.
3. A coleta de sangue é realizada com a introdução de uma agulha estéril na veia e de acordo com a sensibilidade, vocês poderão sentir uma leve ardência no local.
4. A coleta de sangue de seus recém-nascidos será realizada com a introdução de uma agulha estéril diretamente no cordão umbilical, logo após o nascimento, não havendo assim necessidade de se realizar punção venosa em outras partes do corpo.

5. O risco da coleta de sangue poderá incluir vermelhidão e raramente deixa o local de introdução da agulha inchado e com manchas roxas.
6. A amostra de seu sangue e também do seu recém-nascido será utilizada apenas para análises científicas.
7. Vocês devem ser informados que não haverá riscos de qualquer tipo de contaminação durante a coleta de seu sangue, pois o material utilizado será individual e não contaminado. Esse material é totalmente estéril (seringa, agulha, algodão com álcool) e único para cada pessoa. Após a coleta de seu sangue, as agulhas, seringas e algodão utilizados serão colocados em saco de lixo e descartado em local seguro.

Vocês serão informados de todos os resultados dos exames que serão realizados em seu sangue e no de seu recém-nascido e eles serão mantidos em absoluto sigilo. Se essa pesquisa for encerrada antes do período previsto, vocês também serão informados.

Se vocês tiverem qualquer dúvida sobre essa pesquisa ou mesmo sobre lesões relacionadas à coleta de sangue, entre em contato com Dr Luiz Carlos de Mattos pelo telefone ou pelo endereço abaixo indicados. Caso vocês tenham quaisquer dúvidas sobre seus direitos como sujeito de pesquisa, vocês também poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pelo telefone (17) 3201-5813.

Vocês receberão uma cópia deste formulário de consentimento livre e esclarecido assinado e datado.

Declaração do sujeito da pesquisa

Nós voluntariamente aceitamos participar da pesquisa “Efeito cooperativo das incompatibilidades pelo sistema histo-sangüíneo ABO e do gene ADA (20q13.11) no aborto espontâneo recorrente.” **Esta declaração de consentimento livre e esclarecido foi por nós lida e suas explicações entendidas. Entendemos que podemos retirar nosso consentimento ou retirar-nos dessa pesquisa a qualquer momento sem perder nenhum benefício aos quais temos direito.**

....., de de

Assinatura da mulher como sujeito da
pesquisa

Assinatura do homem como sujeito da
pesquisa

Assinatura do responsável pelo recém-nascido

Responsável pela discussão do termo de consentimento livre e esclarecido

Endereço para contato:

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Biologia Molecular - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - São José do Rio Preto – 15090-000 –

Fone: (17) 3201- 5854

Anexo 3 – Formulário de Dados Clínicos



Formulário de Dados Clínicos



Projeto AER x ABO x ADA

Código do projeto ADA-ABO:	Data da coleta dos dados:
-----------------------------------	----------------------------------

G	P	A	Idade	DN
---	---	---	-------	----

1ª Gestação				
Idade da mãe à época do aborto:			IG abortamento	
Uso de medicamento:				
Sim: Quais			Não	
Tipo de aborto		Espontâneo ()		Retido ()

2ª Gestação				
Idade da mãe à época do aborto:			IG abortamento	
Uso de medicamento:				
Sim: Quais			Não	
Tipo de aborto		Espontâneo ()		Retido ()

3ª Gestação				
Idade da mãe à época do aborto:			IG abortamento	
Uso de medicamento:				
Sim: Quais			Não	
Tipo de aborto		Espontâneo ()		Retido ()

Filhos com mal formação	
História pregressa de cirurgia pélvica	
Partos anteriores (tipo)	

História de doenças pregressas	Sim	Não
Diabetes		
Hipertensão arterial		
Ovário policístico		
Mal formação uterina		
Lúpus eritematoso sistêmico		
SAAF		
Citomegalovírus		
Anemias hereditárias		
IIC		

Anexo 4 - Resumo apresentado em forma de pôster durante o XII ECIF – Encontro Científico da FAMERP & VI CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e 1ª Mostra das Ligas Acadêmicas da FAMERP. São José do Rio Preto, SP, 2009.

Associação entre as incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO e o aborto espontâneo recorrente

Daniela P. T. Nunes¹, Lígia C. J. F. Spegiorin², Ana Iara C. Ferreira¹, Cinara C. B. Mattos¹, Eloísa A. Galão², Denise C. V. Oliani², Antonio H. Oliani², Luiz C. de Mattos¹

¹Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular;
²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – FAMERP

Fonte de Financiamento: Bolsa BAP 2008/2009

Introdução

As incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO e o polimorfismo Taq I do gene *ADA* foram apontadas como fatores de risco para o aborto espontâneo recorrente (AER) em mulheres européias.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi verificar se as incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO e o polimorfismo Taq I do gene *ADA* em casais estão associadas à história de AER.

Métodos

Foram selecionados dois grupos de casais um com (N=57) e outro sem (N=60) história prévia de pelo menos três AER, atendidos no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina São José do Rio Preto - FUNFARME. Uma amostra de sangue periférico foi colhida para a fenotipagem eritrocitária do sistema histo-sanguíneo ABO com o uso do método hemaglutinação ativa direta e reversa. O polimorfismo Taq I do gene *ADA* foi identificado por PCR-RFLP a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico. As frequências dos fenótipos eritrocitários ABO e do polimorfismo Taq I em ambos os grupos de casais foram comparadas com o uso do teste exato de Fisher, aceitando-se o erro alfa de 5%.

Resultados

As frequências de incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO foram iguais a 26,3% (15/57) e 7,7% (4/60) para os casais com e sem história prévia de AER, respectivamente ($p=0,0295$; OR 3.124; IC 95%: 1.148-8.997) mas as frequências dos genótipos e alelos Taq I do gene *ADA* foram semelhantes em ambos os grupos ($p=0,2$).

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que as incompatibilidades pelo sistema histo-sanguíneo ABO, mas não o polimorfismo Taq I do gene *ADA*, estão associadas à história prévia de AER.

Anexo 5 - Resumo de Projeto apresentado em forma de pôster durante o XII ECIF – Encontro Científico da FAMERP & VI CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e 1ª Mostra das Ligas Acadêmicas da FAMERP. São José do Rio Preto, SP, 2009.

Alelos ADA*01 e ADA*02 do gene Adenosina Deaminase (ADA) em mulheres com e sem histórico de aborto espontâneo recorrente.

Antonio H. Oliani¹, Denise C. V. Oliani¹, Lígia C. J. F. Spegorin¹, Eloísa A. Galão¹, Daniela P. T. Nunes², Luiz C. de Mattos²

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, ²Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular - FAMERP

Fonte de Financiamento: Bolsa BAP 2009/2010

Introdução

O polimorfismo do gene Adenosina Deaminase (20q13.11) resultante dos alelos ADA*01 e ADA*02 foi recentemente apontado como fator de risco para o aborto espontâneo recorrente (RSA) em mulheres europeias. A presença do *background* genético europeu na população brasileira desperta a atenção para a investigação deste marcador de risco em nosso meio.

Objetivos

O objetivo geral deste projeto é verificar se há associação entre o polimorfismo do gene ADA e o RSA em mulheres brasileiras. Seus objetivos específicos compreendem: 1. Determinar as freqüências dos alelos ADA*01 e ADA*02 em dois grupos de mulheres, um sem e outro com histórico de RSA; 2. Verificar se estes alelos associam-se ao RSA.

Métodos

Serão analisadas amostras de DNA genômico de casais previamente selecionados por ginecologistas e obstetras do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Base da Fundação Faculdade Regional de Medicina São José do Rio Preto – FUNFARME, sem e com história de RSA. A identificação dos alelos ADA*01 e ADA*02 será feita pelo método PCR-RFLP e suas freqüências serão comparadas com o uso do método Qui-quadrado, aceitando-se o erro alfa de 5%.

Resultados Esperados

Nossa hipótese é que os alelos ADA*01 e ADA*02 do gene ADA estão associados ao RSA na casuística brasileira.

Anexo 6 - Resumo apresentado em forma de pôster durante o X Workshop de Genética e IX Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Distrito de Rubião Júnior, SP, 2010.

ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE: NÃO ASSOCIAÇÃO COM POLIMORFISMO G22A DO GENE ADA

Daniela Prudente Teixeira Nunes
Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
daniptnunes@gmail.com

Lígia Cosentino Junqueira Franco Spegiorin
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/Hospital de Base - FUNFARME

Cinara de Cássia Brandão de Mattos
Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Antonio Hélio Oliani
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/Hospital de Base - FUNFARME

Denise Cristina Mós Vaz Oliani
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP/Hospital de Base - FUNFARME

Luiz Carlos de Mattos
Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
luiz.carlos@famerp.br

O abortamento espontâneo recorrente (AER) é definido pela ocorrência de pelo menos dois abortamentos espontâneos sucessivos e depende de diferentes fatores. Dentre eles encontram-se os de natureza imune que podem ser influenciados pelo nível de expressão das enzimas envolvidas na ativação, ampliação e manutenção da resposta imune materna contra o conceito. A adenosina deaminase (ADA), uma enzima codificada pelo gene *ADA* (20q13.11), atua no metabolismo da adenosina e influencia a resposta imune adaptativa. O polimorfismo G22A do gene *ADA* origina os alelos co-dominantes *ADA*01* e *ADA*02* e influencia o nível de expressão da enzima ADA.

Recentemente, o alelo *ADA*02* foi associado ao menor risco de AER em mulheres européias. O objetivo deste estudo foi investigar se o polimorfismo *G22A* do gene *ADA* está associado ao AER em mulheres brasileiras. Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parecer CEP FAMERP 308/2008), 141 mulheres atendidas no Ambulatório de Gestação de Alto risco da Funda o Faculdade Regional de Medicina/Hospital de Base (FUNFARME) foram selecionadas para a composi o de dois grupos: G1 com histórico de AER (N=82) e G2 sem histórico de AER (N=59). De cada participante foram coletados 5 mL de sangue periférico para extra o do DNA genômico com o uso kit comercial (PureLink Invitrogen). O polimorfismo *G22A* do gene *ADA* foi identificado com o uso do método PCR-RFLP, por meio da amplifica o de um fragmento de 397 pares de bases (pb) do exon 1. Após a digestão com a enzima *TaqI*, o produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% para a identifica o dos alelos *ADA*01* (245 e 152 pb) e *ADA*02* (397 pb) e dos genótipos *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02*. Os genótipos e alelos foram comparados em ambos os grupos com o uso do teste exato de Fisher, aceitando-se o erro alfa de 5%. As frequências dos genótipos *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02* em G1 foram iguais a 91,46% (75/82), 8,54% (7/82) e 0%; em G2 foram iguais a 89,83% (53/59), 8,47% (5/59) e 1,70% (1/59), respectivamente ($p=0,4966$). As frequências dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* em G1 foram iguais a 95,73% e 4,27%; em G2 foram iguais a 94,07% e 5,93%, respectivamente ($p=0,5845$; OR=0,70; IC 95%: 0,2411-2.073). O polimorfismo *G22A* do gene *ADA* não está associado ao AER na casuística analisada.   possível que a baixa frequência do alelo *ADA*02* na popula o brasileira e seu efeito na expressão da *ADA* não influencie a intera o materno-fetal e não contribua para o AER em mulheres brasileiras.

APOIO: BAP/FAMERP 2009-2010, CAPES-DS

NÍVEL: Pós-Gradua o

ÁREA: Imunogenética (2.11.03.00-3)

Anexo 7 - Resumo apresentado e premiado em **1º LUGAR** em forma de pôster durante a IV Jornada de Ginecologia e Obstetrícia da SOGESP – Região Noroeste / Sudoeste, Centro de Convenções UNIP, São José do Rio Preto, SP, 2010.

AUSÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ABORTO ESPONTÂNEO RECORRENTE E POLIMORFISMO *TaqI* DO GENE *ADA*

Nunes DPT¹, Oliani AH², Oliani DCMV², Spejorin LCJF², Brandão de Mattos CC¹, Mattos LC¹

1* - Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

2 - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

* Laboratório de Imunogenética Departamento de Biologia Molecular – FAMERP – Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 - 15090-000 - São José do Rio Preto - SP

e-mail: luiz.carlos@famerp.br

Introdução: Fatores imunológicos são frequentemente associados ao aborto espontâneo recorrente (RSA). A adenosina deaminase (ADA), uma enzima codificada pelo gene *ADA* (20q13.11) influencia a resposta imune adaptativa. O polimorfismo *TaqI* resultante da substituição G22A, além de originar os alelos *ADA*1* e *ADA*2*, respectivamente, influencia o nível de expressão da enzima ADA e tem sido apontado como fator de risco para o RSA. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo *TaqI* do gene *ADA* e o RSA. **Metodologia:** Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido, foram coletados dados epidemiológicos e amostras de sangue periférico de cento e trinta e quatro mulheres. Dois grupos foram compostos: G1 com e G2 sem histórico de RSA. O DNA genômico foi extraído por meio de

kit comercial e o polimorfismo *TaqI* do gene *ADA*, identificado pelo método PCR-RFLP. As frequências do polimorfismo *TaqI* foram comparadas em ambos os grupos com o uso do teste exato de Fisher ($p < 0,05$). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP sob o Parecer 308/2008. **Resultados:** As frequências dos genótipos *ADA*1/1*, *ADA*1/2* e *ADA*2/2* foram iguais a 90,91%, 9,09% e 0% para o G1 e 89,48%, 8,77% e 1,75% para G2, respectivamente ($p = 0,5061$). As frequências dos alelos *ADA*1* e *ADA*2* foram iguais a 95,4% e 4,6% em G1 e 93,8% e 6,2% no G2 ($p = 0,58$) **Conclusão:** O polimorfismo *TaqI* do gene *ADA* não está associado ao RSA. APOIO: BAP-FAMERP 2009-2010, CAPES DS.

Anexo 8 - Resumo apresentado em forma de pôster durante o VII CAIC – Congresso Anual de Iniciação Científica e 2ª Mostra das Ligas Acadêmicas da FAMERP. São José do Rio Preto, SP, 2010

Alelo ADA*02 do gene ADA (20q13.11) e abortamento espontâneo recorrente: ausência de associação

Antonio H Oliani^{1,2}; Daniela PT Nunes³; Lígia CJF Spegiorin^{1,2}; Cinara C Brandão de Mattos³; Denise CMVaz Oliani^{1,2}; Luiz C de Mattos³

1 - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP; 2 - Ambulatório de Gestação de Alto Risco – FUNFARME; 3 - Laboratório de Imunogenética, Departamento de Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP;

Fonte de financiamento: BAP-FAMERP 2009/2010; Bolsa de Doutorado CAPES-DS

Introdução: A adenosina deaminase (ADA), uma enzima codificada pelo gene *ADA* (20q13.11), atua no metabolismo da adenosina e modula a resposta imune. O polimorfismo G22A deste gene origina os alelos co-dominantes *ADA*01* e *ADA*02* e influencia o nível de expressão da enzima ADA, que aparentemente possui papel fundamental na manutenção da gestação. O fenótipo ADA 2 tem sido associado a um efeito protetor contra o abortamento espontâneo recorrente (AER) em mulheres caucasianas européias. **Objetivo:** Investigar se o polimorfismo G22A do gene *ADA* se associa à ocorrência de AER em brasileiras. **Materiais e Métodos:** Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Parecer CEP FAMERP 308/2008), 292 mulheres foram selecionadas para compor dois grupos: G1 com histórico de AER (N=115) e G2 sem histórico de AER (N=177). O DNA genômico foi extraído a partir de sangue periférico com o uso kit comercial. O polimorfismo G22A do gene *ADA* foi identificado com o uso do método PCR-RFLP. **Resultados:** As frequências dos genótipos *ADA*01;*01*, *ADA*01;*02* e *ADA*02;*02* foram semelhantes entre os grupos e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,7170$; $\chi^2 = 0,6653$; GL = 2). As frequências dos alelos *ADA*01* e *ADA*02* em G1 foram iguais a 95,6% e 4,4%; em G2, 94,9% e 5,1%, respectivamente ($p=0,8433$; OR=1,179; IC 95%: 0,5340-2.601). **Conclusão:** Os resultados sugerem que os alelos *ADA*01* e *ADA*02* do gene *ADA* não estão associados ao AER. É possível que a redução nos níveis da ADA resultantes do alelo *ADA*02* não apresente um efeito protetor contra o AER em brasileiras.

Palavras-chave: Adenosina deaminase, abortamento espontâneo recorrente, polimorfismo do gene *ADA*.