

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Epidemiologia molecular: polimorfismos genéticos da enzima metilenotetraidrofolato redutase e suas relações com o aborto espontâneo

Otávio Martins Cruz

Pelotas, 2012

OTÁVIO MARTINS CRUZ

**Epidemiologia molecular: polimorfismos genéticos da
enzima metilenotetraidrofolato redutase e suas relações
com o aborto espontâneo**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências (área do
conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Tiago Veiras Collares

Co-Orientadora: Isabel Oliveira de Oliveira

Pelotas, 2012.

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C957e Cruz, Otávio Martins

Epidemiologia molecular: polimorfismos genéticos da enzima metilenotetraidrofolato redutase e suas relações com o aborto espontâneo / Otávio Martins Cruz. – 57f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador Tiago Veiras Collares ; co-orientador: Isabel Oliveira de Oliveira.

1.Biotecnologia. 2.Polimorfismo. 3.MTHFR. 4.Aborto espontâneo. I.Collares, Tiago Veiras. II.Oliveira, Isabel Oliveira de. III.Título.

CDD:618.33

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (UFPel)

Prof^a. Dr^a Ana Paula Nunes (UFPel)

Prof^a. Dr^a Sibeles Borsuk (UFPel)

Dr^a Helena Strelow Thurow (UFPel)

Dedico este trabalho aos meus pais

Fábio e Eliane

*“Mudam-se os tempos, mudam-se as vontades,
Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades”.*

(Luís de Camões)

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Ao meu orientador, Tiago Collares, por ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação e pelas contribuições ao longo deste período.

A minha co-orientadora, Isabel Oliveira de Oliveira, pelo incentivo, sinceridade, paciência, amizade e acima de tudo por ter me apresentado à ciência e mostrado que ética e profissionalismo estão acima de tudo. Obrigado Chefa!

À Professora Ana Paula Nunes, por ter me ensinado que com organização, empenho e seriedade é possível realizar qualquer trabalho. Agradeço também, pela confiança e amizade.

À Professora Fabiana Kommling Seixas, pelas sábias contribuições no decorrer dessa etapa.

À Professora Ana Lúcia Soares Chaves, por ter despertado em mim o interesse pela Biologia Molecular e por ter me oferecido oportunidades importantes ao longo da minha formação acadêmica.

Às colegas Marri, Carol e Tati, por terem auxiliado na execução deste trabalho. Agradeço em especial à Helena por ter me auxiliado na análise dos dados e na estruturação da dissertação.

Aos colegas do GPO: Eliza, Priscila, Vinícius, Duda, Karine, Virgínia, Fernando, Samuel e Cristian.

Em especial à Lizi, por ter dividido comigo todos os anseios e dúvidas durante o mestrado e acima de tudo, pela amizade construída nesse período.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Molecular, Josi, Mônica e William por serem tão competentes e por terem dedicado seus tempos à execução deste e de outros trabalhos que realizamos juntos. Obrigado por terem feito do nosso ambiente de trabalho o lugar mais descontraído e legal de estar.

À Carmem, ao Luís, à Michele e ao Fabinho, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

Ao laboratório de Genômica e Fitomelhoramento da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, pelo empréstimo do ABI 7500 Fast Real-time PCR System. Agradeço à Camila, à Naciele, à Mariana e ao Raílson por terem organizado o uso do equipamento de forma justa, sempre atendendo às necessidades de todos que o precisavam.

Aos meus amigos, Linão, Gabi, Tavares, Pilecco e Nanda, por serem os melhores amigos que alguém poderia ter e por todo o apoio e incentivo, sempre.

Às legais, Tirize, Bel e Carol, por serem minhas grandes amigas e apoiadoras.

Ao Ricardo, por me incentivar, pela companhia, pelo carinho e por ter suportado nossas intermináveis viagens ao longo desses dois anos.

A toda a minha família, pelo amor, carinho, respeito e acima de tudo por me incentivar a prosseguir, sempre.

A minha cunhada, Thamires, por dividir comigo os anseios dessa etapa e por ter me auxiliado nas análises estatísticas.

Ao meu irmão, Matheus (Teteu), por admirar quem eu sou e por simplesmente ser quem ele é. Obrigado pelo apoio!

A minha mãe, Eliane, por ser meu modelo, por me inspirar, por me amar, por me fazer ser persistente, por ser um exemplo de mulher e por saber ser M ã E.

Ao meu pai, Fábio, meu grande incentivador, pelo carinho, amor, respeito, confiança e por nunca duvidar de que todos os esforços valeriam a pena. Obrigado por ter insistido que este era o melhor caminho!

À CAPES pelo auxílio financeiro.

E a todos (as) que de uma forma ou de outra participaram desse processo, **MUITO OBRIGADO!**

“A persistência é o menor caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

CRUZ, Otávio Martins. **Epidemiologia molecular: polimorfismos genéticos da enzima metilenotetraidrofolato redutase e suas relações com o aborto espontâneo** 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O aborto espontâneo (AE) é caracterizado como a perda do produto fetal antes de 20 semanas de gestação e sua etiologia não é completamente esclarecida. Inúmeros estudos têm demonstrado que polimorfismos no gene da enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) estão envolvidos na susceptibilidade ao AE. Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os polimorfismos 677C>T e 1298A>C do gene da MTHFR e suas associações na susceptibilidade ao aborto espontâneo em uma amostra de mulheres do Sul do Brasil em uma abordagem de caso-controle. Noventa e oito mulheres com AE (casos) e duzentas e vinte sete mulheres saudáveis e sem histórico de aborto espontâneo (controles) foram estudadas. A genotipagem dos polimorfismos MTHFR677C>T e MTHFR1298A>C foi analisada através da técnica de discriminação alélica com uso de sondas pré-desenhadas TaqMan® por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que não houve diferença na distribuição das frequências dos alelos e dos genótipos dos SNPs MTHFR677C>T e MTHFR1298A>C entre os casos e o grupo controle. Foi observado um aumento do risco de AE em relação ao genótipo MTHFR1298CC quando comparado ao genótipo MTHFR1298AA (RR: 1,13 95%IC: 1,04; 1,23; p=0.02). Além disso, a classificação do tipo de aborto é diferente entre os genótipos do polimorfismo MTHFR1298A>C (p = 0,03). No grupo controle, mulheres não-carreadoras do alelo 677T apresentam um maior número de gestações do que mulheres 677T (p = 0,04). Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o genótipo CC do polimorfismo MTHFR1298A>C é associado ao aumento do risco do AE, entretanto, em nossa população, o polimorfismo MTHFR677C>T não está envolvido na ocorrência do aborto espontâneo.

ABSTRACT

CRUZ, Otávio Martins. **Molecular epidemiology: genetic polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase enzyme and its relationship with miscarriage**. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The spontaneous abortion (SA) is characterized as a loss of fetal product before 20 weeks of gestation and its etiology has not completely understood. Numerous studies have shown that polymorphisms in the gene of the enzyme metilenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) are involved in susceptibility to AE. Then, the present study was conducted to evaluate the polymorphisms 677C>T and 1298A>C MTHFR gene and their associations in susceptibility to spontaneous abortion in a sample of women in the South of Brazil in a case-control approach. Ninety-eight women with SA (cases) and two hundred and twenty-seven healthy women with no history of miscarriage (controls) were studied. Genotyping of MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C polymorphisms were analyzed by allele discrimination with TaqMan® pre-designed probes in Real Time PCR. The results showed that there was not difference in the distribution of allelic and genotypes frequencies of MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C SNPs between cases and control group. It was observed an increase in the risk of SA in relation to genotype MTHFR1298CC when compared to genotype MTHFR1298AA (RR: 1,13 95%CI: 1,04; 1,23; p=0.02). Moreover, the classification of the type of abortion is different between genotypes of MTHFR1298A>C polymorphism (p = 0.03). In the control group, non-electron carriers of 677T allele have a higher number of pregnancies than women 677T (p = 0.04). The results presented in our work suggests that the CC genotype of polymorphism MTHF1298A > C is associated with increased risk of SA. However, the polymorphism MTHFR677C>T is not involved in the occurrence of miscarriage in studied population.

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

A – *Adenina*

C – *Citosina*

DNA – *Ácido desoxirribonucleico*

DM – *Diabetes Mellitus*

EDTA - *Ácido etilenodiamino tetra-acético*

G – *Guanina*

HAPMAP – *Mapa de Haplótipos*

HCG – *Gonadotrofina Coriônica Humana*

MTHFR – *Metilenotetrahidrofolato redutase*

PCOS – *Síndrome dos Ovários Policísticos*

PCR – *Reação de Cadeia de Polimerase*

RNA – *Ácido ribonucleico*

SNP – *Polimorfismo de Nucleotídeo Único*

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.2. ABORTO ESPONTÂNEO.....	14
1.3. EPIDEMIOLOGIA DO ABORTO ESPONTÂNEO.....	17
1.4. METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO.....	18
1.5. ENZIMA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE, FOLATO E HOMOCISTEÍNA.....	19
1.6. POLIMORFISMOS MTHFR 677C>T E 1298A>C E O ABORTO ESPONTÂNEO.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. HIPÓTESE.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
5. ARTIGO.....	25
ABSTRACT.....	27
INTRODUCTION.....	28
MATERIALS AND METHODS.....	30
RESULTS.....	33
DISCUSSION.....	35
REFERENCES.....	38
TABLES.....	42
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS.....	49

8. INTRODUÇÃO

8.1. Introdução Geral

O Projeto Genoma Humano permitiu a identificação da sequência de bases que constitui o DNA possibilitando a constatação de que indivíduos diferentes compartilham 99,9% dessa sequência. Sendo assim, as diferenças fenotípicas e a susceptibilidade a doenças em cada uma das pessoas dizem respeito a apenas 0,1 % da variação na sequência do DNA. É, portanto, nesta pequena porcentagem que residem os chamados polimorfismos genéticos (THE INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2004). Como consequência, o Projeto HapMaP (Haplotype Map) buscou determinar o padrão mais comum de variação da sequência de DNA, detectando a existência de mais de 10.000.000 polimorfismos de base única (SNPs) (IHGSC, 2004).

A grande maioria destes SNPs é representada por dois alelos, em que um é substituído pelo outro. Estes polimorfismos quando estão presentes em regiões codificadoras do gene, podem alterar a sequência de aminoácidos, possivelmente, modificando a estrutura da proteína (BOTSTEIN, RISCH, 2003). Podem, também, estar presentes em regiões promotoras dos genes modulando o controle da transcrição gênica; em regiões intrônicas, modulando a estabilidade proteica; em sítios de *splicing*, sítios em que ocorre a eliminação dos íntrons e união dos éxons; ou, ainda, em regiões intragênicas. Além disso, SNPs podem estar envolvidos na susceptibilidade a doenças ou no seu desenvolvimento. (BETTICHER et al., 1995; LIN et al., 2003).

Dessa forma, estudos da associação de polimorfismos de base única com doenças complexas, podem contribuir para que se identifiquem novos marcadores moleculares, os quais podem vir a ser aplicados no diagnóstico e prognóstico das mais diversas patologias (THUROW et al., 2011), entre elas o aborto espontâneo (ZETTERBERG et al., 2003; ZETTERBERG, 2004; MTIRAOU et al., 2006; CALLEJON et al., 2007; MAYOR-OLEA et al., 2008; RODRIGUEZ-GUILLEN et al., 2009; POPP et al., 2012).

A seguir serão apresentados os tópicos relativos à definição de aborto espontâneo, suas principais causas e a epidemiologia da doença. Será abordado também, o papel da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) no metabolismo do ácido fólico e, a relação estabelecida, até o momento, entre os polimorfismos 677C>T e 1298A>C da MTHFR e o aborto espontâneo.

1.2. Aborto Espontâneo (AE)

O aborto espontâneo é definido como a perda do produto fetal antes de 20 semanas de gestação (CHAN et al., 2010). A etiologia do AE é variada (Figura.1), sendo que aspectos anatômicos, endócrinos, imunológicos, infecciosos e genéticos já foram caracterizados como algumas de suas principais causas (FORD; SCHUST, 2009, WU et al., 2012). Entretanto, aproximadamente 50% dos casos de AE ainda não têm sua etiologia estabelecida (WU et al., 2012).

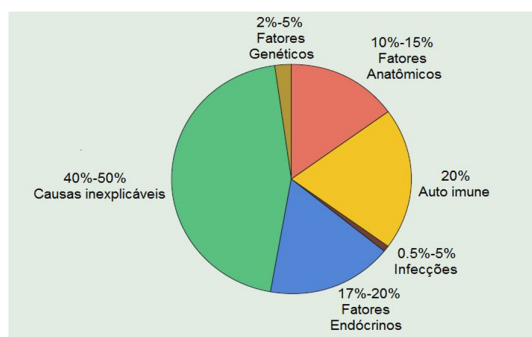


Figura.1 – Etiologia do Aborto Espontâneo (FORD; SCHUST, 2009)

1.2.1. Aspectos Anatômicos e o Aborto Espontâneo

Em relação aos aspectos anatômicos que podem causar o aborto espontâneo, foi estabelecido que malformações uterinas, pólipos uterinos, sinéquias, miomatose uterina e incompetência istmo cervical contribuem, significativamente, para a ocorrência da doença (CAETANO et al., 2006).

Cabe destacar, que algumas alterações anatômicas são mais relacionadas com perdas gestacionais tardias (durante o segundo trimestre) ou trabalho de parto prematuro, como por exemplo, incompetência istmo-cervical e miomatose uterina (HARGER et al., 1983; STRAY-PEDERSEN, STRAY-PEDERSEN , 1984). As anomalias citadas podem interromper o suprimento vascular ao endométrio e, por isso, aumentar a predisposição ao aborto espontâneo (FORD; SCHUST, 2009)

1.2.2. Causas Endócrinas e o Aborto Espontâneo

Insuficiência do corpo lúteo, síndrome dos ovários policísticos (PCOS, polycystic ovary syndrome), Diabetes Mellitus (DM), doenças da tireóide e hiperprolactinemia estão entre as principais desordens endócrinas envolvidas na etiologia do aborto espontâneo (GLUECK et al., 2002).

Entende-se por insuficiência do corpo lúteo a produção inadequada de progesterona luteínica e a maturação endometrial insuficiente para a formação da placenta (FORD; SCHUST, 2009). Alguns estudos observaram aumentos anormais de hormônio luteinizante e de androgênios, ambos associados à insuficiência do corpo lúteo, em pacientes com aborto espontâneo, o que sugere que estas anormalidades hormonais podem levar ao envelhecimento prematuro do oócito, além de retardar a maturação endometrial (WATSON et al., 1993; BUSSEN et al., 1999). Apesar do conhecimento acumulado, o verdadeiro papel dessa desordem na ocorrência do AE ainda é controverso.

Em relação à síndrome dos ovários policísticos (PCOS), estudos têm demonstrado que 40% de mulheres diagnosticadas com aborto espontâneo apresentam quadro de PCOS (RAI et al., 2000).

Outras desordens endócrinas envolvidas na etiologia do AE são a Diabetes Mellitus do Tipo 1, e o Hipotireoidismo (MILLS et al., 1988; KUTTEH et al., 1999; RUSHWORTH et al., 2000; VAQUERO et al., 2000).

1.2.3. O Sistema Imune e o Aborto Espontâneo

Uma área bastante estudada no intuito de esclarecer casos de aborto espontâneo é a participação do sistema imune na ocorrência dessa patologia. Neste aspecto estão envolvidos os fenômenos autoimunes e os aloimunes (MATTAR et al., 2004). O mecanismo autoimune se caracteriza pela produção, por parte do sistema imunológico materno, de auto-anticorpos que vão alterar o leito placentário e com isso determinar a perda gestacional (CLIFFORD et al., 1994; FORD; SCHUST, 2009). No fenômeno aloimunológico ocorrem distúrbios no reconhecimento dos antígenos fetais de origem paterna e/ou no desencadeamento de resposta imunológica materna moduladora e protetora (CHRISTIANSEN, 1996), culminando no aborto espontâneo.

1.2.4. Infecções e o Aborto Espontâneo

Certas infecções, incluindo as causadas por *Listeria monocytogenes* e *Toxoplasma gondii*, além da rubéola, herpes, sarampo e aquelas causadas pelo citomegalovírus, são conhecidas por predispor ao aborto espontâneo (MATTAR et al., 2004; FORD; SCHUST, 2009). Os mecanismos que levam a perda fetal por infecção podem ser explicados quando: (1) a infecção acontece diretamente no útero, no feto ou na placenta; (2) a infecção provoca insuficiência placentária; (3) a infecção refere-se à endometrite e endocervicite; (4) ocorre amnionite; ou (5) a infecção ocorre por dispositivos intrauterinos contaminados (SUMMERS et al., 1994).

1.2.5. Aspectos Genéticos e o Aborto Espontâneo

Em relação aos aspectos genéticos, a anormalidade mais frequente é a translocação no cariótipo de um dos parceiros. Outras anormalidades cromossômicas que podem ser encontradas são: mosaicismo sexual, inversão cromossômica e cromossomos em anel. Essas aberrações irão gerar embriões com cromossomopatias que evoluem para o aborto (MATTAR et al., 2004). Além disso, diversos estudos de associação de polimorfismos genéticos com o aborto espontâneo vêm sendo realizados na busca por marcadores

moleculares para o diagnóstico e prognóstico do aborto espontâneo (WU et al., 2012; LIU et al., 2010; NUNES et al., 2011; TANG et al., 2011). Em especial, o gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase, tem regiões polimórficas que têm sido estudadas com relação ao AE, uma vez que essa enzima desempenha um papel essencial no processo de desenvolvimento fetal (ZETTERBERG et al., 2003; ZETTERBERG, 2004; MTIRAOUI et al., 2006; CALLEJON et al., 2007; MAYOR-OLEA et al., 2008; RODRIGUEZ-GUILLEN et al., 2009; POPP et al., 2012).

1.3. Epidemiologia do Aborto Espontâneo

No ano de 2003, foi estimada a ocorrência de 41,6 milhões de abortos no mundo, dentre os quais, 21,9 milhões foram considerados abortos espontâneos (BENUTE et al., 2009).

No Brasil, um estudo recente apresenta uma compilação de dados referentes à pesquisa nacional sobre demografia e saúde (PNAD) realizada no em 1996. De uma amostra total de 16.451 domicílios inicialmente selecionados, 12.612 mulheres em idade fértil (15-49 anos) foram entrevistadas. Onde, desse total, 14% das mulheres referiram alguma vez ter tido exclusivamente aborto espontâneo (CECATTI et al., 2010). Observou-se também nesse estudo que a Região Sul do país apresenta 11,5% dos casos de aborto espontâneo (Tabela. 1).

Tabela.1 – Distribuição percentual de mulheres, segundo a experiência de aborto, no Brasil (Adaptado de CECATTI et al., 2010)

Experiência aborto	Região*							Total
	RJ	SP	S	CL	NE	N	C-O	
Nunca abortou	79.0	85.0	86.8	85.6	80.8	85.0	84.4	83.6
Aborto espontâneo	14.5	13.7	11.5	13.2	16.0	12.7	14.3	14.0
Aborto provocado	6.5	1.3	1.7	1.2	3.1	2.3	1.3	2.4
Total de mulheres	800	1.355	1.571	1.368	4.772	1.340	1.406	12.612
Total ponderado	1.208	2.681	2.136	1.550	3.467	614	957	12.613

*RJ (Estado do Rio de Janeiro); SP (Estado de São Paulo); S (Região Sul); C-L (Região Centro–Leste); NE (Região Nordeste); N (região Norte); C-O (Região Centro-Oeste). *p < 0,001 (estatística c2 com base no delineamento complexo)

1.4. Metabolismo do Ácido Fólico (Metabolismo de um Carbono)

O metabolismo de um carbono ou folato-dependente (Figura.3) é essencial na síntese de nucleotídeos, na síntese da metionina e para a metilação do DNA. Esse metabolismo depende de algumas enzimas que são funcionalmente polimórficas (JENNINGS et al., 2010).

Uma vez obtido a partir da dieta, o folato ou ácido fólico é reduzido à sua forma ativa, chamada tetrahidrofolato, passando a 5,10 metilenotetrahidrofolato. A partir dessa etapa ocorre uma reação mediada pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), a qual converte 5,10 metilenotetrahidrofolato à 5 metiltetrahidrofolato, a forma circulante do folato (Brandalize, 2009). O produto dessa reação são grupos metil utilizados na síntese de metionina (GOYETTE et al., 1994).

Na segunda etapa do metabolismo do ácido fólico, a enzima metionina sintase catalisa a remetilação de homocisteína à metionina. É a partir dessa reação que ocorre a síntese de S-adenosilmetionina, o doador universal de grupos metil para a metilação do DNA, proteínas, neurotransmissores e fosfolípidios (LECLERC et al., 1996). Importante destacar que a vitamina B12 atua como um cofator dessa reação.

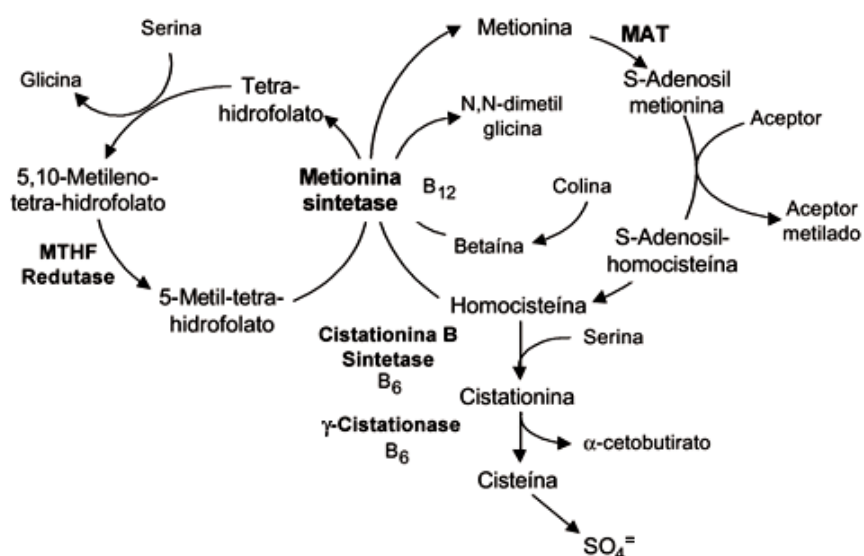


Figura.3 – Metabolismo do Ácido Fólico

1.5. Enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase, Folato e Homocisteína

A metilenotetrahidrofolato redutase é uma enzima chave no metabolismo do folato e da homocisteína. É codificada pelo gene MTHFR localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p36.32).

O folato atua em inúmeras reações de transferência de um carbono, incluindo a síntese de purinas, pirimidinas e a formação de S-adenosilmetionina. A biossíntese de purinas e pirimidinas é requisito essencial para a síntese de DNA e RNA (BAILEY et al., 1999). Tendo em vista as reações folato-dependentes, percebe-se a importância do folato para o desenvolvimento e crescimento fetal (BRANDALIZE, 2009).

Vários polimorfismos de base única ocorrem na região codificadora do gene da MTHFR, incluindo as posições 677(rs:1801133) e 1298(rs:1801131). O SNP mais estudado é o 677C>T, o qual resulta na substituição de uma alanina por uma valina no domínio catalítico da enzima. O polimorfismo 1298A>C é relativo a substituição de um glutamato por uma alanina (RODRIGUEZ-GUILLEN et al., 2009).

Estudos apontam uma atividade reduzida em torno de 35% da MTHFR em indivíduos que apresentam o genótipo CT para o polimorfismo 677C>T, enquanto aqueles que apresentam o alelo T em homozigose (TT) têm a atividade reduzida em torno de 50-70% (FROSST et al., 1995).

A função do polimorfismo 1298A>C, em relação à atividade da MTHFR, ainda não foi amplamente descrita. Entretanto, está relatado que indivíduos heterozigotos (AC) para este polimorfismo apresentam atividade enzimática semelhante aquela descrita para os heterozigotos do SNP 677C>T (VAN DER PUT et al., 1998).

Considerando a importância da metilenotetrahidrofolato redutase no desenvolvimento fetal, entende-se que a redução de sua atividade esteja

relacionada a alteração significativa do crescimento fetal, uma vez que leva a diminuição do folato e ao aumento da homocisteína na circulação. Conforme mencionado anteriormente, o folato é necessário à divisão celular devido ao seu papel na biossíntese de purinas e pirimidinas e, conseqüentemente, na formação do DNA e do RNA. Em geral, o crescimento rápido e as multiplicações celulares, aspecto central do desenvolvimento fetal, requerem um suprimento adequado de folato (FONSECA et al., 2003). Durante a gravidez, o folato interfere com o aumento dos eritrócitos, no alargamento do útero e no crescimento da placenta e do feto (SCHOLL, et al., 1996). Baixa ingestão de folato na gravidez e baixas concentrações de folato plasmático materno podem acarretar anemia megaloblástica, parto prematuro e baixo peso ao nascer (FONSECA et al., 2003). Cabe ressaltar, que estudos metabólicos apontam que a ingestão dietética de 600 µg/dia de folato mantém uma concentração normal de folato nas células vermelhas, sendo esta quantidade diária, portanto, adequada para mulheres grávidas (BAILEY, 2000).

A homocisteína (hcy) é um aminoácido não essencial encontrado na forma de produto intermediário no metabolismo da metionina (HARBOE-GONÇALVES et al., 2005). Sua concentração plasmática é influenciada tanto por fatores nutricionais, tais como a disponibilidade do folato e das vitaminas B6 e B12, quanto por fatores hereditários, especialmente ligados às enzimas do metabolismo da metionina e da cisteína (MUNIZ et al., 2006). A homocisteína é reconhecida como fator de risco independente para doenças arteriocoronarianas, doenças vasculares periféricas e trombose venosa profunda, sendo associada também à pré-eclâmpsia e risco elevado de aborto espontâneo (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2012). Neste sentido, níveis de hcy plasmática superiores a 15µmol/L foram descritos como fator de risco para a ocorrência do AE (VOLLSET et al., 2000; RONNENBERG et al., 2002).

1.6. Polimorfismos MTHFR 677C>T e 1298 A>C e o Aborto Espontâneo

As associações relatadas até o presente momento entre os polimorfismos 677C>T e 1298A>C do gene da MTHFR e o AE não são conclusivas. Alguns

estudos atribuem a esses SNPs o aumento no risco de ocorrência do AE (MTIRAOUÍ et al., 2006; CALLEJON et al., 2007; RODRIGUEZ-GUILLEN et al., 2009; POPP et al., 2012), enquanto outros não encontraram associações entre tais polimorfismos e a ocorrência da doença (ZETTERBERG et al., 2003; ZETTERBERG, 2004).

No estudo de Mtiraoui et al. (2006) os genótipos TT e CC dos SNPs MTHFR677C>T e MTHFR1298A>C, respectivamente foram associados ao aumento do risco de aborto espontâneo em mulheres da Tunísia. No trabalho de Callejon e colaboradores (2007) foi avaliado a participação dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C da MTHFR em fetos coletados a partir de curetagem em mulheres que sofreram aborto espontâneo, nesse trabalho ao avaliarem os haplótipos dos dois polimorfismos, verificaram que a maioria dos fetos apresentava quatro mutações (TTCC). Já Rodriguez-Guillen et al. (2009) estudou a associação dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C em mulheres mexicanas com aborto espontâneo, sendo seu principal achado que os genótipos TT do SNP 677C>T e o genótipo AC do SNP1298A>C aumentavam o risco de aborto espontâneo naquela população. Popp e colaboradores (2012) estudaram a relação do polimorfismo 677C>T com o aborto espontâneo recorrente em mulheres da Romênia e apontaram o genótipo TT desse polimorfismo como fator de risco para o AE.

Nos estudos de Zetterberg (2003; 2004), o autor realizou uma revisão dos estudos que envolviam os polimorfismos 677C>T e 1298A>C da MTHFR e nestes trabalhos podem ser observadas populações em que os polimorfismos em questão não representavam fatores de risco para o aborto espontâneo.

No Brasil, são escassos os estudos relacionando os polimorfismos 677C>T e 1298A>C da MTHFR com o aborto espontâneo, sendo que na região Sul nenhum trabalho com esta abordagem foi encontrado.

2. JUSTIFICATIVA

A etiologia do aborto espontâneo não é completamente esclarecida, o que permite a investigação de novos fatores relacionados a sua ocorrência. Polimorfismos de base única, embora sejam associados a um risco modesto de causar doenças complexas, constituem um alvo potencial de investigação, podendo levar a novos e importantes aspectos da patogênese de enfermidades, bem como, a habilidade na escolha de alvos para intervenções terapêuticas. A associação do polimorfismo pode ser relatada em indivíduos de uma população, mas não ser demonstrada em indivíduos pertencentes a outras populações. Tal fato se deve a variação genética das populações. Portanto, frente ao exposto, justifica-se a realização do presente estudo.

3. HIPÓTESE

A presença do alelo T em homozigose no polimorfismo 677C>T e/ou a presença do alelo C em homozigose no polimorfismo 1298A>C do gene da MTHFR aumentam a predisposição à ocorrência de aborto espontâneo.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- Investigar a associação dos polimorfismos da MTHFR, SNP677C>T e SNP1298 A>C, com a ocorrência de aborto espontâneo numa amostra de mulheres atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Católica de Pelotas na cidade de Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul.

4.2. Específicos

- Apresentar a distribuição alélica e genotípica dos SNPs 677C>T e 1298A>C da MTHFR em mulheres com aborto espontâneo e sem histórico de aborto espontâneo (grupo controle).
- Relacionar os dados de genotipagem dos SNPs 677C>T e 1298A>C da MTHFR, com variáveis biológicas, clínicas e comportamentais em mulheres com aborto espontâneo.
- Investigar a associação de haplótipos dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C da MTHFR com a ocorrência de aborto espontâneo.
- Investigar a associação das variáveis biológicas, clínicas e comportamentais com os haplótipos dos polimorfismos 677C>T e 1298 A>C da MTHFR.

5. ARTIGO

Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion in Southern Brazil

(Artigo científico escrito sob formato do periódico *Gene*)

Title

Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion in Southern Brazil

Authors

Otávio Martins Cruz^{a,b}; Tatiane Bilhalva Fogaça^{a,b}; Liziane Pereira da Silva^{a,b}; William Borges Domingues^a; Helena Strelow Thurow^{a,b}; Ana Paula Nunes^c; Fabiana Kommling Seixas^{a,b}; Isabel Oliveira de Oliveira^d; Tiago Collares^{a,b*}

^aLaboratório de Genômica Funcional, Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

^cDepartamento de Morfologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

^dDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

***Corresponding Autor**

Tiago Collares, Functional Genomics Laboratory, Technology Development Centre (CDTec), Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, 96010-900, Brazil. Fax 55-53- 32757350 – E-mail: collares.t@gmail.com

Abstract

The spontaneous abortion (SA) is characterized as a loss of fetal product before 20 weeks of gestation and its etiology has not completely understood. Numerous studies have shown that polymorphisms in the gene of the enzyme metilenotetrahydrofolate reductase (MTHFR) are involved in susceptibility to AE. Then, the present study was conducted to evaluate the polymorphisms 677C>T and 1298A>C MTHFR gene and their associations in susceptibility to spontaneous abortion in a sample of women in the South of Brazil in a case-control approach. Ninety-eight women with SA (cases) and two hundred and twenty-seven healthy women with no history of miscarriage (controls) were studied. Genotyping of MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C polymorphisms were analyzed by allele discrimination with TaqMan® pre-designed probes in Real Time PCR. The results showed that there was not difference in the distribution of allelic and genotypes frequencies of MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C SNPs between cases and control group. It was observed an increase in the risk of SA in relation to genotype MTHFR1298CC when compared to genotype MTHFR1298AA (RR: 1,13 95%CI: 1,04; 1,23; p=0.02). Moreover, the classification of the type of abortion is different between genotypes of MTHFR1298A>C polymorphism (p = 0.03). In the control group, noncarriers of 677T allele have a higher number of pregnancies than women 677T (p = 0.04) The results presented in our work suggests that CC genotype polymorphism MTHF1298A>C is associated with increased risk of SA. However, the polymorphism MTHFR677C>T is not involved in the occurrence of miscarriage in studied population.

Keywords: SNP 677C>T, SNP 1298A>C, one-carbon metabolism, miscarriage

1. INTRODUCTION

The spontaneous abortion (SA) or miscarriage is a problem of public health defined as the loss of the fetal product before twenty weeks of gestation. Lifestyle, diet, and more recently, maternal genetic characteristics have been identified as the main causes of the SA (Rodriguez-Guillen et al 2009). Hereditary thrombophilia and hyperhomocysteinemia are also considered important factors for the occurrence of SA, altering placental circulation, the development of the uterus and pregnancy outcome (Popp et al 2012). Although some studies have been conducted to identify the unknown mechanisms of the SA, the causes of this pathology can be found in only 50% of cases (Franssen et al 2005; Jauniaux et al., 2006; Lee et al., 2010).

In Brazil, the miscarriage is characterized as a major cause of maternal mortality (Cecatti et al 2010). The frequency of SA in the country, considering all types of abortion, is 14%, and thus researches about the etiology of disease becomes essential for proper investigation and control of maternal mortality (Cecatti et al 2010). Given the extent of the problem, studies relating genetic polymorphisms with human diseases may contribute in order to identify new molecular markers, which may be applied in the diagnosis and prognosis of these diseases (Thurrow et al 2011).

The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme has a crucial role in folate metabolism because it is a mediator of reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methyltetrahydrofolate, which enables the conversion of homocysteine to methionine. Any interruption in the function of this enzyme, as a decrease in the bioavailability of folate and vitamin B12, may prejudice the control of metabolism and thereby increase the concentration of homocysteine in circulation (Finkelstein, 2000).

Several single nucleotides polymorphisms (SNPs) are found in the coding region of the MTHFR gene, highlighting the 677C> T (rs:1801133) and 1298A> C (rs: 1801131), which has been widely studied in several diseases, such as cancer (Mattia and Toffoli, 2009), coronary heart disease (Tripathi et al 2010), neural tube defects (Félix et al 2004) and Down syndrome (Tayeb 2012).

The polymorphism 677C> T refers to change through the C base by the T base, resulting in the substitution of an alanine for a valine in the catalytic domain of MTHFR (Frosst et al. 1995). The T allele of SNP 677C> T was associated with reduced enzymatic activity, with the decrease of folate in serum, plasma and red blood cells, and contribute to the increase of the concentration of total plasma homocysteine (Brustolin et al 2010).

The polymorphism MTHFR 1298A>C is an exchange of the A base for the C base, wich results in substitution of a glutamate by one alanine (Van der Put et al 1998; Weisberg, et al. 1998). This polymorphism also affects the activity of MTHFR, without causing biochemical changes (Brustolin et al 2010).

It is important to note that folate acts as a coenzyme in various fundamental cellular reactions and is required for cell division because acts in the biosynthesis of purines and pyrimidines and, therefore, the formation of DNA and RNA. In general, the rapid growth and cellular multiplication, central aspect of fetal development, require an adequate supply of folate (Fonseca et al 2003). During pregnancy, folate interferes with the increase of erythrocytes, extending from the uterus and growth of the placenta and fetus (Scholl et al. 1996). Low folate intake during pregnancy and low maternal folate concentrations can cause megaloblastic anemia, premature delivery and low birth weight (Fonseca et al 2003). Furthermore, in some studies, homocysteine levels

exceeding 15 μ mol/L has been described as a risk factor for the occurrence of reproductive problems (Vollset et al. 2000; Ronnenberg et al. 2002).

Several studies has demonstrated associations between these both polymorphisms and spontaneous abortion (Zetterberg et al., 2003 , Zetteberg, 2004, Mtiraoui et al., 2006; Callejon et al., 2007, Mayor-Olea et al., 2008, Rodriguez-Guillen et al., 2009, Popp et al., 2012), however, these results still seem conflicting and inconclusive. Furthermore, studies linking these polymorphisms in women from southern Brazil were not performed.

The objective of this study was investigate the association of SNP677C>T and SNP1298A>C polymorphisms of MTHFR with the occurrence of spontaneous abortion in a sample of women treated in the Clinical Hospital of the Catholic University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, southern Brazil in case-control study.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1) Study population

This was a case-control study carried out from February 2011 to June 2012 in Pelotas, Rio Grande do Sul, a city in southern Brazil. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas and the Ethics Committee of the Catholic University of Pelotas.

A total of 98 patients with spontaneous abortion treated at the Department of Obstetrics and Gynecology, in Catholic University of Pelotas were studied. These women were invited to participate in the study and signed a consent form, besides answering a questionnaire for the collection of biological, clinical and behavioral variables.

For molecular analyzes 3 ml of maternal blood of the cubital fossa were collected using tubes containing EDTA and kept refrigerated for later DNA extraction via Dneasy Blood and Tissue Kit (Qiagen).

The control group consisted of 227 women without history of abortion who had at least one normal pregnancy. These women were invited to participate in the study when they were in their routine consultations in obstetrics and gynecology in Franklin Olive Leite Clinic, Catholic University of Pelotas. All control women signed the consent form and the questionnaire used to collect epidemiological data. For genomic DNA extraction and molecular analyzes in this control group, oral cavity samples were collected with brush cytology (Purgene DNA Buccal Cell Kit, Gentra Systems) and then were stored in a solution of cell lysis. All samples were processed later according to the manufacturer's protocol, according previous work (Breton et al., 2009).

2.2) Biological, Clinical and Behavioral variables

All study participants completed a questionnaire to collect data on reproductive and medical history. The following variables were included: type of miscarriage, age, number of pregnancies, alcohol use, smoking, preeclampsia, difficulties of pregnancy, treatment for pregnancy and previous abortions number.

2.3) Diagnosis of Miscarriage

To confirm the diagnosis of miscarriage, a ultrasonography (U.S.) in each one of the women with suspected SA was performed. From the U.S. was possible to determine the type of abortion and the age at which the loss occurred, moreover, it is noteworthy that prior to performing this work all patients with SA had conducted the examination Beta-HCG (Human Chorionic Gonadotropin) to confirm pregnancy.

The type of abortion was categorized as follows: complete abortion, when the fetus was expelled completely; incomplete abortion, where, despite of all the fetus has been expelled, the cavity remaining within the endometrium products placenta; retained abortion, when the fetus was not expelled, but remained in the uterus and placenta and fetal tissues and anembrionyc when no embryo development, only gestational sac.

2.4) Genotyping

The 677 C> T (rs:1801133) and 1298 A> C (rs:1801131) SNPs were analyzed by allelic discrimination assay using pre-designed TaqMan probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) in equipment Real Time PCR-System 7500 (Applied Biosystems / Life Technologies). The reactions was performed with a total volume of 6 µl, as follows: 3 µl of Taqman ® PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µl of assay mix (Applied Biosystems), 2.2 µl of free water DNA and RNA (Life Technologies) and 0.5 µl of DNA [20ng]. The standard reaction conditions were an initial denaturation at 95 ° C for 10 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 94 ° C for 15 seconds and annealing and extension at 60 ° C for 1 minute each. A negative control was used in each reaction to determine the presence of contaminants, in addition, 10% of samples were randomly repeated for quality control and the accuracy of the genotyping was 100%.

2.5) Haplotypes

From the genotyping of two polymorphisms analyzed in this study, haplotypes were constructed using the program PHASE, which is based on Bayesian statistics to construct haplotype data for genotyping (Stephens et al. 2001).

2.6) Statistical Analyses

The Hardy-Weinberg Equilibrium was analyzed by the chi-square test. The Fisher's exact test was used to evaluate the association between the genotypes and alleles of the polymorphisms and biological, clinical and behavioral variables. In order to calculate the relative risk of the occurrence of spontaneous abortion according to the genotypes of the genetic variants analyzed in this study, a Poisson regression was performed. All analyzes were performed in the statistical package STATA 12.0 considering $p < 0.05$ how statistically significant the differences.

3. RESULTS

3.1) Allele and genotypic frequencies

The distribution of allele and genotypic frequencies and RR risk of 677C> T and 1298A> C MTHFR polymorphisms are shown in Table1. The 677C> T and 1298A> C variants MTHFR gene in the sample of cases and controls studied are distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium (MTHFR677C>T cases $p=0.88$, MTHFR677C>T controls $p=0.69$; MTHFR1298A>C cases $p=0.13$, MTHFR1298A>C controls $p=0.62$).

Regarding to polymorphism 677C> T, the T allele showed minor allele frequency (MAF) of 52% in cases and 45.4% in controls. Where no statistical significance difference was found between these groups ($p= 0.28$). Likewise, the genotype distribution of the polymorphism 677C> T did not appear different between cases and controls ($p=0.30$). In the analysis of the polymorphism 1298A> C, the C allele showed MAF of 40.8% in cases and 48.5% in controls (48.5%), however no differences were observed in this distribution ($p=0.23$).

The variant MTHFR677C> T did not represent a risk factor for spontaneous abortion. However, were observed a 1.13 increase risk of SA in women genotyped as CC for MTHFR 1298A> C compared to women genotyped as AA.

3.2. Association of polymorphisms 677C> T and 1298A> C MTHFR with biological, clinical and behavioral variables

Tables 2 and 3 present data about biological, clinical and behavioral variables of women studied and the genotypes of MTHFR 677C> T and MTHFR 1298A> C, respectively. The tables 4 and 5 show the data relating to these variables and alleles of MTHFR 677C> T and MTHFR 1298A> C polymorphisms, respectively.

Regarding the MTHFR 1298A> C, it was observed that the genotypes exhibit a significant difference in the type of abortion (miscarriage retained anembrionyc, complete and incomplete) ($p=0.03$). There were no significant associations between the MTHFR 677C> T and the variables investigated, only controls T noncarriers for MTHFR677C>T was significantly compared gestational number ($p=0.04$). Similarly, among women carrier of the allele A, the classification of the type of abortion vary significantly ($p=0.02$). The number of abortions was statistically different among women carrier of allele A in polymorphism MTHFR1298A> C ($p=0.03$). Independently of number abortion the allele A frequency was major in women carriers this allele.

3.3. Haplotypes analysis of the MTHFR 677C> T and 1298A> C polymorphisms and biological, behavioral and medical variables association

The analysis of haplotype of MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C SNPs were constructed based on the prevalence of these individual frequency SNPs. Nine haplotypes were formed and their frequencies are shown in Table 6. The most frequent

haplotype was CTAA cases (28.7%), whereas in controls the most frequent haplotype in controls CCAC (26.1%). No significant differences were observed between the haplotype frequencies in case and control groups ($p = 0.34$). Haplotypes when compared with biological, behavioral and medical variables showed have not association with any these variables (table.7).

DISCUSSION

We investigated MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in women with spontaneous abortion in southern Brazil. This study detected an increased risk of SA among female carriers of the MTHFR 1298CC genotype. This results support the findings of recent studies (Mtiraoui et al 2006; Sheikhaa et al 2012) that have shown an effect of homozygosity for MTHFR1298A>C on occurrence of spontaneous abortion, but should be interpreted with caution due to the small sample size of this study. Studies relating these polymorphisms with SA indicate the SNP MTHFR677C>T as a major variants involved in the occurrence of this pathology (Zetterberg 2004). Still, other studies has been demonstrated the importance of SNP lately MTHFR1298A> C in the occurrence of AE (Rodriguez-Guillen et al 2009, Sheikhaa et al 2012). Rodriguez-Guillen et al (2009) with Mexican women, it was observed that the genotype MTHFR1298AC increased the risk of miscarriage. However, similar to our study, the CC genotype polymorphism MTHFR1298A> C was associated with increased risk of SA in a population of women in Tunisia (Mtiraoui et al 2006). Considering that mutations in the gene that encode MTHFR, reduce its activity and causing direct implications on fetal development from the reduction of folate and increased of homocysteine concentration, is suggested that the genotype MTHFR1298CC added to environmental factors can, as shown by our

study, increase the predisposition to miscarriage (Brustolin et al 2010). La Merrill and colleagues (2012) propose that the decrease in catalytic activity of the methylenetetrahydrofolate reductase enzyme, as a result of mutations as occur in the MTHFR 1298A> C, can lead to DNA hypomethylation due to vitamin B6 deficiency caused by clutter folate metabolism, impairing fetal development.

As it is known that allele and genotype frequencies of 677C> T and 1298A> C MTHFR gene polymorphisms vary according to the geographical region in which these variants were analyzed. A Mexican female population with spontaneous abortion not observed any woman with the CC genotype for the polymorphism MTHFR1298A> C, while the TT genotype of the polymorphism MTHFR677C> T was the most frequently (43.5%) (Rodriguez-Guillen et al 2009). In our study there was a low frequency of the CC genotype for the polymorphism MTHFR1298A> C (2.0%) and, differently to the study with the Mexican women, the frequency of TT genotype of the polymorphism MTHFR677C> T was only 5.0%. In a population of Iranian women with miscarriage, the genotype frequency of SNP MTHFR1298A> C showed that AC genotype is more frequent in those women (75%) (Sheikhaa et al 2012) and in our study the AA genotype is the most frequent (59.2%).

Another relevant finding in our study rarely addressed in other studies is that there is a statistical significance difference between the genotypes of polymorphism MTHFR1298A>C and classification of spontaneous abortion (retained, complete, incomplete and anembrionyc). The biological implications of this found, remains to be better established from studies in other populations. In the same way, the C allele of SNP MTHFR1298A> C was associated with the classification of abortion, although it is not established that biologically means of this finding.

In conclusion, our study showed that polymorphism MTHFR677C> T did not represent a risk factor for the occurrence of spontaneous abortion. Regarding the polymorphism MTHFR1298A>C it was observed that the CC genotype is related to increased risk of SA. Furthermore, factors such as the type of miscarriage and previous abortions were associated with occurrence of this disease. Our results suggest that further research is needed so that the knowledge about the genetic etiology of SA is better understood.

REFERENCES

- Brustolin,S., Giugliani,R., Felix,T.M., 2010. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 1-7.
- Callejon,G., Mayor-Olea,A., Jimenez,A.J., Gaitan,M.J., Palomares,A.R., Martinez,F., Ruiz,M., Reyes-Engel,A., 2007. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. *Hum. Reprod.* 22, 3249-3254.
- Cecatti,J.G., Guerra,G.V., Sousa,M.H., Menezes,G.M., 2010. [Abortion in Brazil: a demographic approach]. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 32, 105-111.
- Felix, T.M., Leistner, S., Giugliani, R., 2004. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*; 70:459–463.
- Finkelstein, J., 2000. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin. Thromb. Hemostasis.* 26, 219–225.
- Fonseca,V.M., Sichieri,R., Basilio,L., Ribeiro,L.V.C., 2003. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Epidemiol.* 6, 319-327.
- Franssen, M.T., Korevaar, J.C., Leschot, N.J., Bossuyt, P.M., Knegt, A.C., Gerssen-Schoorl, K.B., Wouters C.H., Hansson K.B., Hochstenbach, R., Madan K, 2005. Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *Brit. Med. J.*, v. 331, p. 137-141.
- Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews RG et al., 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease:a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10, 111–113

- Jauniaux, E.; Farquharson, R.G.; Christiansen, O.B., Exalto, N, 2006. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum. Repro.*, v.21, p. 2216-2222.
- La Merrill, M., Torres-Sanchez, L., Ruiz-Ramos, R., Lopez-Carrillo, L., Cebrian, M.E., Chen, J., 2012. The association between first trimester micronutrient intake, MTHFR genotypes, and global DNA methylation in pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 25: 133–137.
- Mayor-Olea, A., Callejon, G., Palomares, A.R., Jimenez, A.J., Gaitan, M.J., Rodriguez, A., Ruiz, M., Reyes-Engel, A., 2008. Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *BMC. Med. Genet.* 9, 104.
- Mattia, E.D., Toffoli, G., 2009. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur. J. Cancer* 45:1333-1351.
- Mtiraoui, N., Zammiti, W., Ghazouani, L., Braham, N.J., Saidi, S., Finan, R.R., Almawi, W.Y., Mahjoub, T., 2006. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction.* 131, 395-401.
- Popp, R.A., Crisan, T.O., Trifa, A.P., Militaru, M.S., Rotar, I.C., Farcas, M.F., Pop, I.V., 2012. The C677T Variant in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Spontaneous Abortion in a Romanian Population Group. *Not Sci Biol* 4, 07-11.
- Rodriguez-Guillen, M.R., Torres-Sanchez, L., Chen, J., Galvan-Portillo, M., Blanco-Munoz, J., Anaya, M.A., Silva-Zolezzi, I., Hernandez-Valero, M.A., Lopez-Carrillo, L., 2009. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. *Salud Publica Mex.* 51, 19-25.

- Ronnenberg, A.G., Goldman, M.B., Chen, D., Aitken, I.W., Willett, W.C., Selhub, J., et al. 2002. Preconception folate and vitamin B(6) status and clinical spontaneous abortion in Chinese women. *Obstet Gynecol*; 100:107-113
- Scholl, T.O, Hediger, M.L, Schal, J.I, Khoo, C.S, Fischer, R.L, 1996. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr*; 63:520–5.
- Sheikhha, M.H., Kalantar, S.M., Ghasemi, N., Soleimanian, S., 2012. Association between MTHFR 1298A>C Polymorphism with RSA and IVF Failure. *Iran. J. Pediatr*; 2: 109-115.
- Stephens, M., Smith, J.N, Donnelly, P., 2001 A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 978–989.
- Tayeb,M.T., 2012. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) in risk mothers with Down syndrome among Saudi population. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 13, 263-268.
- Thurrow, H.S; Haack, R.; Hartwig F.P; Oliveira,I.; Dellagostin,O.; Gigante,D.; Horta,B.L; Collares,T.F., Seixas,F.K., TP53 gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a Brazilian cohort.
- Tripathi, R., Tewari, S., Prabhat Kumar Singh, P.K., Agarwal, S., 2010. Association of homocysteine and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) gene polymorphism with coronary artery disease (CAD) in the population of North India *Genet Mol Biol* 33(2): 224-228.
- Van der Put, N.M.J, Gabreels, F., Stevens, E.M.B, Smeitink, J.A.M, Trijbels, F.J.M, Eskes, T.K.A.B, Van den Heuvel, L.P, Blom, H.J, 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural- tube defects? *Am J Hum Genet* 62:1044 1051
- Vollset, S.E, Refsum, H., Irgens, L.M, Emblem, B.M, Tverdal, A, Gjessing, H.K et al., 2000. Plasma total homocysteine, pregnancy complications,

and adverse pregnancy outcomes: The Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 71, 962–968.

Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., Rozen, R., 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64:169–172.

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

Zetterberg, H., Zafiroopoulos, A., Spandidos, D.A., Rymo, L., Blennow, K., 2003. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* 18, 1948-195

Tables

Table 1. Genotype and allele frequencies and relative risk (RR) of MTHFR 677C>T and MTHFR1298A>C polymorphisms in women with spontaneous abortion (SA) and control group

Polymorphisms	Women with SA* n(%)	Controls n(%)	P value	RR (95% CI)	X ²
MTHFR677C>T					
Genotypes					
CC	47 (48.0)	124(54.6)	0.30	1	0.28
CT	46 (47.0)	86(37.9)		0.96(0.90-1.01)	
TT	5 (5.0)	17(7.5)		1.03(0.92-1.14)	
Alleles					
C	93(94.9)	210(95.5)	0.63	0.96(0.91-1.02)*	0.27
T	51(52.0)	103(45.4)	0.28		
MTHFR1298A>C					
Genotypes					
AA	58(59.2)	117(51.5)	0.13	1	0.02
AC	38(38.8)	94(41.4)		1.03(0.89-1.32)	
CC	2(2.0)	16(7.1)		1.13(1.04-1.23)	
Alleles					
A	96(97.8)	211(93.0)	0.11	1.04(0.97-1.10)*	0.20
C	40(40.8)	110(48.5)	0.23		

*A general genetic model retains the 3 distinct genotype classes and makes no assumptions about how the risk or mean for heterozygotes compares with the 2 homozygotes. The general model requires 2 *df* for testing association for a SNP, whereas the other models require only 1 *df*.

Table 2. Genotype frequencies of MTHFR677C>T polymorphism in women with and without spontaneous abortion history according to biological, behavioral and medical variables

Biologica, Behavioral and Medical Variables		Cases n(%)					Controls n(%)				
		SA cases n(%)	MTHFR677 genotypes			p value	SA cases n(%)	MTHFR677 genotypes			p value
			CC	CT	TT			CC	CT	TT	
Age	≤ 30	37(37.8)	21(56.8)	15(40.5)	1(2.7)	0.39	109(48.0)	62(56.9)	39(35.8)	8(7.3)	0.80
	≥ 31	61(62.2)	26(42.6)	31(50.8)	4(6.6)		118(52.0)	62(52.5)	47(39.8)	9(7.6)	
Alcohol	Yes	55(56.1)	29(52.7)	23(41.8)	3(5.5)	0.50	70(30.8)	33(47.1)	31(44.3)	6(8.6)	0.32
	No	43(43.9)	18(41.9)	23(53.5)	2(4.6)		157(69.2)	91(58.0)	55(35.0)	11(7.0)	
Smoking	Yes	27(27.5)	11(40.7)	14(51.9)	2(7.4)	0.56	45(19.8)	25(55.6)	16(35.5)	4(8.9)	0.87
	No	71(72.5)	36(50.7)	32(45.1)	3(4.2)		182(80.2)	99(54.4)	70(38.5)	13(7.1)	
Gestational Number	≤ 3	80(81.6)	39(48.7)	37(46.3)	4(5.0)	0.91	191(84.5)	99(51.8)	77(40.3)	15(7.9)	0.1
	≥ 4	18(18.4)	8(44.4)	9(50.0)	1(5.6)		35(15.5)	25(71.4)	8(22.9)	2(5.7)	
Delivery Number	≤ 3	80(81.6)	39(48.7)	37(46.3)	4(5.0)	0.91	211(92.9)	113(53.5)	82(38.9)	16(7.6)	0.52
	≥ 4	18(18.4)	8(44.4)	9(50.0)	1(5.6)		16(7.1)	11(68.7)	4(25.4)	1(6.3)	
Abortion Classification	Retained	47(48.0)	22(46.8)	23(48.9)	2(4.3)	0.77	.	.	.	.	.
	Anembryonic	15(15.3)	9(60.0)	5(33.3)	1(6.7)		.	.	.	.	
	Incomplete	35(35.7)	15(42.9)	18(51.4)	2(5.7)		.	.	.	.	
	Complete	1(1.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)		.	.	.	.	
Malformation	Yes	5(7.0)	2(40.0)	3(60.0)	0(0.0)	1.00	10(4.5)	4(40.0)	4(40.0)	2(20.0)	0.24
	No	66(93.0)	31(47.0)	30(45.4)	5(7.6)		210(95.5)	118(56.2)	77(36.7)	15(7.1)	
Pre-Eclampsia	Yes	12(16.9)	5(41.7)	5(41.7)	2(16.6)	0.31	53(29.1)	23(43.4)	24(45.3)	6(11.3)	0.10
	No	59(83.1)	28(47.7)	28(47.7)	3(5.2)		167(65.9)	99(59.3)	57(34.1)	11(6.6)	
Pregnancy Difficulties	Yes	11(15.5)	7(63.6)	4(36.4)	0(0.0)	0.51	27(12.3)	17(63.0)	8(29.6)	2(7.4)	0.73
	No	60(84.5)	26(43.3)	29(48.4)	5(8.3)		193(87.7)	105(54.4)	73(37.8)	15(7.8)	
Pregnancy Tratament	Yes	4(5.6)	1(25.0)	3(75.0)	0(0.0)	0.71	9(4.1)	6(66.7)	2(22.2)	1(11.1)	0.48
	No	67(94.4)	32(47.8)	30(44.8)	5(7.4)		211(95.9)	116(55.0)	79(37.4)	16(7.6)	
Previous Abortion Number	0	70(71.4)	34(48.6)	32(45.7)	4(5.7)	0.86	227(100.0)	124(54.6)	86(37.9)	17(7.5)	.
	1	22(22.5)	9(40.9)	12 (54.5)	1(4.6)		.	.	.	.	
	≥2	6(6.1)	4(66.7)	2 (33.3)	0(0.0)		.	.	.	.	

Table 3. Genotype frequencies of MTHFR1298A>C polymorphism in women with and without spontaneous abortion history according to biological, behavioral and medical variables

Biological, Behavioral and Medical Variables		Cases n(%)					Controls n(%)				
		SA cases n(%)	MTHFR1298 genotypes			p value	SA cases n(%)	MTHFR1298 genotypes			p value
			AA	AC	CC			AA	AC	CC	
Age	≤ 30	37(37.8)	20(54.1)	15(40.5)	2(5.4)	0.19	109(48.0)	52(47.7)	51(46.8)	6(5.5)	0.26
	≥ 31	61(62.2)	38(62.3)	23(37.7)	0(0.0)		118(52.0)	65(55.1)	43(36.4)	10(8.5)	
Gestational Number	≤ 3	80(81.6)	51(63.8)	27(33.7)	2(2.5)	0.10	191(84.5)	97(50.8)	82(42.9)	12(6.3)	0.30
	≥ 4	18(18.4)	7(38.9)	11(61.1)	0(0.0)		35(15.5)	20(57.2)	11(31.4)	4(11.4)	
Delivery Number	≤ 3	80(81.6)	51(63.8)	27(33.7)	2(2.5)	0.10	211(92.9)	106(50.2)	90(42.7)	15(7.1)	0.31
	≥ 4	18(18.4)	7(38.9)	11(61.1)	0(0.0)		16(7.10)	11(68.7)	4(25.0)	1(6.3)	
Alcohol	Yes	55(56.1)	33(60.0)	21(38.2)	1(1.8)	1.00	70(38.8)	36(51.4)	29(41.4)	5(7.2)	1.00
	No	43(43.9)	25(58.2)	17(39.5)	1(2.3)		157(69.2)	81(51.6)	65(41.4)	11(7.0)	
Smoking	Yes	27(27.6)	18(66.7)	8(29.6)	1(3.7)	0.30	45(19.8)	22(48.9)	21(46.7)	2(4.4)	0.68
	No	71(72.4)	40(56.3)	30(42.3)	1(1.4)		182(80.2)	95(52.2)	73(40.1)	14(7.7)	
Abortion Classification	Retained	47(48.0)	32(68.1)	14(29.8)	1(2.1)	0.03	.	.	.	.	.
	Anembryonic	15(15.3)	4(26.7)	10(66.7)	1(6.6)		.	.	.	.	
	Incomplete	35(35.7)	21(60.0)	14(40.0)	0(0.0)		.	.	.	.	
	Complete	1(1.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)		.	.	.	.	
Fetal Malformation	Yes	5(7.0)	4(80.0)	1(20.0)	0(0.0)	0.69	10(4.6)	7(70.0)	3(30.0)	0(0.0)	0.51
	No	66(93.0)	37(56.1)	27(40.9)	2(3.0)		210(95.4)	106(50.5)	88(41.9)	16(7.6)	
Pre-Eclampsia	Yes	12(16.9)	7(58.3)	4(33.4)	1(8.3)	0.45	53(29.1)	26(49.1)	23(43.4)	4(7.5)	0.91
	No	59(83.1)	34(57.6)	24(40.7)	1(1.7)		167(75.9)	87(52.1)	68(40.7)	12(7.2)	
Pregnancy Difficulties	Yes	11(15.5)	4(36.4)	7(66.6)	0(0.0)	0.18	27(12.3)	14(51.9)	9(33.3)	4(14.8)	0.21
	No	60(84.5)	37(61.7)	21(35.0)	2(3.3)		193(87.7)	99(51.3)	82(42.5)	12(6.2)	
Pregnancy Tratament	Yes	4(5.6)	3(75.0)	1(25.0)	0(0.0)	0.68	9(4.1)	3(33.3)	5(55.6)	1(11.1)	0.46
	No	67(68.4)	38(56.7)	27(40.3)	2(3.0)		211(95.9)	110(52.1)	86(40.8)	15(7.1)	
Previous Abortion Number	0	70(71.4)	43(61.4)	27(38.6)	0(0.0)	0.12	227(100.0)	117(51.5)	94(41.4)	16(7.1)	.
	1	22(22.4)	12(54.6)	9(40.9)	1(4.5)		.	.	.	.	
	≥2	6(6.2)	3(50.0)	2(33.3)	1(16.7)		.	.	.	.	

Table 4. Allele frequencies of MTHFR677C>T polymorphism in women with and without spontaneous abortion history according to biological, behavioral and medical variables

Biological, Behavioral and Medical Variables		Cases n(%)						Controls n(%)					
		MTHFR677 alleles						MTHFR677 alleles					
		C carriers	C noncarriers	p value	T carriers	T noncarriers	p value	C carriers	C noncarriers	p value	T carriers	T noncarriers	p value
Age	≤ 30	36(97.3)	1(2.7)	0.65	16(43.2)	21(56.8)	0.21	101(92.7)	8(7.3)	1.00	47(43.1)	62(56.9)	0.59
	≥ 31	57(93.4)	4(6.6)		35(57.4)	26(42.6)		109(92.4)	9(7.6)		56(47.5)	62(52.5)	
Alcohol	Yes	52(94.5)	3(5.5)	1.00	26(47.3)	29(52.7)	0.31	64(91.4)	6(8.6)	0.78	37(52.9)	33(47.1)	0.15
	No	41(95.4)	2(4.6)		25(58.1)	18(41.9)		146(93.0)	11(7.0)		66(42.0)	91(58.0)	
Smoking	Yes	25(92.6)	2(7.4)	0.61	16(59.3)	11(40.7)	0.50	41(91.1)	4(8.9)	0.75	20(44.4)	25(55.6)	1.00
	No	68(95.8)	3(4.2)		35(49.3)	36(50.7)		169(92.9)	13(7.1)		83(45.6)	99(54.4)	
Gestational Number	≤ 3	76(95.0)	4(5.0)	1.00	41(51.3)	39(48.7)	0.80	176(92.2)	15(7.8)	1.00	92(48.2)	99(51.8)	0.04
	≥ 4	17(94.4)	1(5.6)		10(55.6)	8(44.4)		33(94.3)	2(5.7)		10(28.6)	25(71.4)	
Delivery Number	≤ 3	76(95.0)	4(5.0)	1.00	41(51.3)	39(48.7)	0.80	195(92.4)	16(7.6)	1.00	98(46.5)	113(53.5)	0.30
	≥ 4	17(94.4)	1(5.6)		10(55.6)	8(44.4)		15(93.7)	1(6.3)		5(31.2)	11(68.8)	
Abortion Classification	Retained	45(95.7)	2(4.3)	1.00	25(53.2)	22(46.8)	0.54	.	.	.	.	.	.
	Anembryonic	14(93.3)	1(6.7)		6(40.0)	9(60.0)		.	.		.	.	
	Incomplete	33(94.3)	2(5.7)		20(57.1)	15(42.9)		.	.		.	.	
	Complete	1(100.0)	0(0.0)		0(0.0)	1(100.0)		.	.		.	.	
Fetal Malformation	Yes	5(100.0)	0(0.0)	1.00	3(60.0)	2(40.0)	1.00	8(80.0)	2(20.0)	0.17	6(60.0)	4(40.0)	0.35
	No	61(92.4)	5(7.6)		35(53.0)	31(47.0)		195(92.9)	15(7.1)		92(43.8)	118(56.2)	
Pre-Eclampsia	Yes	10(83.3)	2(16.7)	0.20	7(58.3)	5(41.7)	0.76	47(88.7)	6(11.3)	0.25	30(56.6)	23(43.4)	0.06
	No	56(94.2)	3(5.1)		31(52.5)	28(47.5)		156(93.4)	11(6.6)		68(40.7)	99(59.3)	
Pregnancy Difficulties	Yes	11(100.0)	0(0.0)	1.00	4(36.4)	7(63.6)	0.32	25(92.6)	2(7.4)	1.00	10(37.0)	17(63.0)	0.54
	No	55(91.7)	5(8.3)		34(56.7)	26(43.3)		178(92.2)	15(7.8)		88(45.6)	105(54.4)	
Pregnancy Tratament	Yes	4(100.0)	0(0.0)	1.00	3(75.0)	1(25.0)	0.62	8(88.9)	1(11.1)	0.52	3(33.3)	6(66.7)	0.73
	No	62(92.5)	5(7.5)		35(52.2)	32(47.8)		195(92.4)	16(7.6)		95(45.0)	116(55.0)	
Previous Abortion Number	0	66(94.3)	4(5.7)	1.00	36(51.4)	34(48.6)	0.57	210(92.5)	17(7.5)	.	103(45.4)	124(54.6)	.
	1	21(95.5)	1(4.5)		13(59.1)	9(40.9)		.	.		.	.	
	≥2	6(100.0)	0(0.0)		2(33.3)	4(66.7)		.	.		.	.	

Table 5. Allele frequencies of MTHFR1298A>C polymorphism in women with and without spontaneous abortion history according to biological, behavioral and medical variables

Biological, Behavioral and Medical Variables		Cases n(%)						Controls n(%)					
		MTHFR1298 alleles						MTHFR1298 alleles					
		A carriers	A noncarriers	p value	C carriers	C noncarriers	p value	A carriers	A noncarriers	p value	C carriers	C noncarriers	p value
Age	≤ 30	35(94.6)	2(5.4)	0.14	17(45.9)	20(54.1)	0.52	103(94.5)	6(5.5)	0.44	57(52.3)	52(47.7)	0.29
	≥ 31	61(100.0)	0(0.0)		23(37.7)	38(62.3)		108(91.5)	10(8.5)		53(44.9)	65(55.1)	
Alcohol	Yes	54(98.2)	1(1.8)	1.00	22(40.0)	33(60.0)	1.00	65(92.9)	5(7.1)	1.00	34(48.6)	36(51.4)	1.00
	No	42(97.7)	1(2.3)		18(41.9)	25(58.1)		146(93.0)	11(7.0)		76(48.4)	81(51.6)	
Smoking	Yes	26(96.3)	1(3.7)	0.48	9(33.3)	18(66.7)	0.49	43(95.6)	2(4.4)	0.74	23(51.1)	22(48.9)	0.74
	No	70(98.6)	1(1.4)		31(43.7)	40(56.3)		168(92.3)	14(7.7)		87(47.8)	95(52.2)	
Gestational Number	≤ 3	78(97.5)	2(2.5)	1.00	29(36.3)	51(63.7)	0.07	179(93.7)	12(6.3)	0.28	94(49.2)	97(50.8)	0.58
	≥ 4	18(100.0)	0(0.0)		11(61.1)	7(38.9)		31(88.6)	4(11.4)		15(42.9)	20(57.1)	
Delivery Number	≤ 3	78(97.5)	2(2.5)	1.00	29(36.3)	51(63.7)	0.07	196(92.9)	15(7.1)	1.00	105(49.8)	106(50.2)	0.20
	≥ 4	18(100.0)	0(0.0)		11(61.1)	7(38.9)		15(93.8)	1(6.2)		5(31.3)	11(68.7)	
Abortion Classification	Retained	46(97.9)	1(2.1)	0.43	15(31.9)	32(68.1)	0.02	.	.	.	.	.	.
	Anembryonic	14(93.3)	1(6.7)		11(73.3)	4(26.7)		.	.		.	.	
	Incomplete	35(100.0)	0(0.0)		14(40.0)	21(60.0)		.	.		.	.	
	Complete	1(100.0)	0(0.0)		0(0.0)	1(100.0)		.	.		.	.	
Fetal Malformation	Yes	5(100.0)	0(0.0)	1.00	1(20.0)	4(80.0)	0.39	10(100.0)	0(0.0)	1.00	3(30.0)	7(70.0)	0.33
	No	64(97.0)	2(3.0)		29(43.9)	37(56.1)		194(92.4)	16(7.6)		104(49.5)	106(50.5)	
Pre-Eclampsia	Yes	11(91.7)	1(8.3)	0.31	5(41.7)	7(58.3)	1.00	49(92.5)	4(7.5)	1.00	27(50.9)	26(49.1)	0.75
	No	58(98.3)	1(1.7)		25(42.4)	34(57.6)		155(92.8)	12(7.2)		80(47.9)	87(52.1)	
Pregnancy Difficulties	Yes	11(100.0)	0(0.0)	1.00	7(63.6)	4(36.4)	0.18	23(85.2)	4(14.8)	0.12	13(48.2)	14(51.8)	1.00
	No	58(96.7)	2(3.3)		23(38.3)	37(61.7)		181(93.8)	12(6.2)		94(48.7)	99(51.3)	
Pregnancy Tratament	Yes	4(100.0)	0(0.0)	1.00	1(25.0)	3(75.0)	0.63	8(88.9)	1(11.1)	0.50	6(66.7)	3(33.3)	0.32
	No	65(97.0)	2(3.0)		29(43.3)	38(56.7)		196(92.9)	15(7.1)		101(47.9)	110(52.1)	
Previous Abortion Number	0	70(100.0)	0(0.0)	0.03	27(38.6)	43(61.4)	0.72	211(92.9)	16(7.1)	.	110(48.5)	117(51.5)	.
	1	21(95.5)	1(4.5)		10(45.4)	12(54.6)		.	.		.	.	
	≥2	5(83.3)	1(16.7)		3(50.0)	3(50.0)		.	.		.	.	

Table 6. Haplotype frequencies of MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms in women with spontaneous abortion and controls

Haplotype	Cases n(%)	Controls n(%)	P value	RR (95% CI)	X ²
CCAA	26(26.4)	50 (22.2)		1	
CCAC	19(19.3)	59(26.1)		1.06(0.78-1.46)	
CCCC	2(2.0)	16(7.0)		0.89(0.53-1.48)	
CTAA	28(28.7)	49(21.4)		1.05(0.78-1.42)	
CTAC	18(18.4)	34(15.1)	0.34	1.14(0.85-1.55)	0.69
CTCC	0(0.0)	2(0.8)		1	
TTAA	5(5.2)	16(7.0)		1.30(0.89-1.88)	
TTAC	0(0.0)	0(0.0)			
TTCC	0(0.0)	1(0.4)		1	
Total	98(100)	227(100)			

Table.7. Haplotype frequencies of MTHFR677C>T and MTHFR1298A>C polymorphisms in women with and without spontaneous abortion history according to biological, behavioral and medical variables

Biological, Behavioral and Medical Variables		Haplotypes MTHFR677 C>T e MTHFR1298 A>C																
		Cases n(%)							p value	Controls n(%)								
		Total	CCAA	CCAC	CCCC	CTAA	CTAC	TTAA		Total	CCAA	CCAC	CCCC	CTAA	CTAC	CTCC	TTAA	TTCC
Age	≤ 30	33(33.7)	8(24.2)	5(15.1)	2(6.1)	7(22.2)	9(27.3)	2(6.1)	0.19	109(48.2)	26(23.8)	30(27.5)	8(7.3)	21(19.3)	15(13.8)	2(1.8)	7(6.4)	0(0.0)
	≥ 31	65(66.3)	18(27.7)	14(21.5)	0(0.0)	21(32.3)	9(13.8)	3(4.6)		117(51.8)	24(20.5)	29(24.8)	7(6.0)	28(23.9)	19(16.2)	0(0.0)	9(7.7)	1(0.9)
Alcohol	Yes	58(59.2)	17(29.3)	12(20.7)	1(1.7)	16(27.6)	10(17.2)	2(3.4)	0.91	70(31.0)	13(18.6)	19(27.1)	4(5.7)	13(18.6)	13(18.6)	1(1.4)	7(10.0)	0(0.0)
	No	40(40.8)	9(22.5)	7(17.5)	1(2.5)	12(30.0)	8(20.0)	3(7.5)		156(69.0)	37(23.7)	40(25.6)	11(7.1)	36(23.1)	21(13.5)	1(0.6)	9(5.8)	1(0.6)
Smoking	Yes	28(28.6)	8(28.6)	3(10.7)	1(3.6)	10(35.7)	4(14.3)	2(7.1)	0.55	45(19.9)	11(24.4)	13(28.9)	2(4.4)	7(15.6)	9(20.0)	1(2.2)	4(4.4)	0(0.0)
	No	70(71.4)	18(25.7)	16(22.9)	1(1.4)	18(25.7)	14(20.0)	3(4.3)		181(80.1)	39(21.6)	46(25.4)	13(7.2)	42(23.2)	25(13.8)	1(0.5)	14(7.7)	1(0.5)
Gestational Number	≤ 3	78(79.6)	22(28.2)	13(16.7)	2(2.6)	23(29.5)	13(16.7)	5(6.4)	0.60	190(84.4)	44(23.2)	49(25.8)	12(6.3)	39(20.5)	28(14.7)	2(1.1)	15(7.9)	1(0.5)
	≥ 4	20(20.4)	4(20.0)	6(30.0)	0(0.0)	5(25.0)	5(25.0)	0(0.0)		35(15.6)	6(17.1)	9(25.7)	3(8.6)	10(28.6)	6(17.1)	0(0.0)	1(2.9)	0(0.0)
Delivery Number	≤ 3	78(79.6)	22(28.2)	13(16.7)	2(2.6)	23(29.5)	13(16.7)	5(6.4)	0.60	210(92.9)	46(21.9)	54(25.7)	15(7.1)	45(21.4)	31(14.8)	2(0.9)	16(7.6)	1(0.5)
	≥ 4	20(20.4)	4(20.0)	6(30.0)	0(0.0)	5(25.0)	5(25.0)	0(0.0)		16(7.1)	4(25.0)	5(31.2)	0(0.0)	4(25.0)	3(18.8)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
Abortion Classification	Retained	52(53.1)	16(30.8)	10(19.2)	1(1.9)	17(32.7)	7(13.5)	1(1.9)	0.07	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Anembryonic	13(13.3)	3(23.1)	2(15.4)	1(7.7)	0(0.0)	5(38.5)	2(15.4)		.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Incomplete	32(32.6)	6(18.7)	7(21.9)	0(0.0)	11(34.4)	6(18.7)	2(6.3)		.	.	.	.	.	.	.	.	.
	Complete	1(1.0)	1(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)		.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fetal Malformation	Yes	3(4.2)	0(0.0)	1(33.3)	0(0.0)	2(66.7)	0(0.0)	0(0.0)	0.72	10(4.6)	2(20.0)	4(40.0)	1(10.0)	1(10.0)	2(20.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
	No	68(95.8)	15(22.1)	16(23.5)	2(2.9)	17(25.0)	13(19.1)	5(7.4)		209(95.4)	48(23.0)	53(25.4)	14(6.7)	45(21.5)	30(14.3)	2(1.0)	16(7.7)	1(0.5)
Pre-Eclampsia	Yes	13(18.3)	2(15.4)	3(23.1)	1(7.7)	3(23.1)	2(15.4)	2(15.4)	0.57	53(24.2)	11(20.7)	15(28.3)	4(7.5)	9(17.0)	9(17.0)	0(0.0)	4(7.5)	1(2.0)
	No	58(81.7)	13(22.4)	14(24.1)	1(1.7)	16(27.6)	11(19.0)	3(5.2)		166(75.8)	39(23.5)	42(25.3)	11(6.6)	37(22.3)	23(13.9)	2(1.2)	12(7.2)	0(0.0)
Pregnancy Difficulties	Yes	10(14.1)	2(20.0)	5(50.0)	0(0.0)	3(30.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.31	27(12.3)	4(14.8)	9(33.3)	3(11.1)	3(11.1)	5(18.5)	0(0.0)	2(7.4)	1(3.7)
	No	61(85.9)	13(21.3)	12(19.7)	2(3.3)	16(26.2)	13(21.3)	5(8.2)		192(87.7)	46(24.0)	48(25.0)	12(6.2)	43(22.4)	27(14.1)	2(1.0)	14(7.3)	0(0.0)
Pregnancy Tratament	Yes	4(5.6)	1(25.0)	0(0.0)	0(0.0)	3(75.0)	0(0.0)	0(0.0)	0.42	9(4.1)	2(22.2)	4(44.4)	1(11.1)	0(0.0)	1(11.1)	0(0.0)	0(0.0)	1(11.1)
	No	67(94.4)	14(20.9)	17(25.4)	2(3.0)	16(23.9)	13(19.4)	5(7.5)		210(95.9)	48(22.9)	53(25.2)	14(6.7)	46(21.9)	31(14.8)	2(0.9)	16(7.6)	0(0.0)
Previous Abortion Number	0	72(73.5)	22(30.6)	15(20.8)	0(0.0)	22(30.6)	10(13.9)	3(4.2)	0.06	226(100.0)	50(22.1)	59(26.1)	15(6.6)	49(21.7)	34(15.0)	2(0.9)	16(7.1)	1(0.4)
	1	20(20.4)	2(10.0)	3(15.0)	1(5.0)	4(20.0)	8(40.0)	2(10.0)		.	.	.	.	.	.	.	.	.
	≥2	6(6.1)	2(33.3)	1(16.7)	1(16.7)	2(33.3)	0(0.0)	0(0.0)		.	.	.	.	.	.	.	.	.

4. CONCLUSÕES

- O polimorfismo 677C>T da MTHFR não representa um fator de risco para o aborto espontâneo na população estudada;
- O genótipo CC do polimorfismo 1298A>C da MTHFR aumenta o risco de aborto espontâneo na população estudada;
- As frequências genotípicas do polimorfismo 677C>T da MTHFR; não estão associadas com as variáveis biológicas, comportamentais e médicas;
- As mulheres do grupo controle não carreadoras do alelo T do polimorfismo 677C>T já tiveram 4 ou mais gestações;
- As mulheres com aborto espontâneo carreadoras do alelo A do polimorfismo 1298A>C já tiveram 1 ou mais abortos;
- As mulheres com aborto espontâneo não carreadoras do alelo C do polimorfismo 1298A>C já tiveram abortos espontâneos retido, anembrônico, completo e incompleto;
- A frequências haplotípicas dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C não estão relacionadas ao aborto espontâneo em nossa população;
- A frequências haplotípicas dos polimorfismos 677C>T e 1298A>C não estão associadas às variáveis biológicas, comportamentais e médicas.

5. REFERÊNCIAS

BAILEY L.B. New standard for dietary folate intake in pregnant women. **Am J Clin Nutr**; 71 Suppl 5: 1304-7, 2000.

BENUTE, G. R.; NOMURA, R. M.; PEREIRA, P. P.; LUCIA, M. C.; ZUGAIB, M. [Spontaneous and induced abortion: anxiety, depression and guilty]. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.55, p.322-327, 2009.

BETTICHER D.C., THATCHER N., ALTERMATT H.J., HOBAN P., RYDER W.D., HEIGHWAY J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. **Oncogene**;11:1005-1011,1995.

BOTSTEIN D, RISCH N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. **Nature Genetics**; 33 Suppl:228-237, 2003.

BRANDALIZE, Ana Paula. **Análise dos fatores genéticos e ambientais relacionados ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fatores de risco para Síndrome de Down e suas malformações maiores**. 2009. 145f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BRETON C,V; BYUN H-M; WENTEN M; PAN F; YANG A; GILILAND F.D. Prenatal Tobacco Smoke Exposure Affects Global and Gene-specific DNA Methylation. **Am J Respir Crit Care Med**; 180. p 462–467, 2009.

BUSSEN S, SUTTERLIN M, STECK T. Endocrine abnormalities during the follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion. **Human Reproduction**; 14:18-20, 1999.

CAETANO, M. R.; COUTO, E.; PASSINI, R., JR.; SIMONI, R. Z.; BARINI, R. Gestational prognostic factors in women with recurrent spontaneous abortion. **Sao Paulo Med. J.**, v.124, p.181-185, 2006.

CALLEJON, G.; MAYOR-OLEA, A.; JIMENEZ, A. J.; GAITAN, M. J.; PALOMARES, A. R.; MARTINEZ, F.; RUIZ, M.; REYES-ENGEL, A. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. **Hum. Reprod.**, v.22, p.3249-3254, 2007.

CECATTI, J. G.; GUERRA, G. V.; SOUSA, M. H.; MENEZES, G. M. [Abortion in Brazil: a demographic approach]. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.32, p.105-111, 2010.

CHAN RL, OLSHAN AF, SAVITZ D.A, HERRING A.H., DANIELS J.L., PETERSON H.B., et al. Severity and duration of nausea and vomiting symptoms in pregnancy and spontaneous abortion. **Human Reproduction**; 25(11):2907-12, 2010.

CLIFFORD K, RAI R, WATSON H, REGAN L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. **Human Reproduction**; 9:1328-32, 1994.

CHRISTIANSEN O.B. A fresh look at the causes and treatments of recurrent miscarriage, especially its immunological aspects. **Human Reproduction Update**;2:271-93, 1996.

FELIX, T.M., LEISTNER, S., GIUGLIANI, R. Metabolic effects and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism associated with neural tube defects in southern Brazil. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**; 70:459–463, 2004.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A; OLIVEIRA V.M DE; COELHO, L.R; BREDA I. Marcadores séricos de trombofilias hereditárias e anticorpos antifosfolípidos em gestantes com antecedentes de pré-eclâmpsia grave. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**; 34 -1, 2012.

FINKELSTEIN, J. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. **Semin. Thromb. Hemostasis**. 26, 219–225, 2000.

FROSST,P., BLOM, H.J., MILOS, R., GOYETTE, P., SHEPPARD, C.A., MATTHEWS RG. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genetics**; 10, 111–113, 1995.

FONSECA, V. M.; SICHIERI, R.; BASILIO, L.; RIBEIRO, L. V. C. Consumo de folato em gestantes de um hospital público do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.6, p.319-327, 2003.

FORD, H. B.;SCHUST, D. J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. **Rev. Obstet. Gynecol.**, v.2, p.76-83, 2009.

GLUECK C.J., WANG P., GOLDENBERG N., SIEVE-SMITH L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. **Human Reproduction**; 17:2858-2864, 2002.

GOYETTE P., SUMNER J. S. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature Genetics** 7, 195-200, 1994

HARBOE-GONÇALVES, LILLIAN; VAZ, LUIZ SÉRGIO;BUZZI, MARCELO. Associação entre níveis plasmáticos de homocisteína e acidente vascular cerebral isquêmico- Estudo Transversal Analítico. **Arquivo Neuropsiquiátrico**, v.63-1 p. 97-103, 2005.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**; 431:931-945, 2004.

JAUNIAUX E.; FARQUHARSON R.G.; CHRISTIANSEN O.B.; and EXALTO N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, v.21, p. 2216-2222, 2006.

JENNINGS BA, WILLIS GA, SKINNER J, RELTON C.L. Genetic selection? A study of individual variation in the enzymes of folate metabolism. **BMC Med Genet** 11:18–23, 2010.

KUTTEH WH, YETMAN DL, CARR AC. Increased prevalence of antithyroid antibodies identified in women with recurrent pregnancy loss but not in women undergoing assisted reproduction. **Fertility and Sterility**;71:843-848, 1999.

LA MERRILL, M., TORRES-SANCHEZ, L., RUIZ-RAMOS, R., LOPEZ-CARRILLO, L., CEBRIAN, M.E., CHEN, J. The association between first trimester micronutrient intake, MTHFR genotypes, and global DNA methylation in pregnant women. **Journal Maternal Fetal Neonatal Medicine** 25: 133–137, 2012.

LEE H.H.; HONG S.H.; SHIN S.J.; KO J.J.; OH D.; and KIM N.K. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. **Fertility and Sterility**, v.93, p.1244-1247, 2010.

LECLERC D, WILSON A, DUMAS R, GAFUIK C, SONG D, WATKINS D, HENG HHK, ROMMEN JM, SCHERER SW, ROSENBLATT DS, GRAVEL RA. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. **Proc Natl Acad Sci USA**; 95: 3059–3064, 1998.

LIN MT; STORER B; MARTIN PJ. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**; 349:2201-2210, 2003.

LIU C.; WANG J.; ZHOU S.; WANG B.; MA X. Association between -238 but not -308 polymorphism of Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. **Reproductive Biology and Endocrinology**; 8:114, 2010.

MATTAR, R.; SOARES, R. V. P.; CAMANO, L.; DAHER, S. Contato com Antígenos Paternos pela Mucosa Vaginal e Oral e o Aborto de Repetição. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.26, p.139-146, 2004.

MATTIA, E.D., TOFFOLI, G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. **European Journal of Cancer**; 45:1333-1351, 2009.

MAYOR-OLEA, A.; CALLEJON, G.; PALOMARES, A. R.; JIMENEZ, A. J.; GAITAN, M. J.; RODRIGUEZ, A.; RUIZ, M.; REYES-ENGEL, A. Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. **BMC. Med. Genet.**, v.9, p.104, 2008.

MILLS JL, SIMPSON JL, DRISCOLL SG. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. **New England Journal of Medicine** ;319:1617-1623. 1988

MTIRAOU, N.; ZAMMITI, W.; GHAZOUANI, L.; BRAHAM, N. J.; SAIDI, S.; FINAN, R. R.; ALMAWI, W. Y.; MAHJOUB, T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. **Reproduction.**, v.131, p.395-401, 2006.

MUNIZ, M.T.; SIQUEIRA, E.; FONSECA, R.; DALMEIDA, V.; HOTTA, J.; SANTOS, J.E.; CAVALCANTI, M. S.M; SAMPAIO, C. A.M. Avaliação da relação entre o polimorfismo C677T no gene para MTHFR e a concentração plasmática de homocisteína na doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. São Paulo, v.50, N.6, p.1059-1065, 2006.

NUNES, D.P.T; SPEGIORIN,L.C.J.F; MATTOS, C.C.B; OLIANI, A.H; VAZ-OLIANI, D.C.M; MATTOS, L.C. The *ADA*2* allele of the adenosine deaminase gene (20q13.11) and recurrent spontaneous abortions: an age-dependent association. **Clinics**, 66(11): 1929–1933, 2011.

POPP, R. A.; CRISAN, T. O.; TRIFA, A. P.; MILITARU, M. S.; ROTAR, I. C.; FARCAS, M. F.; POP, I. V. The C677T Variant in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Spontaneous Abortion in a Romanian Population Group. **Not Sci Biol**, v.4, p.07-11, 2012.

RAI R, BACKOS M, RUSHWORTH F, REGAN L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage—a reappraisal. **Human Reproduction**.;15:612-615, 2000.

RODRIGUEZ-GUILLEN, M. R.; TORRES-SANCHEZ, L.; CHEN, J.; GALVAN-PORTILLO, M.; BLANCO-MUNOZ, J.; ANAYA, M. A.; SILVA-ZOLEZZI, I.; HERNANDEZ-VALERO, M. A.; LOPEZ-CARRILLO, L. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. **Salud Publica Mex.**, v.51, p.19-25, 2009.

RONNENBERG, A.G., GOLDMAN, M.B., CHEN, D., AITKEN, I.W., WILLETT, W.C., SELHUB, J. Preconception folate and vitamin B(6) status and clinical spontaneous abortion in Chinese women. **Obstetric Gynecology**; 100:107-113, 2002.

RUSHWORTH FH, BACKOS M, RAI R, et al. Prospective pregnancy outcome in untreated recurrent miscarriers with thyroid autoantibodies. **Human Reproduction**.;15:1637-1639, 2000.

SCHOLL, T.O, HEDIGER, M.L, SCHAL, J.I, KHOO, C.S, FISCHER, R.L. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. **American Journal of Clinical Nutrition**; 63:520–5, 1996.

SHEIKHHA, M.H., KALANTAR, S.M., GHASEMI, N., SOLEIMANIAN, S. Association between MTHFR 1298A>C Polymorphism with RSA and IVF Failure. **Iranian Journal of Pediatric** ; 2: 109-115, 2012.

STEPHENS, M., SMITH, J.N, DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**. 68: 978–989, 2001.

STRAY-PEDERSEN B, STRAY-PEDERSEN S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. **American Journal of Obstetric Gynecology** ;148(2):140-6,1984.

SUMMERS P.R. Microbiology relevant to recurrent miscarriage. **Clinics Obstetric Gynecology**. 1994;37:722-729.

TANG, W.; ZHOU, X.; CHAN, Y.; WU, X.; LUO, Y. p53 codon 72 polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 28(10): 965–969, 2011.

THE INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, 431, 931–945, 2004

THUROW H.S., HAACK R., HARTWIG F.P., OLIVEIRA I.O., DELLAGOSTIN O.A., GIGANTE D.P., HORTA B.L., COLLARES T., AND SEIXAS F.K. *TP53* gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a Brazilian cohort. **Journal of Bioscience**, 475 36, 823-831, 2011

TRIPATHI, R., TEWARI, S., PRABHAT KUMAR SINGH, P.K., AGARWAL, S. Association of homocysteine and methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T) gene polymorphism with coronary artery disease (CAD) in the population of North India. **Genetics and Molecular Biology** v. 33(2): p.224-228, 2010

VAN DER PUT, N.M.J; GABREELS, F.; STEVENS, E.M.B; SMEITINK, J.A.M; TRIJBELS, F.J.M, ESKES, T.K.A.B, VAN DEN HEUVEL, L.P, BLOM, H.J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural- tube defects? **American Journal of Human Genetics** V. 62, p.1044, 1051, 1998.

VAQUERO E.; LAZZARIN N.; DE CAROLIS H. Mild thyroid abnormalities and recurrent spontaneous abortion: diagnostic and therapeutical approach. **American Journal of Reproduction and Immunology** ;43:204-208, 2000.

VOLLSET S.E.; REFSUM H.; IRGENS L.M.; EMBLEM B.M.; TVERDAL A.; GJESSING H.K. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: The Hordaland Homocysteine Study. **American Journal Clinics Nutrition** 71, 962–968, 2000.

WATSON H.; KIDDY D.S.; HAMILTON-FAIRLEY D. Hypersecretion of luteinizing hormone and ovarian steroids in women with recurrent early miscarriages. **Human Reproduction**; 8:829-833, 1993.

WEISBERG I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN B.; SIBANI S.; ROZEN, R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Molecular Genetics Metabolism** v. 64, p. 169–172, 1998.

WU Z., YOU Z., ZANGH C., LI Z., SU X., ZANGH X., LI Y. Association between Functional Polymorphisms of Foxp3 Gene and the Occurrence of Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion in a Chinese Han Population. **Clinical and Developmental Immunology**; 2012.

ZETTERBERG, H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. **Reprod. Biol Endocrinol.**, v.2, p.7, 2004.

ZETTERBERG, H.; ZAFIROPOULOS, A.; SPANDIDOS, D. A.; RYMO, L.; BLENNOW, K. Gene-gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. **Hum. Reprod.**, v.18, p.1948-1950, 2003.