

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**O PAPEL DE POLIMORFISMOS NOS GENES *VEGFA*, *NOS2* E *PTGS2*  
EM PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES**

**Marcela Felix Fortis**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lavinia Schüler-Faccini

Porto Alegre  
Março de 2015

## **INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

---

Este trabalho teve como fontes financiadoras: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e o Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP).

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

*If you always put limits on what you can do, it will spread into your work, into your morality and into your entire being. There are no limits. There are only plateaus, and you must not stay there, you must go beyond them.*

Bruce Lee

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço à minha querida orientadora, Maria Teresa Vieira Sanseverino, pela atenção, disposição, confiança e apoio ao longo dos dois anos do mestrado. Muito obrigada pela interminável paciência e otimismo!

À minha co-orientadora, Lavinia Schüller-Faccini, que me proporcionou a oportunidade de entrar no PPGBM, por ter aceitado me orientar e me receber em seu laboratório. Obrigada pela disposição, bom humor e ensinamentos.

Ao Elmo Cardoso, sempre presente com a solução para todos os problemas. Obrigada pelo empenho, dedicação e gentileza!

Ao PPGBM e todos seus professores, pelo conhecimento e orientações. Mesmo sem ter falado diretamente com todos, suas participações nas discussões promovidas pelo programa certamente enriqueceram minha experiência acadêmica.

Aos colaboradores do projeto de abortamentos recorrentes, obrigada a todos que participaram da coleta de amostras, experimentos, estruturação do banco de dados, análises e redação dos artigos.

Aos colegas do laboratório 113: Andressa, Bibiane, Fernanda, Flavia, Gabriela, Juliano, Luiza, Marcelo, Nádia, Pedro, Perpétua, Thayne, Vanessa e Zuleide, pelo convívio e coleguismo. Agradeço em especial à Thayne, por todo auxílio nos experimentos, análises e solidariedade. Também à Zuleide pela ajuda na revisão da dissertação e tranquilidade.

Ao Dr. Nilo Frantz e sua equipe, pelo auxílio e flexibilidade em aceitar meus horários de trabalho variáveis. Em especial agradeço às colegas do laboratório de embriologia: Gerta, Norma, Caroline e Carla, obrigada pela compreensão!

Finalmente, aos amigos e família, minha mãe Elaine e irmã Camila, por seu exemplo, apoio e incentivo em todas as etapas de meus estudos. Ao Alexandre, pelo amor, compreensão, calma e companheirismo acima de tudo.

Obrigada a todos!

## Sumário

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1. PERDAS GESTACIONAIS .....	9
1.2. PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES.....	10
1.3. DESENVOLVIMENTO DA GESTAÇÃO .....	13
1.4. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF).....	16
1.5. ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	18
1.6. PROSTAGLANDINA ENDOPERÓXIDO SINTASE (PTGS) .....	21
1.7. FAMÍLIA P53 .....	22
1.8. FATOR INIBITÓRIO DA LEUCEMIA (LIF).....	24
1.9. JUSTIFICATIVA .....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3. MATERNAL <i>INOS</i> GENETIC POLYMORPHISMS IN RECURRENT PREGNANCY LOSS .....</b>	<b>29</b>
<b>4. CYCLOOXYGENASE-2 AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENETIC POLYMORPHISMS IN RECURRENT MISCARRIAGE.....</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS ADICIONAIS.....</b>	<b>62</b>
5.1. REVISÃO DE POLIMORFISMOS PREVIAMENTE ESTUDADOS POR NOSSO GRUPO DE PESQUISA EM ABORTAMENTOS RECORRENTES .....	63
5.2. MULHERES COM DUAS PERDAS GESTACIONAIS E MULHERES COM TRÊS OU MAIS PERDAS GESTACIONAIS .....	65
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>91</b>

## Lista de abreviaturas

AR – Abortamentos recorrentes

ASRM – *American Society for Reproductive Medicine*

COX-2 – *Cyclooxygenase-2* (Ciclooxigenase-2)

eNOS – *Endothelial nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase endotelial)

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

iNOS – *Inducible nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase induzível)

LIF – *Leukemia-inhibitory factor* (Fator inibitório da leucemia)

nNOS – *Neuronal nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase neuronal)

NO – Óxido nítrico

NOS – *Nitric oxide synthase* (Óxido nítrico sintase)

OR – *Odds ratio* (razão de chance)

OS – *Oxidative stress* (estresse oxidativo)

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PG – Prostaglandinas

PGR – Perda gestacional recorrente

PTGS-2 – *Prostaglandin endoperoxide synthase-2* (Prostaglandina endoperoxídeo sintase-2)

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

RNS – *Reactive nitrogen species* (espécies reativas de nitrogênio)

RPL – *Recurrent pregnancy loss* (perdas gestacionais recorrentes)

SNP – *Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de base única)

TP53 – *Tumor protein p53 gene* (gene proteína tumoral p53)

TP63 – *Tumor protein p63 gene* (gene proteína tumoral p63)

TP73 – *Tumor protein p73 gene* (gene proteína tumoral p73)

VEGF – *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento do endotélio vascular)

## **Lista de tabelas e figuras**

### **Capítulo 1**

Figura 1. Etiologia dos abortamentos de repetição.

Página 10

Figura 2. (A) A implantação do blastocisto e os processos necessários para a invasão endometrial. (B) Manutenção da gestação inicial

Página 13

Figura 3. Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) podem inibir ou exacerbar a angiogênese e a apoptose, dependendo de suas concentrações, *background* genético e microambiente de ação (Figura adaptada de Hussain *et al.*, 2003).

Página 25

### **Capítulo 2**

Não há figuras ou tabelas

### **Capítulo 3**

Table 1. Demographics and clinical characteristics of recurrent pregnancy loss (RPL) patients and controls.

Página 35

Table 2. *iNOS* genotype and allele frequencies in recurrent pregnancy loss (RPL) patients and controls.

Página 36

Table 3. Genotype frequencies and the corresponding risk estimates for recurrent pregnancy loss (RPL).

Página 37

Table 4. Haplotype analysis of -1026C>A and +2087G>A iNOS polymorphisms in recurrent pregnancy loss (RPL) patients and controls. Página 38

#### **Capítulo 4**

Table 1. Characteristics of recurrent miscarriage (RM) patients and controls. Página 50

Table 2. Single-nucleotide polymorphisms studied in *PTGS2* and *VEGFA*, polymorphic allele frequencies (PAF) and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) analysis of recurrent miscarriage (RM) patients and controls.

Página 51

Table 3. Genotype frequencies of *VEGFA* and *PTGS2* polymorphisms in recurrent miscarriage (RM) patients and controls. Página 52

Table 4. Haplotype frequencies of *VEGFA* and *PTGS2* polymorphisms in recurrent miscarriage (RM) patients and controls. Página 53

#### **Capítulo 5**

**Tabela 1.** Frequências alélicas e genóticas de polimorfismos em *TP53*, *TP63*, *TP73*, *LIF* e *eNOS* em mulheres com abortamentos de repetição (AR) e controles.

Página 63



**Tabela 2.** Dados clínicos dos subgrupos de mulheres com dois abortamentos e mulheres com três ou mais abortamentos.

Página 65

**Tabela 3.** Frequências alélicas e genóticas de polimorfismos em *VEGFA*, *PTGS2*, *iNOS*, *eNOS*, *TP53*, *TP63*, *TP73* e *LIF* em mulheres com 2 e mulheres com 3 ou mais abortamentos.

Página 66

## Capítulo 6

**Figura 4.** Radicais livres podem inibir ou exacerbar a angiogênese e apoptose, dependendo de suas concentrações, *background* genético e microambiente de ação.

Página 72

## Resumo

Um abortamento é a perda de uma gestação clínica intrauterina antes que o feto tenha atingido viabilidade até a 24<sup>a</sup> semana de gestação. A incidência de abortamentos clínicos espontâneos é cerca de 15 a 25% das gestações detectadas, e em 50% das concepções humanas. Os abortamentos são recorrentes em 3 a 5% dos casais em idade reprodutiva. As perdas gestacionais recorrentes ou abortamentos recorrentes (AR) são definidos como duas ou mais interrupções de gestações clínicas. A etiologia dos AR é extremamente diversa, incluindo anormalidades genéticas, imunológicas, anatômicas, endócrinas e uterinas. Em aproximadamente 50% dos AR, a etiologia não é encontrada, podendo ser chamada de idiopática.

Alterações na implantação e placentação podem causar perdas gestacionais. Genes relacionados à inflamação, implantação, *stress* oxidativo e angiogênese poderiam estar envolvidos na etiologia dos AR. Variantes genéticas que alterem a expressão, função ou localização desses fatores poderiam afetar o risco de abortamentos recorrentes.

Nesse trabalho foi investigado o efeito de variantes polimórficas nos genes *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS2*, *NOS3*, *TP53*, *TP63*, *TP73* e *LIF* como fator de risco para AR. Foram avaliadas 149 mulheres com AR e 208 mulheres férteis e sem perdas gestacionais como controles. A distribuição de frequências alélicas não foi diferente entre os grupos em nenhum dos polimorfismos avaliados. No entanto, portadoras do alelo polimórfico -1026A em *iNOS* apresentaram maior risco para AR (OR = 1,92; 95% IC: 1,18-3,11; p= 0,008). Além disso, pacientes que relataram histórico de consumo de álcool também mostram maior risco para AR (OR 2,075; IC 1,32-3,27; p = 0,002).

O polimorfismo funcional -1026C/A na região promotora de *iNOS* provoca um aumento de 4,7 a 5,9 vezes em sua atividade promotora. O aumento da expressão de *iNOS* pode levar à produção excessiva de óxido nítrico (NO), estimulando a produção de peroxinitrito, um potente pró-oxidante. O *stress* oxidativo pode prejudicar a invasão embrionária e a proliferação placentária, e já foi associado a AR. Os achados deste trabalho reforçam a hipótese de que o NO e o *stress* oxidativo estão envolvidos na fisiopatologia dos AR.

## Abstract

A miscarriage is the unintentional termination of an intrauterine clinical pregnancy before viability is reached, before the gestational age of 24 weeks. Spontaneous clinical miscarriages occur in about 15 to 25% of clinically recognized pregnancies, and in approximately 50% of human conceptions. Miscarriages are recurrent in 3 to 5% of couples in reproductive age. Recurrent miscarriage (RM), or recurrent pregnancy loss (RPL), is defined as the loss of two or more clinical pregnancies. The etiology of RPL is diverse, including genetic, immunologic, anatomic, endocrine and uterine abnormalities. No underlying cause for RPL can be identified in approximately 50% of cases, and thus, these cases are considered unexplained RPL.

Derangements in embryo implantation and placentation can cause pregnancy losses. Genes linked to inflammation, embryo implantation, oxidative stress and angiogenesis may be involved in the etiology of RPL. Genetic variants that can modify gene expression, function or location might alter the risk for RPL.

In this study, the effect of genetic variants in the genes *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS2*, *NOS3*, *TP53*, *TP63*, *TP73* and *LIF* were investigated as a risk factor for RPL. We evaluated 149 RPL cases and 208 fertile women with no history of pregnancy loss as controls. Allele frequencies were not different between groups for the variants assessed, nonetheless, women carrying the *iNOS* -1026A variant presented a higher risk for RPL (OR = 1.92, 95% CI: 1.18-3.11; p= 0.008). Additionally, patients who reported a history of alcohol consumption also presented a higher risk for RPL (OR 2.075, CI 1.32-3.27; p = 0.002).

The functional polymorphism -1026C/A in the *iNOS* promoter region is responsible for an increase of 4.7 to 5.9-fold in *iNOS* promoter activity. The rise in *iNOS* expression may lead to excessive nitric oxide (NO) production and, in turn, increase the production of peroxynitrite, a potent pro-oxidant. Oxidative stress can impair embryo implantation and placental proliferation, and it has been associated with RPL. The findings of this study support the hypothesis that NO and oxidative *stress* play a role in the pathophysiology of RPL.

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO**

---

## 1. Introdução

### 1. 1. Perdas gestacionais

O termo perda gestacional é aplicado a diferentes complicações do início da gestação. Uma perda após um exame de gonadotrofina coriônica humana, mas antes da confirmação ultrassonográfica ou histológica é definida como uma perda bioquímica (Larsen *et al.*, 2013). O termo abortamento clínico é utilizado quando há confirmação por ultrassom ou histologia que a gestação existiu, geralmente após 6 semanas.

O conceito abortamento que tem sido amplamente aceito é: perda de uma gestação clínica intrauterina estabelecida antes que o feto tenha atingido viabilidade até a 24ª semana de gestação (Rai e Regan, 2006). Estima-se que 30% das concepções humanas sejam perdidas antes da implantação e outros 30% após a implantação, mas antes da ausência de menstruação, entre 3 e 4 semanas, o que geralmente se define como perdas pré-clínicas (Larsen *et al.*, 2013). Aproximadamente uma em cada quatro mulheres tem uma perda gestacional espontânea durante sua vida (Stephenson e Kutteh, 2007).

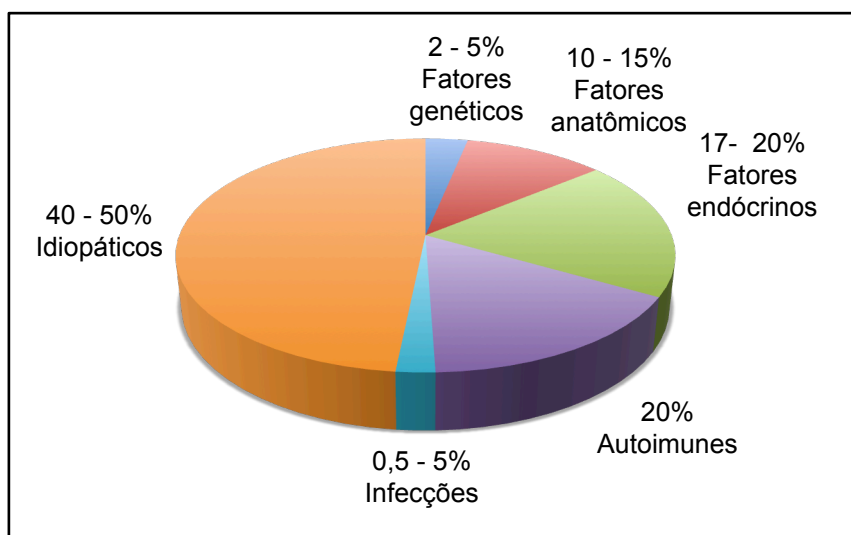
A incidência de abortamentos clínicos espontâneos é de cerca de 15 a 25% das gestações clínicas detectadas (ASRM, 2012). O risco de uma perda gestacional espontânea esporádica no primeiro trimestre da gestação varia com a idade, em mulheres com menos de 35 anos é de 9% a 12% (Wilcox *et al.*, 1988). Este risco aumenta com a idade, chegando a aproximadamente 50% aos 40 anos (Edmonds *et al.*, 1982).

Sabe-se que perdas gestacionais precoces são em parte fisiológicas, pois evitam o desenvolvimento de concepções afetadas por malformações estruturais ou alterações cromossômicas incompatíveis com a vida. Malformações fetais já foram observadas em taxas tão altas quanto 85% em estudos de perdas gestacionais precoces, com 75% desses fetos apresentando um cariótipo anormal (Philipp *et al.*, 2003). Assim, o processo da reprodução humana apresenta baixas taxas de eficiência, estima-se que apenas 30% das concepções resulte em um nascimento vivo (Larsen *et al.*, 2013).

## 1.2. Perdas gestacionais recorrentes

Em pelo menos 3% dos casais em idade reprodutiva as perdas gestacionais, ou abortamentos, são considerados recorrentes (Saravolos e Regan, 2014). A definição tradicional de abortamentos recorrentes (AR) costumava incluir casais com 3 ou mais perdas gestacionais consecutivas (ACOG, 2002). Atualmente, a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) define abortamentos recorrentes como duas ou mais interrupções de gestações clínicas (ASRM, 2012), não necessariamente consecutivas (Van Den Boogaard *et al.*, 2010). De 3 a 5% das mulheres irão sofrer duas ou mais perdas gestacionais, e apenas 1% sofrerá 3 ou mais (Stirrat, 1990).

AR é uma condição heterogênea que engloba casais com diferentes histórias reprodutivas e um grande número de circunstâncias (Christiansen *et al.*, 2005). A etiologia dos AR é extremamente diversa, incluindo anormalidades genéticas, imunológicas, anatômicas, endócrinas, infecciosas e uterinas (**Figura 1**). Em aproximadamente 50% dos AR, a etiologia não é encontrada, podendo ser chamada de idiopática (Li *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Etiologia dos abortamentos de repetição (adaptado de Ford e Schust, 2009).

As anormalidades anatômicas, como malformações congênitas, aderências intrauterinas, pólipos e a insuficiência cervical, são responsáveis por 10 a 15% dos AR

(Ford e Schust, 2009). Entre as anormalidades anatômicas encontradas, a presença de septo uterino é a mais comum e está associada a taxa de abortamento espontâneo de 65% (Sugiura-Ogasawara *et al.*, 2011). Isso se deve a sua má vascularização, que compromete o crescimento placentário e também pode ocasionar redução do crescimento fetal por distorcer a cavidade uterina (Brezina e Kutteh, 2014). Outras anormalidades congênitas, como útero didelfo e útero bicorno são mais frequentemente associadas a perdas gestacionais tardias e a partos prematuros, assim como à insuficiência cervical (Brezina e Kutteh, 2014).

Alterações endócrinas causam até 20% dos AR (Ford e Schust, 2009). Entre as causas mais comuns destacam-se: a deficiência da fase lútea, o hipotireoidismo não tratado, metabolismo anormal da glicose e a hiperprolactinemia. Certos agentes infecciosos são identificados mais frequentemente em mulheres com AR, tais como *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, e *Chlamydia*. Especula-se que estes sejam agentes causadores de 0,5 a 5% dos AR, embora mais estudos devam ser realizados para confirmar a causalidade (Ford e Schust, 2009; Brezina e Kutteh, 2014).

Anormalidades cromossômicas são identificadas em 29 a 60% dos restos fetais de abortamentos, mas essa incidência diminui quando aumenta o número de perdas gestacionais, sugerindo que outros mecanismos são a causa de perdas em casais com AR (Ogasawara *et al.*, 2000). Ou seja, pacientes com AR têm em geral um menor risco de perdas gestacionais aneuploides do que mulheres com perdas esporádicas (Sullivan *et al.*, 2004). Uma anormalidade cromossômica em um dos parceiros com AR é encontrada em 3 a 6% dos casais (Branch *et al.*, 2010). Os achados mais comuns são translocações balanceadas e inversões sem consequências para o fenótipo do portador, mas que levam a um risco de até 50% de ter um feto com uma anormalidade cromossômica não balanceada que pode levar a um abortamento (Larsen *et al.*, 2013).

As trombofilias hereditárias, especialmente as mutações nos genes do Fator V de Leiden, da protrombina, da proteína C e da proteína S, já foram estudadas como possíveis causas de perdas gestacionais (Preston *et al.*, 1996). No entanto, sua associação não foi confirmada por estudos de coorte prospectivos (Dizon-Townson *et al.*, 2005; Silver *et al.*, 2010) e seu uso como rotina não é aconselhado (ASRM, 2012). Estudos prévios de nosso grupo não revelaram associação entre trombofilias hereditárias e AR (Dutra *et al.*, 2014).

Fatores ambientais também podem contribuir para a dificuldade reprodutiva. Embora seja difícil quantificar a exposição dos indivíduos a determinados agentes, existem aqueles que já foram comprovadamente associados às perdas gestacionais. Além de reduzir a fertilidade, o consumo moderado de cigarro (10 a 20 unidades por dia) está associado a um maior risco de placenta prévia, sangramentos durante a gestação, ruptura placentária e abortamentos espontâneos (Gardella e Hill, 2000). O consumo de álcool parece ter efeito dose-dependente e também está associado a um maior risco de perdas gestacionais (Gardella e Hill, 2000). Quando o álcool é associado ao cigarro, a chance de perda gestacional pode aumentar em até 4 vezes (Brezina e Kutteh, 2014).

Outro fator de estilo de vida importante é a obesidade. Um índice de massa corporal superior a 30 é um fator de risco independente para abortamentos e essa associação aumenta para índices superiores a 40 (Smith e Schust, 2011). Embora a causa desse fenômeno não seja clara, é possível que esteja relacionada ao aumento das respostas inflamatórias generalizadas evidenciado em pessoas obesas (Johnson *et al.*, 2012).

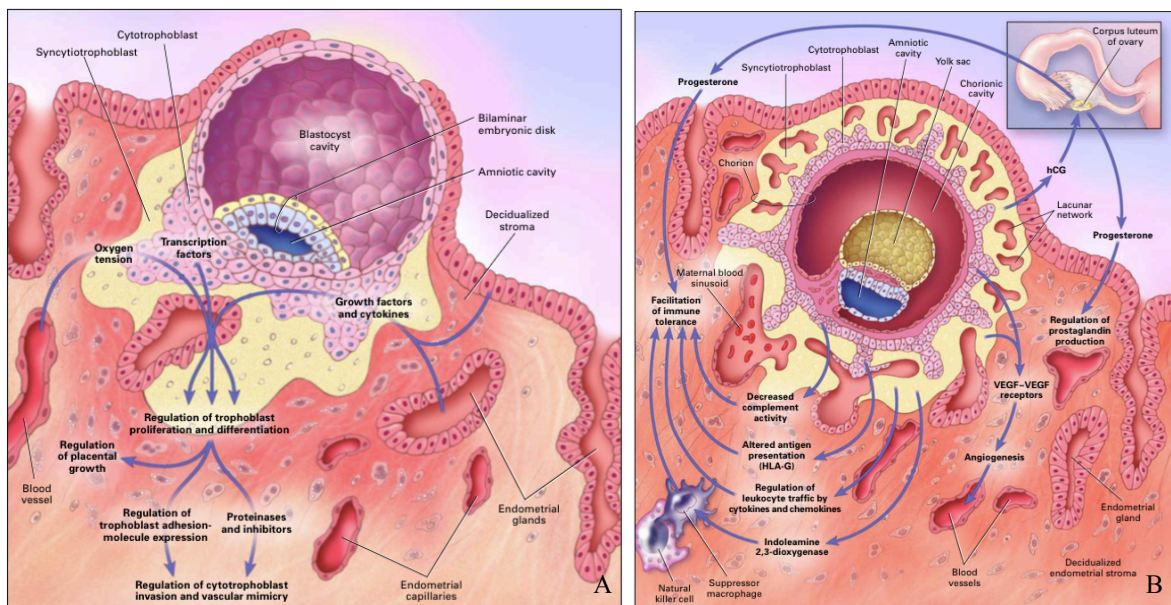
Ainda se tenta compreender como o embrião e o trofoblasto escapam da rejeição materna no útero. Falhas em mecanismos que regulam o reconhecimento materno e a expressão de antígenos (Calleja-Agius *et al.*, 2012; Christiansen *et al.*, 2012) poderiam levar a AR. Marcadores de importância na desregulação imunológica na gestação são encontrados em frequência aumentada em mulheres com AR e têm impacto negativo em seu prognóstico (Larsen *et al.*, 2013). Em pacientes com AR idiopático, variantes polimórficas de genes relacionadas a esses processos são propostas como possíveis fatores de susceptibilidade que aumentariam o risco de perdas gestacionais quando comparadas a mulheres saudáveis.



### 1.3. Desenvolvimento da gestação

A fertilização ocorre nas tubas uterinas 24h a 48h após a ovulação. Os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário ocorrem enquanto o embrião percorre a tuba uterina. O embrião chega à cavidade uterina em estágio de mórula e passa pela transição ao estágio de blastocisto. O trofoblasto, que consiste nas células da superfície do blastocisto, dará origem aos anexos embrionários, e à massa celular interna, que corresponde ao embrião propriamente dito. A implantação embrionária ocorre cerca de sete dias após a fertilização (Lessey, 2000; Norwitz *et al.*, 2001; Paria *et al.*, 2002).

Dessa forma, a implantação embrionária é um processo sincronizado de desenvolvimento do embrião no estágio de blastocisto e a transição do endométrio uterino para um estado receptivo (**Figura 2A**). O estado receptivo do útero, ou janela de implantação, é definido como o período de tempo limitado em que o ambiente uterino pode incitar a implantação de um blastocisto competente (Cha *et al.*, 2012). Em humanos, a janela de receptividade endometrial é breve, e a implantação fora desse período pode resultar em alterações na decidualização e na placentação, causando complicações durante a gestação (Wilcox *et al.*, 1999).



**Figura 2.** (A) A implantação do blastocisto e os processos necessários para a invasão endometrial. (B) Manutenção da gestação inicial (Norwitz *et al.*, 2001)

O endométrio é formado por duas camadas celulares, as células estromais e as células do epitélio. Durante a janela de implantação, as células estromais transformam-se em grandes células arredondadas (decidualização), as glândulas secretórias se desenvolvem e emergem microvilos no epitélio (Dunn *et al.*, 2003). Simultaneamente, ocorre a expressão de diferentes citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão, além de maior vascularização do tecido endometrial (Dekel *et al.*, 2014).

O período gestacional inicial requer uma forte resposta inflamatória. Durante o início da implantação, o blastocisto adere e causa danos ao epitélio endometrial para que ocorra a invasão e, posteriormente, o trofoblasto remodela as artérias espiraladas materna para assegurar o fluxo sanguíneo adequado (Mor *et al.*, 2011). O desenvolvimento de uma rede vascular funcional requer a cooperação de diferentes tipos celulares e vários fatores de crescimento durante a implantação e desenvolvimento embrionário (Su *et al.*, 2011).

O desenvolvimento placentário adequado requer vasculogênese, angiogênese e remodelamento arterial. A vasculogênese é o desenvolvimento de vasos sanguíneos a partir de células-tronco mesequimais, enquanto a angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos originados de vasos pré-existentes em resposta a demandas teciduais. O endométrio, a decídua e a placenta são ricos em fatores de crescimento angiogênicos (Reynolds *et al.*, 1992). Como o útero necessita de maior suprimento sanguíneo durante a gestação, sua vasculatura passa por mudanças adaptativas: vasodilatação, maior permeabilidade, crescimento e desenvolvimento de novos vasos (Reynolds *et al.*, 1992).

O fluxo sanguíneo arterial materno para a placenta só é completamente estabelecido após 10 a 12 semanas de gestação (Jauniaux *et al.*, 2000). Antes disso, as extremidades das artérias espiraladas encontram-se ocluídas por células do trofoblasto. O deslocamento dessas células permite que a circulação materna alcance o espaço intervilloso, triplicando a tensão de oxigênio depois das 10 semanas de gravidez (Rodesch *et al.*, 1992).

O estabelecimento da circulação placentária é associado a um aumento dos níveis de oxigênio na placenta, resultando na formação de espécies reativas oxigênio (EROs) e do nitrogênio (ERNs) (Jauniaux *et al.*, 2000). Em condições fisiológicas, esses radicais livres estão envolvidos na sinalização celular e proliferação. No entanto, a formação exacerbada de EROs pode levar ao desbalanço entre os sistemas pró-oxidantes e

antioxidantes das células e tecidos e ao *stress* oxidativo (Thannickal e Fanburg, 2000; Kim e Byzova, 2014). O *stress* oxidativo pode causar danos teciduais devido à peroxidação lipídica, modificações de aminoácidos e proteínas, e à oxidação do DNA.

Em gestações normais, o estabelecimento da circulação materno-fetal é um fenômeno progressivo, contudo, se ela ocorre precocemente, ou de forma desorganizada, pode causar perdas gestacionais (Jauniaux *et al.*, 2003b). O trofoblasto e as vilosidades são susceptíveis ao *stress* oxidativo, seu aumento pode causar degeneração do trofoblasto, dificultar a invasão do trofoblasto e inibir a angiogênese (Zhang *et al.*, 2002)

Dessa forma, alterações nas diferentes etapas da implantação e desenvolvimento da gestação podem levar a certas complicações, como crescimento intrauterino restrito, abortamento, morte fetal intrauterina, e pré-eclâmpsia (Reynolds *et al.*, 2010; Burton e Jauniaux, 2011).

#### 1.4. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF ou VEGFA) é um potente fator angiogênico e de sobrevivência de células endoteliais durante angiogênese fisiológica e tumoral, e tem funções na vasodilatação, permeabilidade vascular e como uma molécula anti-apoptótica (Ferrara e Davis-Smyth, 1997; Ferrara *et al.*, 2003). O gene *VEGFA* é membro da família de fator de crescimento VEGF que tem sete membros: *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *VEGFE*, *VEGFF* e *PLGF*. A proteína VEGF é uma glicoproteína que existe em 4 diferentes isoformas. Seu transcrito primário deriva do gene *VEGFA* que é constituído de 8 éxons separados por 7 íntrons, localizado no cromossomo 6 (Hoeben *et al.*, 2004).

A tensão de oxigênio tem papel-chave na regulação da expressão de uma variedade de genes. A expressão do mRNA *VEGFA* é induzida pela exposição a baixas tensões de oxigênio em diferentes circunstâncias fisiológicas e patológicas (Dor *et al.*, 2001). Fatores de crescimento como TGF-alfa, TGF-beta, IL-1 e FGF aumentam a expressão de *VEGFA*, sugerindo que a liberação parácrina ou autócrina desses fatores contribui com a tensão de oxigênio para a liberação de VEGF (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Citocinas inflamatórias, como IL-6, também induzem a expressão de *VEGFA*, reforçando a hipótese de que VEGF atua como um mediador de angiogênese e permeabilidade vascular em doenças inflamatórias (Neufeld *et al.*, 1999).

O VEGF tem papel essencial no desenvolvimento angiogênico fetal e placentário, camundongos que não expressam VEGF morrem *in utero* devido à formação vascular inadequada (Ferrara, 2004). Além disso, o VEGF tem papel crítico na maturação oocitária, na vascularização da decídua endometrial, na implantação e no desenvolvimento embrionário, na angiogênese e na vascularização no início da gestação (Krussel *et al.*, 2000; Vuorela *et al.*, 2000; Krussel *et al.*, 2001; Zygmunt *et al.*, 2003).

Devido a esses múltiplos papéis, o VEGF influencia todos os estágios da gestação, podendo interferir com seu desenvolvimento. Alterações na sua expressão foram associadas a abortamentos espontâneos em diferentes estudos (Galazios *et al.*, 2009; Al-Khateeb *et al.*, 2011). Diversos polimorfismos em *VEGF* podem afetar sua atividade e expressão, no entanto, estudos genéticos de associação são, até agora, inconclusivos (Papazoglou *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011). Genótipos e haplótipos de

polimorfismos em *VEGF* nas regiões -2578C/A, -1154G/A e -634G/C, cujas variantes polimórficas levariam à menor produção de VEGF, estão associados ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia (Luizon *et al.*, 2012; Valenzuela *et al.*, 2012).

## 1.5. Óxido nítrico (NO)

Nos últimos anos, o óxido nítrico (NO) emergiu como um dos mais diversos e importantes mediadores biológicos. Ele tem papel em diferentes processos, desde a função neurológica até a tonicidade vascular e a erradicação de patógenos. O NO em concentrações fisiológicas (baixas) controla a vasodilatação, a regeneração endotelial e a regulação do fluxo sanguíneo aos tecidos. Além disso, inibe agregação plaquetária e leucocitária, atenua a respiração mitocondrial, a apoptose e o *stress* oxidativo, além de aumentar a resposta angiogênica à isquemia tecidual (Papapetropoulos *et al.*, 1997).

A maior parte do óxido nítrico (NO) em mamíferos é derivado das enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Essa família de enzimas converte a arginina em citrulina e NO. Existem três isoformas de NOS: duas constitutivas (óxido nítrico sintase neuronal ou nNOS e óxido nítrico sintase endotelial ou eNOS), enquanto a terceira é induzível (óxido nítrico sintase induzível ou iNOS). Essas 3 isoformas são reguladas diferentemente em nível transcricional, traducional, pós-traducional e bioquímico (Stuehr *et al.*, 2004). As maiores diferenças entre essas isoformas são a duração da geração de NO e a concentração local que pode ser produzida (Guzik *et al.*, 2003). As formas constitutivas das NOS são dependentes de cálcio e promovem pequenos picos de produção de NO, enquanto a forma induzível é independente, está permanentemente ativada e consegue gerar NO por longos períodos de tempo (Ignarro, 2010).

O NO é um mediador de sinalização com atividades biológicas diversas e por vezes opostas, mesmo em situações patológicas similares. A complexidade de suas respostas possíveis reflete a variedade de suas reações químicas e de suas propriedades biológicas (Ignarro, 2010). Respostas celulares específicas são determinadas por concentrações específicas de NO. Em geral, concentrações mais baixas promovem sobrevivência celular e proliferação, enquanto níveis mais altos e persistentes têm ações citotóxicas, favorecem reações inflamatórias, parada do ciclo celular e morte celular (Zamora *et al.*, 2000).

Diferentemente das interações entre receptores e proteínas, o NO é uma molécula diatômica que busca a formação de ligações covalentes (Ignarro, 2010). Assim, sua química e das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) é rica e diversa, promovendo tanto ações regulatórias e patológicas. Existem evidências de que o *stress* oxidativo pode

contribuir para a disfunção endotelial. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela NOS na ausência de seu substrato, em conjunto com ERN, pode exceder a defesa antioxidante disponível que inativa as EROs, resultando na diminuição da bioatividade de NO (Aktan, 2004; Ignarro, 2010).

Em eNOS, o polimorfismo Glu298Asp (+894G/T), que leva a uma alteração conformacional da enzima eNOS, foi associado à baixa produção de NO (Karvela *et al.*, 2008). A produção reduzida de NO pode levar à perfusão placentária deficiente e comprometer o suprimento de oxigênio e nutrientes ao feto, o que pode afetar sua habilidade de resistir à rejeição materna no início da gestação (Di Simone *et al.*, 2003). O polimorfismo Glu298Asp reduziria a atividade de eNOS e afetaria os metabólitos de NO na circulação, levando à perfusão placentária insuficiente e ao acúmulo de homocisteína, resultando em descolamento placentário devido à vascularização defeituosa das vilosidades coriônicas e indução da apoptose do trofoblasto, levando ao abortamento (Cao *et al.*, 2014).

O gene humano da *iNOS* (*NOS2*) está localizado no cromossomo 17 e é constituído por 43.764 pb. A expressão de *iNOS* é principalmente regulada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. As grandes quantidades de NO produzidas pela *iNOS* podem ter efeitos benéficos antimicrobianos, antivirais, antiparasitários e antitumorais (Zamora *et al.*, 2000). Em contraste, a indução aberrante de *iNOS* pode ter consequências negativas e parece estar envolvida na fisiopatologia de diferentes doenças humanas como asma, artrite, esclerose múltipla, psoríase, doenças neurodegenerativas, desenvolvimento tumoral e choque séptico, além da rejeição de transplantes (Kroncke *et al.*, 1998; Zamora *et al.*, 2000).

Sítios de ligação de fatores de transcrição são importantes para a indução da atividade promotora de *iNOS* (Pautz *et al.*, 2010). Estudos descreveram aumento da atividade basal de *iNOS* de 5 a 50 vezes após indução com citocinas (De Vera *et al.*, 1996; Chu *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2003; Takamiya *et al.*, 2008). É possível que essa grande variação ocorra devido a polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora (Pautz *et al.*, 2010).

Alterações na expressão de *iNOS* em doenças vasculares e na hipertensão já foram descritas, além de diferenças em sua susceptibilidade na presença de variantes polimórficas da *iNOS* (Oliveira-Paula *et al.*, 2013). A gestação induz a expressão de *iNOS*

em células musculares lisas (Bansal *et al.*, 1997). Sua expressão aumentada derivada de células endoteliais da placenta em hipoperfusão e do miométrio foi associada à pré-eclâmpsia (Bhatnagar *et al.*, 2007).

Além disso, altas concentrações de NO podem promover a fosforilação de p53, resultando no seu acúmulo e na indução da apoptose (Ambs *et al.*, 1998; Hussain *et al.*, 2003). Essas observações sugerem que baixas concentrações de NO favorecem respostas pró-crescimento e anti-apoptóticas enquanto altas concentrações favorecem rotas que levam à parada do ciclo celular e à apoptose. Em camundongos, o NO endógeno inibe o crescimento de células tumorais sem mutação em *Tp53*, e induz a expressão de *Vegf* e angiogênese em células com mutação em *Tp53* (Ambs *et al.*, 1998).

A hipótese de que radicais livres têm um papel em perdas gestacionais vem de estudos que mostram seu papel em relação a modificações proteicas estruturais e funcionais, além de dano ao DNA (Rodesch *et al.*, 1992; Jauniaux *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 2000; Burton e Jauniaux, 2011).



## 1.6. Prostaglandina endoperóxido sintase (PTGS)

Prostaglandinas (PGs) são produzidas a partir do ácido araquidônico pelas enzimas prostaglandina endoperóxido sintases (PTGS), também conhecidas como ciclo-oxigenases (COX) (Smith *et al.*, 2011). Existem duas isoformas de PTGS, a constitutiva PTGS1 (COX-1) e induzível PTGS2 (COX-2), que têm diferentes distribuições e padrões de expressão. O gene *PTGS2* está localizado no cromossomo 1 e é composto de 10 éxons. Polimorfismos em sua região promotora foram associados com menor atividade promotora (Salazar *et al.*, 2010).

PGs participam da regulação da fisiologia vascular, da angiogênese e da manutenção do tônus vascular, além de ter funções na proliferação e na diferenciação celular, além da imunomodulação (Wang *et al.*, 2010). Mais especificamente, as PGs têm papel indispensável no fenômeno pró-inflamatório da implantação, principalmente no aumento da permeabilidade vascular do endométrio no sítio da implantação (Lim *et al.*, 1997).

As enzimas COX-2 e iNOS são co-expressas em contextos pró-inflamatórios como resultado de sua indução por células polimorfonucleares e macrófagos (Wu, 1995). Além disso, o NO é um importante regulador da atividade e da expressão de COX-2, embora o mecanismo pelo qual a regulação ocorre não esteja totalmente elucidado (Perez-Sala e Lamas, 2001). Sugere-se que a capacidade oxidativa das duas enzimas seja capaz de gerar quantidades tóxicas de EROs e ENRs, que amplificam e perpetuam cenários inflamatórios (Perez-Sala e Lamas, 2001), podendo interagir durante a implantação embrionária.

Grande parte das perdas gestacionais ocorre entre 8 e 12 semanas de gestação, ou seja, pode resultar de alterações na fase final da implantação, em que a COX-2 tem papel-chave (Wang *et al.*, 2010). Nessa fase, a sinalização através da COX-2 pode promover a expressão de *VEGF*, afetando a angiogênese (Gallo *et al.*, 2001).

Fêmeas de camundongos *Ptgs2*<sup>-/-</sup> apresentam falha de implantação, alterações na ovulação, fertilização, decidualização e placentação, elucidando os papéis de sinalização das PGs derivadas da COX-2 em diferentes estágios da gestação (Lim *et al.*, 1997; Marions e Danielsson, 1999).

## 1.7. Família p53

A p53 é uma proteína supressora tumoral que tem papel importante na regulação do ciclo celular, da apoptose e de proteção do genoma à hipóxia (Smeenk e Lohrum, 2010). Além dessas funções, a p53 está envolvida na angiogênese e no desenvolvimento embrionário, pois interage com muitas proteínas relacionadas ao controle de crescimento, à inflamação e à regulação da transcrição. Polimorfismos funcionais de base única em p53 podem alterar sua transcrição e foram associados à susceptibilidade a diferentes tipos de câncer (Vogelstein *et al.*, 2000).

Em vertebrados, a família p53 de genes inclui 3 genes que codificam as proteínas p53, p63 e p73. Embora tenham sido identificados mais tarde, os genes *TP63* e *TP73* seriam ancestrais ao *TP53* (Nedelcu e Tan, 2007).

Estudos têm mostrado a relevância da p53 na reprodução, ao mesmo tempo que camundongos machos *Trp53<sup>-/-</sup>* apresentam reprodução normal, as fêmeas com essa deleção mostram menor potencial reprodutivo e menor tamanho da ninhada (Hu *et al.*, 2007). Isso ocorreria devido ao papel essencial da p53 como um sinal de *stress* que induz a expressão de diversos genes necessários para o início e estabelecimento da implantação embrionária (Mojarrad *et al.*, 2013). A regulação da reprodução materna e da implantação de blastocistos por p53 é realizada através do gene-alvo que codifica o fator inibitório da leucemia (LIF) (Hu *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2008; Hu, 2009). LIF tem papel essencial crucial na implantação embrionária (Chen *et al.*, 2000).

Em humanos, o SNP em *TP53* codon72 foi encontrado em frequência aumentada em pacientes submetidas à fertilização *in vitro* (FIV) quando comparadas a mulheres férteis. As pacientes apresentaram maior risco de falha de implantação e menores taxas de gestação (Kang *et al.*, 2009). Esse polimorfismo foi também associado a menores taxas de expressão de LIF *in vitro*, o que pode explicar a redução de fertilidade encontrada nas pacientes submetidas à FIV (Kang *et al.*, 2009).

A p63 tem papel importante na apoptose induzida por danos ao DNA em folículos primordiais da linhagem germinativa feminina (Suh *et al.*, 2006). Ela monitora o reparo a danos no DNA e induz a apoptose de maneira independente de p53 (Hu, 2009). Além disso, sua expressão é essencial para a formação dos membros durante o desenvolvimento embrionário (Yang *et al.*, 1999).

A p73 também tem papéis importantes na reprodução e no desenvolvimento. Camundongos *Ip73<sup>-/-</sup>* apresentam defeitos de desenvolvimento e têm altas taxas de mortalidade, adicionalmente machos não se interessam por fêmeas sexualmente maduras e são inférteis (Yang *et al.*, 2000). A p73 tem duas isoformas principais, a TAp73, que tem o domínio TA e é altamente homóloga à p53, e a deltaNp73, que não tem o domínio TA. Camundongos fêmeas *TAp73<sup>-/-</sup>* têm oócitos de má qualidade e apresentam fenótipo de infertilidade (Tomasini *et al.*, 2008). A expressão de *TAp73* em oócitos diminui com a idade, oócitos de fêmeas *TAp73<sup>-/-</sup>* jovens tem anormalidade de *spindle* do que fêmeas *wild type* mais velhas (Tomasini *et al.*, 2008), evidenciando o envolvimento da TAp73 na manutenção da estabilidade genômica em células germinativas femininas.

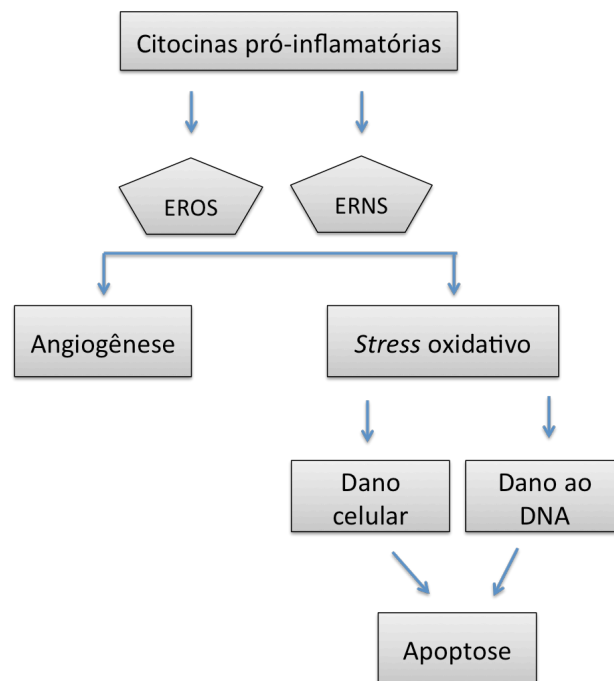
## 1.8. Fator inibitório da leucemia (LIF)

O fator inibitório da leucemia (LIF) tem papel essencial na implantação embrionária. Sua expressão é contínua no útero, embora sofra picos durante a implantação (Mojarrad *et al.*, 2013). O LIF é secretado por glândulas endometriais no lúmen uterino e se liga a receptores em células epiteliais, preparando o útero para ser receptivo à implantação embrionária (Hu, 2009).

Identificou-se que *TP53* tem um sítio de ligação específico no promotor de *LIF* e regula sua transcrição basal e induzível (Feng *et al.*, 2011). Camundongos com a deleção de *Trp53*<sup>-/-</sup> apresentam níveis mais baixos de LIF uterino e falhas na implantação, sugerindo que mutações no gene *Trp53* podem levar a ausência de expressão de LIF na implantação embrionária (Hu *et al.*, 2007). Injeções de LIF exógeno nesses animais aumentam significativamente as taxas de implantação e restauram a fertilidade (Hu *et al.*, 2007).

## 1.9. Justificativa

Em grande parte dos casos, os AR não têm uma etiologia determinada. Embora novas abordagens continuem surgindo, AR se apresentam como uma condição heterogênea e sua investigação é imprescindível. Alterações na implantação e na placentação podem causar perdas gestacionais. O envolvimento de genes relacionados à inflamação, à implantação, ao *stress* oxidativo e à angiogênese poderiam estar envolvidos na etiologia dos AR. Variantes genéticas que alterem a expressão, a função ou a localização desses fatores poderiam afetar o risco aos AR. O estudo de fatores de suscetibilidade aos AR poderá auxiliar na sua prevenção e no manejo apropriado de gestações subsequentes de pacientes com histórico de AR.



**Figura 3.** Espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) podem inibir ou exacerbar a angiogênese e a apoptose, dependendo de suas concentrações, *background* genético e microambiente de ação (Figura adaptada de Hussain *et al.*, 2003).

**CAPÍTULO 2**  
**OBJETIVOS**

---

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a associação de variantes genéticas relacionadas à inflamação, à implantação, ao *stress* oxidativo e à angiogênese com abortamentos recorrentes.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Verificar a frequência de polimorfismos de base única nos genes *NOS2*, *PTGS2* e *VEGF* em mulheres com abortamentos recorrentes comparando com mulheres sem perdas gestacionais;

Analisar a relação entre os polimorfismos estudados e fatores ambientais na susceptibilidade às perdas gestacionais;

Comparar as frequências de polimorfismos de base única nos genes *TP53*, *TP63*, *TP73*, *LIF* e *NOS3* em mulheres com abortamentos recorrentes em relação a mulheres sem perdas gestacionais.

## **CAPÍTULO 3**

### **Maternal *iNOS* genetic polymorphisms in recurrent pregnancy loss**

---

Manuscrito em preparação para o periódico Fertility and Sterility



### **3. Maternal *iNOS* genetic polymorphisms in recurrent pregnancy loss**

#### **TITLE**

**Maternal *iNOS* genetic polymorphisms in recurrent pregnancy loss**

#### **AUTHORS**

Marcela Felix Fortis <sup>1</sup>

Thayne Woycinck Kowalski <sup>1</sup>

Lucas Rosa Fraga <sup>1</sup>

Fernanda Sales Luiz Vianna <sup>1,2,4</sup>

Rozana Oliveira Gonçalves <sup>3</sup>

Lavinia Schuler-Faccini <sup>1,2,4</sup>

Maria Teresa Vieira Sanseverino <sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Genetics Department, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 91501-970, Brazil.

<sup>2</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91.501-970, Brazil.

<sup>3</sup> Obstetrics, Gynecology and Human Reproduction Department, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, 40.110-100, Brazil.

<sup>4</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

#### **CAPSULE**

Investigation of genetic variants in the *iNOS* gene in recurrent pregnancy loss.

## STRUCTURED ABSTRACT

**Objective:** To investigate the association between inducible nitric oxide synthase (*iNOS*) genetic polymorphisms and recurrent pregnancy loss (RPL).

**Design:** Case-control-study.

**Setting:** Hospitals.

**Patients:** 149 RPL patients and 208 fertile control subjects.

**Intervention:** None.

**Main outcome measure:** Genotyping by polymerase chain reaction (PCR) of -1026C>A (rs2779249) and +2087G>A (rs2297518) *iNOS* polymorphisms.

**Results:** *iNOS* polymorphism -1026C>A (rs2779249) was significantly associated with RPL risk (OR 1.92, 95% CI 1.18-3.11; p= 0.008). Polymorphic allele carrier frequencies for +2087G/A did not differ between groups (OR 1.52, 95% CI 0.93-2.48; p= 0.084).

**Conclusion:** The functional polymorphism -1026C>A in the *iNOS* promoter is a potential risk factor for recurrent pregnancy loss, possibly due to oxidative stress mechanisms. This was the first study to investigate the association of *iNOS* genetic variants and RPL.

## KEYWORDS

Recurrent pregnancy loss; recurrent miscarriage; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase (iNOS); oxidative stress

## INTRODUCTION

A miscarriage is the unintentional termination of a pregnancy before viability is reached and occurs in 15-25% of clinically recognized pregnancies and in approximately 50% of human conceptions (1, 2). Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined as two or more failed clinical pregnancies and affects 3% to 5% of the couples attempting to conceive (2). RPL has been attributed to maternal anatomic abnormalities as well as endocrine, immune and genetic factors. No underlying cause for RPL can be identified in approximately 50% of cases, and thus, these cases are considered unexplained RPL (3).

Considerable evidence implicates overwhelming placental oxidative stress (OS) as a causative factor for spontaneous pregnancy loss (4). Oxidative stress, which is the imbalance between pro-oxidants and antioxidants, is caused by increased levels of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (4). The imbalance can result either from decreased antioxidant activity, OS-induced inflammatory processes and premature onset of the oxidative burst in the placenta (5).

The nitric oxide (NO) system plays important roles in reproductive physiology; it participates in the trophoblast invasion of the decidua, the regulation of the vascular reactivity of the fetal-placental circulation and the apoptosis of trophoblast cells (6). Although the effects of NO can be therapeutic, it can also lead to the excessive production of reactive nitrogen species (RNS), which can affect protein structure and function and can therefore cause changes in enzyme activity and impair cell signal transduction (7).

The nitric oxide synthase (NOS) enzyme catalyzes the formation of NO from O<sub>2</sub> and L-arginine and is composed of the following three isoforms: neuronal NOS (nNOS or NOS1), inducible NOS (iNOS or NOS2) and endothelial NOS (eNOS or NOS3) (8). In general NO produced by nNOS and eNOS regulates physiological functions whereas iNOS is more active in inflammatory and pathological conditions (9).

Previous studies have focused on the possibly impaired NO production in patients with *eNOS* genetic variants leading to inconclusive results regarding its role as a risk factor for RPL (10-13). However, no previous studies have investigated the hypothesis that *iNOS* polymorphisms could lead to the excessive production of NO and thereby OS in RPL patients, even though it was assessed in preeclampsia patients with conflicting results (14,

15). In view of the importance of OS in human pregnancy we examined the association between *iNOS* genetic polymorphisms and susceptibility to RPL.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Subjects*

This case-controlled study and the use of human subjects for its completion were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Porto Alegre, RS, Brazil) under the number #11-242. Each subject provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

Women with RPL were identified through referral from the Prenatal Diagnosis Clinic of the Medical Genetics Service at Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Porto Alegre, RS, Brazil) and the department of Obstetrics and Gynecology at Hospital Femina (Porto Alegre, RS, Brazil) in collaboration with the department of Obstetrics and Gynecology at Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brazil) from 2000 to 2011. Inclusion criteria comprised 2 or more unexplained pregnancy losses prior to 24 weeks gestation with the same partner. Clinical evaluation for recognized causes of RPL were performed as previously described (16, 17), including hysteroscopy, laparoscopy, ultrasound, hormonal determination status (gonadotrophins, FSH, LH, prolactin, thyroid hormones and thyroperoxidase), parental karyotype examination and heritable thrombophilia investigation. Women were excluded from the study if testing indicated a potential etiology for RPL.

The control sample included fertile women with a history of at least one uncomplicated, live term birth, no pregnancy losses and no major medical problems. Demographic information, medical and obstetrical histories were also evaluated for both groups.

### *Genotype and haplotype determination*

Maternal cells for DNA extraction were obtained through saliva collection using the Oragene<sup>®</sup> kit (DNA Genotek Inc., Kanata, Ontario, Canada) and DNA was extracted in

accordance with the manufacturer's instructions. Individuals were genotyped for -1026C>A (rs2779249) and +2087G>A (rs2297518, assay ID C\_11889257-10) single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *iNOS* gene by Taqman Allelic Discrimination Assays (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, United States of America). Primers and probes for the -1026C>A SNP were customized according to previous studies (18). Real-Time PCR was conducted as specified by the manufacturer for the StepOnePlus™ Real-Time System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, United States of America). The StepOne v.2.3 software (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, United States of America) was used to determine the sample genotypes. Linkage disequilibrium (LD) analysis was performed using Haploview 4.2 (Broad Institute, Cambridge, Massachusetts, United States of America), and PHASE v.2.1 (Stephens Lab, Chicago, Illinois, United States of America) was used for Bayesian haplotype estimation.

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses were conducted with the SPSS version 17.0 software. The distribution of genotypes for each polymorphism was assessed for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium using the Chi-square test. The clinical characteristics were compared by Chi-square, Student's unpaired t-test and the Mann-Whitney test. Genotype, haplotype and allele frequencies were compared between groups using Chi square and Fisher's exact test. Logistic regression analysis was performed to adjust for confounding factors and to determine the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

Table 1 summarizes the characteristics of the 149 RPL patients and the 208 controls. The RPL patients have a significantly higher number of pregnancies ( $p=0.027$ ) and alcohol consumption ( $p=0.002$ ).

Hardy-Weinberg equilibrium analysis showed no deviation from the expected frequencies for the two polymorphisms studied (data not shown). There were no significant differences in the genotype and allele distribution for the -1026C/A promoter region SNP and +2087G/A, among RPL patients and controls (Table 2). The RPL risk was significantly associated with the -1026C>A variant genotypes when compared with the CC genotype ( $p=0.037$ ) (Table 3). The increased risk remained significant after p-value adjustment for number of pregnancies and drinking ( $p=0.008$ ). Haplotype analysis revealed a higher frequency of the A A haplotype in RPL cases compared with control women, but the difference was not statistically significant (Table 4).

**Table 1.** Demographics and clinical characteristics of recurrent pregnancy loss (RPL) patients and controls.

<b>Parameters</b>	<b>RPL</b>	<b>Control</b>	<b><i>p</i></b>
<b>N</b>	149	208	--
<b>Age at first pregnancy <sup>a</sup></b>	23.73 ±4.7	22.04 ±7.5	0.347
<b>Number of pregnancies <sup>a</sup></b>	3.67 ±1.7	2.5 ±1.4	0.027
<b>Spontaneous miscarriages <sup>a</sup></b>	3.28 ±1.6	0	--
<b>Smoking (%)</b>	23 (15.4)	38 (18.3)	0.569
<b>Alcohol consumption (%)</b>	60 (40.3)	51 (24.5)	0.002
<b>Ethnicity [n(%)]</b>			0.912
<b>African descent</b>	56 (37.6)	76 (36.5)	
<b>European descent</b>	93 (62.4)	132 (63.5)	
<b>Couple consanguinity (%)</b>	4 (2.7)	1 (0.5%)	0.164

<sup>a</sup>Mean + SD.

**Table 2.** *iNOS* genotype and allele frequencies in recurrent pregnancy loss (RPL) patients and controls.

Polymorphism	Genotype/Allele	RPL		Control		P-Value
		N	(%)	n	(%)	
-1026C>A (rs2779249)	CC	53	(35.6)	97	(46.6)	0.120
	CA	72	(48.3)	84	(40.4)	
	AA	24	(16.1)	27	(13.0)	
	C	178	(59.7)	278	(66.8)	0.052
	A	120	(40.3)	138	(33.2)	
+2087G>A (rs2297518)	GG	94	(63.1)	146	(70.2)	0.149
	GA	50	(33.6)	60	(28.8)	
	AA	5	(3.4)	2	(1.0)	
	G	238	(79.9)	352	(84.6)	0.099
	A	60	(20.1)	64	(15.4)	



**Table 3.** Genotype frequencies and the corresponding risk estimates for recurrent pregnancy loss (RPL).

	<b>RPL</b> N (%)	<b>Controls</b> N (%)	<b>Univariate analysis</b> <b>OR (CI 95%)</b>	<b>p</b>	<b>Multivariate analysis</b> <b>OR (CI 95%)</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
-1026C>A carrier CA/AA	96 (64.4)	111 (53.5)	1.58 (1.03-2.44)	0.037	1.92 (1.18-3.11)	0.008
+2087G>A carrier GA/AA	55 (36.9)	62 (29.8)	1.38 (0.89-2.15)	0.159	1.52 (0.93-2.48)	0.097

<sup>a</sup> Adjusted for number of pregnancies and drinking.

**Table 4.** Haplotype analysis of -1026C>A and +2087G>A iNOS polymorphisms in recurrent pregnancy loss (RPL) patients and controls.

<b>Haplotype</b>	<b>Total frequency</b>	<b>RPL</b>	<b>Controls</b>	<b>p</b>
C G	0.588	0.550	0.615	0.82
C A	0.053	0.054	0.0053	0.962
A G	0.238	0.248	0.231	0.587
A A	0.120	0.148	0.101	0.059

## DISCUSSION

In the present study, we report for the first time that the functional polymorphism -1026C>A in the *iNOS* promoter region is significantly associated with recurrent pregnancy loss. To our knowledge, there are currently no reports regarding *iNOS* genetic variants in spontaneous miscarriages and RPL.

*iNOS* expression is mainly controlled at the transcriptional level, previous studies in hypertension found that the -1026C>A variant allele is associated with an increase of 4.7 to 5.9-fold in *iNOS* promoter activity (19, 20). The rise in *iNOS* expression may lead to excessive NO production and, in turn, increase the production of peroxynitrite, a potent pro-oxidant. Peroxynitrite can cause DNA strand breaks and protein nitration, which can have no effect or cause a loss or a gain of protein function (4).

Low oxygen tension in the first trimester improves embryonic development and also stimulates the invasive potential of the trophoblast, possibly by reducing DNA and cell damage due to OS (21). The overproduction of ROS and RN such as nitric oxide and peroxynitrite can result in p53 protein phosphorylation and accumulation, causing cell apoptosis and impaired embryo invasion and placental proliferation. This supports the hypothesis that excessive NO production may have deleterious effects (22). Furthermore, derangements in placental development or partial degeneration have been associated with recurrent miscarriages and preeclampsia (23).

Previous studies evaluated the SNP -1026C>A in *iNOS* as a potential risk factor for hypertension (18), gestational hypertension (14) and preeclampsia (14). Nevertheless, this genetic variant didn't seem to affect the susceptibility to any of these disorders. Even though the +2087G>A polymorphism, an amino acid substitution from serine to leucine in exon 16, is thought to increase *iNOS* expression and was significantly associated with hypertension (18), lymphoma (24) and preeclampsia (14), it was not significantly associated with RPL. A larger sample size might be able to detect a small difference among groups for this variant.

While there were no significant associations between *iNOS* SNPs genotypes and haplotypes frequencies and RPL, there was a statistically significant difference in the frequency of women carrying the -1026A risk allele (CA/AA) in the RPL patients. Novel

studies assessing *iNOS* genetic variants and gene expression profiles in pregnancy would be valuable for understanding the biological mechanisms underlying RPL.

Alcohol consumption during pregnancy has been studied since the 1980s and its significant association with RPL in this study was not unprecedented (25). Alcohol may increase the production of prostaglandins, which can suppress cell division, leading to miscarriages in a dose-dependent manner (26). Due to the lack of information on alcohol consumption patterns in the present study, we were not able to establish accurate risk estimates for RPL relative to alcohol consumption. A more detailed evaluation of drinking and smoking habits could provide a better understanding on the effects of these substances in the risk for RPL.

In conclusion, we have shown that the functional polymorphism -1026C>A in the *iNOS* promoter is a potential risk factor for recurrent pregnancy loss, possibly due to OS augmentation. Further studies are required to expand our knowledge on developmental oxidative stress and inflammatory events during embryo implantation and pregnancy and also to corroborate the role *iNOS* polymorphisms play as a risk factor for RPL in different populations

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was funded by grants from *Instituto Nacional de Genética Médica Populacional* (INAGEMP) - CNPq573993/2008-4 and *Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos* of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (FIPE-HCPA).

## REFERENCES

1. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE *et al.* Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1988;319:189-94.
2. ASRM, American Society for Reproductive Medicine Practice Committee. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2012;98:1103-11.
3. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009;2:76-83.
4. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011;25:287-99.
5. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 2012;10:49.
6. Webster RP, Roberts VH, Myatt L. Protein nitration in placenta - functional significance. *Placenta* 2008;29:985-94.
7. Fujii J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:43.
8. Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 2004;279:36167-70.
9. Ignarro LJ. Nitric oxide : biology and pathobiology. 2nd ed. ed. Amsterdam: Elsevier, 2010.
10. Dutra CG, Fraga LR, Nacul AP, Passos EP, Goncalves RO, Nunes OL *et al.* Lack of association between thrombophilic gene variants and recurrent pregnancy loss. *Hum Fertil (Camb)* 2014;17:99-105.
11. Karvela M, Papadopoulou S, Tsaliki E, Konstantakou E, Hatzaki A, Florentin-Arar L *et al.* Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet* 2008;278:349-52.
12. Cao Y, Zhang Z, Xu J, Wang J, Yuan W, Shen Y *et al.* Genetic association studies of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a systematic and meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2014;41:3981-9.
13. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:803-12.

14. Amaral LM, Palei AC, Sandrim VC, Luizon MR, Cavalli RC, Duarte G *et al.* Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy. *J Hum Hypertens* 2012;26:547-52.
15. Bhatnagar S, Bhattacharjee J, Vaid M, Madan T, Trivedi SS, Sarma PU. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism in pre-eclampsia: a pilot study in North India. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2007;47:477-82.
16. Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, Vianna FS, Goncalves RO, Paskulin DD *et al.* p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Mol Biol Rep* 2014;41:1871-7.
17. Fraga LR, Boquett JA, Dutra CG, Vianna FS, Heck C, Goncalves RO *et al.* Interaction between TP63 and MDM2 genes and the risk of recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;182C:7-10.
18. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Coeli-Lacchini FB, Junior HM, Tanus-Santos JE. Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. *Gene* 2013;515:391-5.
19. Fu L, Zhao Y, Lu J, Shi J, Li C, Liu H *et al.* Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population. *J Hypertens* 2009;27:991-1000.
20. Li W, Liu H, Fu L, Li D, Zhao Y. Identification of Yin Yang 1-interacting partners at -1026C/A in the human iNOS promoter. *Arch Biochem Biophys* 2010;498:119-26.
21. Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez JG. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62:335-47; quiz 53-4.
22. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:276-85.
23. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2004;11:342-52.
24. Wang SS, Davis S, Cerhan JR, Hartge P, Severson RK, Cozen W *et al.* Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. *Carcinogenesis* 2006;27:1828-34.
25. Feodor Nilsson S, Andersen PK, Strandberg-Larsen K, Nybo Andersen AM. Risk factors for miscarriage from a prevention perspective: a nationwide follow-up study. *BJOG* 2014;121:1375-84.
26. Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol* 2002;37:87-92.

## **CAPÍTULO 4**

### **Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor genetic polymorphisms in recurrent miscarriage**

---

Manuscrito em preparação para o periódico Reproductive Sciences

## **4. Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor genetic polymorphisms in recurrent miscarriage**

### **TITLE**

Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor genetic polymorphisms in recurrent miscarriage

### **AUTHORS**

Marcela Felix Fortis <sup>1</sup>

Thayne Woycinck Kowalski <sup>1</sup>

Lucas Rosa Fraga <sup>1</sup>

Fernanda Sales Luiz Vianna <sup>1,2,4</sup>

Juliano Andre Boquett <sup>1</sup>

Rozana Oliveira Gonçalves <sup>3</sup>

Lavinia Schuler-Faccini <sup>1,2,4</sup>

Maria Teresa Vieira Sanseverino <sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Genetics Department, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 91501-970, Brazil.

<sup>2</sup> INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 91.501-970, Brazil.

<sup>3</sup> Obstetrics, Gynecology and Human Reproduction Department, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, 40.110-100, Brazil.

<sup>4</sup> Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was funded by grants from *Instituto Nacional de Genética Médica Populacional* (INAGEMP) - CNPq573993/2008-4 and *Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos* of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (FIPE-HCPA).



## ABSTRACT

Recurrent miscarriage (RM) affects approximately 5% of couples. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandins are suggested to modulate vascular endothelial growth factor (*VEGFA*) expression during angiogenesis and implantation. The aim of this study was to investigate if genetic variants in human *COX-2* and *VEGFA* are associated with RM.

This case control study recruited 149 cases and 208 fertile women. Subjects were genotyped for single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *PTGS2* -1290T/C and -1195T/C; and *VEGFA* -2578C/A, -1154G/A, -634G/C and +936C/T SNPs. Chi-square test, Student's t-test and Mann–Whitney U test were used compare the evaluated characteristics between groups.

Allele, genotype and haplotype frequencies did not differ among RM patients and controls. Deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium was detected in RM cases for -2578C/A *VEGF* promoter polymorphism. Since -2578A is linked to lower VEGF production, it might be associated with RM. The total number of pregnancies ( $p= 0.027$ ) and the history of alcohol use (OR 2.075, IC 1.32-3.27,  $p = 0.002$ ) were significantly higher in RM cases.

The concomitant investigation of lifestyle aspects in genetic association studies is vital, mainly because a proportion of miscarriages may be preventable by the modification risk factors. Further studies to investigate the influence *VEGFA* and *COX-2* polymorphisms in the risk of RM would benefit from the simultaneous evaluation of gene expression.

## KEYWORDS

Recurrent pregnancy loss; recurrent miscarriage; cyclooxygenase-2; vascular endothelial growth factor

## INTRODUCTION

Recurrent miscarriage (RM) is currently defined as two or more spontaneous pregnancy losses and affects approximately 5% of couples.<sup>1</sup> Up to 50% of RM cases do not have a clear etiology and are therefore termed unexplained recurrent miscarriages.<sup>2</sup>

An adequate vascularization and placental circulation are indispensable for the development of a normal pregnancy. Numerous cytokines and growth factors are implicated in the implantation process. Cyclooxygenase-2 (COX-2) or prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) is an inducible enzyme responsible for the production of prostaglandins, important mediators of inflammatory processes such as the embryo implantation.<sup>3</sup> *Cox-2*<sup>-/-</sup> mice present defective implantation and placentation, elucidating the significance of COX-2-derived prostaglandins during pregnancy.<sup>4, 5</sup> *COX-2* polymorphisms have been linked to preeclampsia and implantation failure.<sup>6, 7</sup>

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic factor and plays an important role, stimulating endothelial cell proliferation and enhancing vascular permeability during implantation.<sup>8</sup> Several single-nucleotide polymorphisms have been reported to alter *VEGFA* activity<sup>9</sup>, but their association with RM is inconclusive. Derangements in trophoblast invasion, placentation and angiogenesis have been implicated in miscarriage pathogenesis and other pregnancy complications.<sup>10</sup>

Considering that both COX-2 and prostaglandins are suggested to modulate *VEGFA* expression during angiogenesis and implantation<sup>11</sup>, the aim of this study was to investigate if genetic variants in the human *COX-2* and *VEGFA* genes are associated with RM.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Patients*

Women with RM were referred from the Prenatal Diagnosis Clinic of the Medical Genetics Service at Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Porto Alegre, RS, Brazil) and the Department of Obstetrics and Gynecology at Hospital Femina (Porto Alegre, RS, Brazil) in collaboration with the Department of Obstetrics and Gynecology at Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brazil). Patients with 2 or more idiopathic pregnancy losses prior to 24 weeks gestation with the same partner were included in the study.

Clinical evaluation for recognized causes of RM were performed as described previously<sup>12-14</sup> including hysteroscopy, laparoscopy, ultrasound, hormonal status (gonadotrophins, FSH, LH, prolactin, thyroid hormones and thyroperoxidase), parental karyotype examination and heritable thrombophilia investigation. Women were excluded from the study if examination suggested an etiology for RM. Controls subjects comprised fertile women with history of one or more uncomplicated live births, no pregnancy losses and no major medical problems. Demographic information, medical and obstetrical records were also assessed in both groups.

This case-control study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Porto Alegre, RS, Brazil) under the number #11-242. Written informed consent was obtained for each subject.

### *Genetic analysis*

Saliva was collected using Oragene<sup>®</sup> kit (Genotek) and DNA extraction performed in accordance to manufacturer's instructions. Subjects were genotyped by Taqman Allelic

Discrimination Assays (Applied Biosystems) for *PTGS2* single nucleotide polymorphisms (SNPs) -1290T/C (rs689465, assay ID C\_2517146\_10) and -1195T/C (rs689466, assay ID C\_2517145\_20); and *VEGFA* -2578C/A (rs699947, assay ID C\_8311602\_10), -1154G/A (rs1570360, assay ID C\_1647379\_10), -634G/C (rs2010963, assay ID C\_8311614\_10) and +936C/T (rs3025039, assay ID C\_16198794\_10) SNPs.

Real time PCR reaction procedures were performed as specified by StepOnePlus™ Real-Time System's (Applied Biosystems) manufacturer. Genotypes were determined by StepOne v.2.3 software and manually verified. Linkage disequilibrium (LOD) analysis was performed using Haploview 4.2 (Broad Institute). Bayesian haplotype estimation software PHASE v.2.1 (Stephens Lab) was employed for haplotype assessment.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed on SPSS v. 17 (International Business Machines, IBM). Clinical characteristics were compared by Chi-square for categorical data and Student's unpaired t-test or Mann-Whitney test for continuous data. Genotype distribution for each polymorphism was evaluated in RM and control women for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium using chi-square test. Genotype, haplotype and allele frequencies were compared by Pearson Chi-square or Fisher's exact test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

One hundred and forty nine RM patients and 208 fertile controls were included in the study. Clinical and demographic characteristics for patients and controls are shown in **Table 1**. RM women and controls had comparable age at first pregnancy, history of tobacco use and ethnicity frequency. Nonetheless the total number of pregnancies ( $p=0.027$ ) and the history of alcohol use (OR 2.075, IC 1.32-3.27,  $p = 0.002$ ) were significantly higher in RM cases.

With power of 80% and a 5% significance level, the minimal detectable odds-ratio for the investigated SNPs was 2.055. Allele frequencies and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) analysis can be viewed in **Table 2**. Two *PTGS2* and three *VEGFA* SNPs were in HWE, whereas -2578C/A *VEGFA* polymorphism significantly deviated from HWE in the RM group. Genotype and carrier frequency for the polymorphic alleles were not statistically different between RM patients and controls (**Table 3**).

Linkage disequilibrium was detected between the studied SNPs of *PTGS2* and for -2578C/A, -1154G/A and -634 G/C polymorphisms of *VEGFA* gene. Haplotype analysis revealed the presence of 3 haplotypes in *PTGS2* and 6 in *VEGFA*, only haplotypes with frequencies higher than 5% were compared (**Table 4**); no statistical difference was detected among the studied groups.

**Table 1.** Characteristics of recurrent miscarriage (RM) patients and controls.

<b>Characteristics</b>	<b>RM</b>	<b>Control</b>	<b><i>p</i></b>
<b>N</b>	149	208	--
<b>Age at first pregnancy <sup>a</sup></b>	23.73 ±4.7	22.04 ±7.5	0.347
<b>Number of pregnancies <sup>a</sup></b>	3.67 ±1.7	2.5 ±1.4	0.027*
<b>Spontaneous abortions <sup>a</sup></b>	3.28 ±1.6	0	--
<b>Smoking (%)</b>	23 (15.4)	38 (18.3)	0.569
<b>Alcohol consumption (%)</b>	60 (40.3)	51 (24.5)	0.002*
<b>Ethnicity [n(%)]</b>			0.912
<b>African descent</b>	56 (37.6)	76 (36.5)	
<b>European descent</b>	93 (62.4)	132 (63.5)	

<sup>a</sup>Mean + SD

\* Significant difference between RM cases and controls.

**Table 2.** Single-nucleotide polymorphisms studied in *PTGS2* and *VEGFA*, polymorphic allele frequencies (PAF) and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) analysis of recurrent miscarriage (RM) patients and controls.

Gene	SNP	Change	Effect	RM		Control		P-Value
				HWE	PAF	HWE	PAF	
<i>PTGS2</i>	rs689465	-1290T/C	undertermined	0.946	0.14	0.221	0.18	0.260
	rs689466	-1195T/C	↓ expression <sup>15</sup>	0.967	0.18	0.306	0.15	0.309
<i>VEGFA</i>	rs699947	-2578C/A	↓ expression <sup>16</sup>	0.002*	0.40	0.206	0.37	0.390
	rs1570360	-1154G/A	↓ transcription <sup>17</sup>	0.265	0.25	0.150	0.22	0.421
	rs2010963	-634 G/C	↓ translation <sup>17</sup>	0.094	0.35	0.204	0.34	0.811
	rs3025039	+936C/T	↓ expression <sup>18</sup>	0.390	0.11	0.980	0.14	0.365

\* Significant deviation from HWE in RM cases.

**Table 3.** Genotype frequencies of *VEGFA* and *PTGS2* polymorphisms in recurrent miscarriage (RM) patients and healthy controls.

SNP	Genotypes	RM		Control		p
		N	%	n	%	
<b><i>PTGS2</i></b>						
-1290T/C (rs689465)	CC	3	(2.0)	4	(1.9)	0.385
	TC	37	(24.8)	66	(31.8)	
	TT	109	(73.2)	138	(66.3)	
	CC+CT	40	(26.8)	70	(33.7)	
-1195T/C (rs689466)	CC	5	(3.4)	3	(1.4)	0.406
	TC	45	(30.2)	58	(27.9)	
	TT	99	(66.4)	147	(70.7)	
	CC+CT	50	(33.6)	61	(29.3)	
<b><i>VEGFA</i></b>						
-2578C/A (rs699947)	AA	33	(22.1)	32	(15.4)	0.207
	AC	53	(35.6)	88	(42.3)	
	CC	63	(42.3)	88	(42.3)	
	AA+AC	86	(57.7)	120	(57.7)	
-1154G/A (rs1570360)	AA	12	(8.1)	14	(6.7)	0.707
	GA	51	(34.2)	65	(31.3)	
	GG	86	(57.7)	129	(62.0)	
	AA+GA	63	(42.3)	79	(38.0)	
-634 G/C (rs2010963)	CC	19	(12.8)	28	(13.5)	0.822
	GC	66	(44.2)	85	(40.9)	
	GG	64	(43.0)	95	(45.6)	
	CC+GC	85	(57.0)	113	(54.3)	
+936C/T (rs3025039)	TT	3	(2.0)	4	(1.9)	0.490
	CT	28	(18.8)	50	(24.1)	
	CC	118	(79.2)	154	(74.0)	
	TT+CT	31	(20.8)	54	(26.0)	



**Table 4.** Haplotype frequencies of *VEGFA* and *PTGS2* polymorphisms in recurrent miscarriage (RM) patients and healthy controls.

<b>Gene</b>	<b>Haplotype</b>	<b>Total</b>	<b>RM</b>	<b>Controls</b>	<b>p</b>
<i>PTGS2</i>	T T	0.669	0.671	0.668	0.936
	C T	0.167	0.185	0.154	0.277
	T C	0.164	0.144	0.178	0.232
<i>VEGFA</i>	C G C	0.338	0.346	0.332	0.698
	C G G	0.279	0.248	0.300	0.125
	A G C	0.234	0.252	0.221	0.342
	C A G	0.144	0.151	0.139	0.664

## DISCUSSION

A normal pregnancy comprises endometrial receptivity, embryo attachment and implantation, decidualization, angiogenesis and placentation. Derangements in any of these events can lead to uteroplacental circulation inefficiency and finally spontaneous miscarriage or other complications.

Our data suggests that there is no association between allele, genotype and haplotype frequencies of the studied *COX-2* and *VEGFA* genetic variants and recurrent miscarriages. However, a deviation from HWE was detected in RM cases for -2578C/A *VEGF* promoter polymorphism. The HWE deviation was independent of ethnicity and recruitment center (data not shown) and was also observed in Arabian cases of RM.<sup>19</sup> In our study, the -2578A/A homozygote genotype was more frequent in RM patients than expected. Since the -2578A allele was previously associated with lower VEGF production<sup>20</sup>, it might be associated with RM.

Another important result of our study is the association of alcohol use and RM. Even though we did not have detailed data on alcohol consumption pattern, history of drinking proved to be significantly higher in the RM group. Some investigations have reported more than 3-fold increased risk of first trimester spontaneous miscarriage for women with moderate drinking habits.<sup>21</sup> This finding brings to light the significance of lifestyle data in genetic association studies, most of which don't evaluate lifestyle-related risk factors for RM such as drinking alcohol and tobacco use. The concomitant investigation of lifestyle aspects is vital, mainly because a proportion of miscarriages may be preventable by the modification of risk factors.<sup>22</sup>

Previous studies reported that *VEGFA* -1154A reduces transcription and *VEGFA* -634G impairs *VEGFA* translation.<sup>17</sup> Nevertheless, more recent reports failed to associate -

2578C/A, -1154G/A and -634 G/C polymorphisms to serum VEGF protein levels.<sup>19</sup> Results on the significance of *VEGFA* SNPs in RM are highly heterogeneous and could be explained by ethnicity and geographic region variation.<sup>23</sup> In 2010 a meta-analysis selected four studies and *VEGFA*-1154G/A polymorphism was significantly associated with RM.<sup>24</sup> Conversely, a more recent meta-analysis selected the same studies and four others and could not confirm the previous finding.<sup>25</sup> Nonetheless, -634 G/C and +936C/T were associated with the risk of RM under dominant models.<sup>25</sup> The lack of association of RM with -634 G/C and +936C/T was also described in Greek<sup>26</sup> and Korean<sup>27</sup> women, in contrast with an American study.<sup>16</sup> These discrepant results may be due to conflicting inclusion and exclusion criteria, different sample sizes, the lack of influence of these polymorphisms in RM risk and the before mentioned ethnic variation.

COX-2 plays a critical role in implantation and it has been suggested that it can up-regulate *VEGF* expression and therefore modulate angiogenesis.<sup>11</sup> COX-2 over-expression can stimulate inflammation, inhibit apoptosis and angiogenesis, thus it can be involved in pregnancy loss. Higher COX-2 expression during the implantation window in endometrial tissue of women with RM was detected recently.<sup>28</sup> This was the first study to our knowledge to investigate the association of *PTGS2* variants and RM. It has been suggested that polymorphisms -1195T/C and -765G/C may reduce the risk for preeclampsia and endometriosis.<sup>7, 29</sup> Moreover, SNP -765G/C was associated with a higher risk for implantation failure in Chilean women.<sup>6</sup> Therefore, the role of *PTGS2* polymorphisms in recurrent pregnancy loss should be further investigated.

One possibility to explain the lack association of the studied *PTGS2* and *VEGFA* SNPs and RM is the complexity of the expression regulation pathway of embryo implantation and angiogenesis, which may have a more determinant role than genetic

variants. We also need to consider the fact that the embryo genotype for the genetic variants might be important in determining risk to RM.

Further studies to investigate the influence of VEGFA and COX-2 in the risk of RM would benefit from the simultaneous evaluation of genetic variants and gene expression. It is likely that the actual susceptibility for RM cannot be estimated only by few SNPs analysis, but through the interaction of genetic variability from different genes in the complex pathways that modulate embryo implantation, placentation and angiogenesis during pregnancy.

## REFERENCES

1. ASRM, American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility* 2012;98:1103-11.
2. Li TC, Iqbal T, Anstie B, Gillham J, Amer S, Wood K *et al.* An analysis of the pattern of pregnancy loss in women with recurrent miscarriage. *Fertility and sterility* 2002;78:1100-6.
3. Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 2002;296:2185-8.
4. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM *et al.* Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997;91:197-208.
5. Marions L, Danielsson KG. Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Molecular human reproduction* 1999;5:961-5.

6. Salazar LA, Inostroza M, Jara C, Vega F, Garcia R, Ciuffardi I *et al.* Association of -765G>C polymorphism of the COX-2 gene with recurrent embryo implantation failure in Southern Chilean women. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2010;411:1822-4.
7. Gurdol F, Cakmakoglu B, Dasdemir S, Isbilen E, Bekpinar S, Isbir T. -765 G-->C and -1195 A-->G promoter variants of the cyclooxygenase-2 gene decrease the risk for preeclampsia. *Genetic testing and molecular biomarkers* 2012;16:435-8.
8. Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Human reproduction* 2000;15 Suppl 3:96-111.
9. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K *et al.* A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1635-9.
10. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2003;110 Suppl 1:S10-8.
11. Wang Y, Zhao AM, Lin QD. Role of cyclooxygenase-2 signaling pathway dysfunction in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Chinese medical journal* 2010;123:1543-7.

12. Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, Vianna FS, Goncalves RO, Paskulin DD *et al.* p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Molecular biology reports* 2014;41:1871-7.
13. Fraga LR, Boquett JA, Dutra CG, Vianna FS, Heck C, Goncalves RO *et al.* Interaction between TP63 and MDM2 genes and the risk of recurrent pregnancy loss. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2014;182C:7-10.
14. Dutra CG, Fraga LR, Nacul AP, Passos EP, Goncalves RO, Nunes OL *et al.* Lack of association between thrombophilic gene variants and recurrent pregnancy loss. *Human fertility* 2014;17:99-105.
15. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y *et al.* Identification of functional genetic variants in cyclooxygenase-2 and their association with risk of esophageal cancer. *Gastroenterology* 2005;129:565-76.
16. Eller AG, Branch DW, Nelson L, Porter TF, Silver RM. Vascular endothelial growth factor-A gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss. *Journal of reproductive immunology* 2011;88:48-52.
17. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL *et al.* VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nature genetics* 2003;34:383-94.
18. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with

vascular endothelial growth factor plasma levels. *Journal of vascular research* 2000;37:443-8.

19. Almawi WY, Saldanha FL, Mahmood NA, Al-Zaman I, Sater MS, Mustafa FE. Relationship between VEGFA polymorphisms and serum VEGF protein levels and recurrent spontaneous miscarriage. *Human reproduction* 2013;28:2628-35.

20. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2002;13:260-4.

21. Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB, Secher NJ. Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol and alcoholism* 2002;37:87-92.

22. Feodor Nilsson S, Andersen PK, Strandberg-Larsen K, Nybo Andersen AM. Risk factors for miscarriage from a prevention perspective: a nationwide follow-up study. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology* 2014;121:1375-84.

23. Muniz JJ, Izidoro-Toledo TC, Metzger IF, Sandrim VC, Tanus-Santos JE. Interethnic differences in the distribution of clinically relevant vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms. *DNA and cell biology* 2009;28:567-72.

24. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update* 2011;17:803-12.

25. Zhang B, Dai B, Zhang X, Wang Z. Vascular endothelial growth factor and recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. *Gene* 2012;507:1-8.
26. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility* 2005;83:959-63.
27. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D, Kim NK. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertility and sterility* 2010;93:1244-7.
28. Banerjee P, Jana SK, Pasricha P, Ghosh S, Chakravarty B, Chaudhury K. Proinflammatory cytokines induced altered expression of cyclooxygenase-2 gene results in unreceptive endometrium in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Fertility and sterility* 2013;99:179-87.
29. Kim HY, Cho S, Choi YS, Yang HI, Lee KE, Seo SK *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX -2) gene-765G/C polymorphism and advanced-stage endometriosis in Korean women. *American journal of reproductive immunology* 2012;68:238-43.



## **CAPÍTULO 5**

### **RESULTADOS ADICIONAIS**

---

## 5. Resultados adicionais

Neste capítulo estão apresentados os resultados das análises das frequências genótípicas e alélicas de polimorfismos nos genes *TP53*, *TP63*, *TP73*, *LIF* e *eNOS*. Essas variantes genéticas previamente estudadas por nosso grupo de pesquisa não haviam apresentado resultados estatisticamente significantes. O aumento de tamanho amostral do atual trabalho, em relação aos anteriores, possibilitou a eliminação da diferença estatisticamente significativa da etnia entre o grupo de estudo e o grupo controle. A origem étnica tem grande importância em polimorfismos genéticos, portanto a reavaliação dos resultados prévios foi efetuada.

Além disso, estão apresentados resultados da comparação entre pacientes com 2 perdas gestacionais e pacientes com 3 ou mais perdas gestacionais.

## 5.1. Revisão de polimorfismos previamente estudados por nosso grupo de pesquisa em abortamentos recorrentes

As novas análises não revelaram diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas e genóticas dos SNPs avaliados entre mulheres com AR e controles (**Tabela 1**), confirmando os dados previamente publicados (Dutra *et al.*, 2014; Fraga *et al.*, 2014a; Fraga *et al.*, 2014b)

**Tabela 1.** Frequências alélicas e genóticas de polimorfismos em *TP53*, *TP63*, *TP73*, *LIF* e *eNOS* em mulheres com abortamentos de repetição (AR) e controles.

SNP	Genótipo/Alelo	AR		Controles		p
		N	%	n	%	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	70	(47,0)	94	(45,2)	0,910
	GC	61	(40,9)	86	(41,3)	
	CC	18	(12,1)	28	(13,5)	
	CC+GC	79	(53,0)	114	(54,8)	0,738
	G	201	(67,4)	274	(65,9)	0,658
	C	97	(32,6)	142	(34,1)	
<i>TP63</i> (rs17506395)	TT	95	(63,8)	126	(60,6)	0,797
	TG	46	(30,9)	71	(34,1)	0,542
	GG	8	(5,4)	11	(5,3)	
	GG+TG	54	(36,2)	82	(39,4)	
	T	236	(79,2)	323	(77,6)	0,620
	G	62	(20,8)	93	(22,4)	
<i>TP73</i> (rs6695978)	GG	96	(64,4)	120	(57,7)	0,424
	GA	46	(30,9)	75	(36,0)	0,199
	AA	7	(4,7)	13	(6,3)	
	AA+GA	53	(35,6)	88	(42,3)	
	G	238	(79,9)	315	(75,7)	0,191
	A	60	(20,1)	101	(24,3)	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	77	(51,7)	104	(50,0)	0,922
	TG	59	(39,6)	87	(41,8)	0,755
	GG	13	(8,7)	17	(8,2)	
	GG+TG	72	(48,3)	104	(50,0)	
	T	213	(71,5)	295	(70,9)	0,870
	G	85	(28,5)	121	(29,1)	

**Tabela 1.** Frequências alélicas e genótípicas de polimorfismos em *TP53*, *TP63*, *TP73*, *LIF* e *eNOS* em mulheres com abortamentos de repetição (AR) e controles.

(continuação)

SNP	Genótipo/Alelo	AR		Controles		p
		N	%	n	%	
eNOS -786T/C (rs2070744)	TT	75	(50,3)	95	(45,7)	0,519
	TC	57	(38,3)	92	(44,2)	
	CC	17	(11,4)	21	(10,1)	
	CC+CT	74	(49,7)	113	(54,3)	0,384
	T	207	(69,5)	282	(67,8)	0,635
	C	91	(30,5)	134	(32,2)	
eNOS +894G/T (rs1799983)	GG	86	(57,7)	111	(53,4)	0,745
	GT	54	(36,2)	82	(39,4)	
	TT	9	(6,1)	15	(7,2)	
	TT+GT	63	(42,3)	97	(46,6)	0,415
	G	226	(75,8)	304	(73,1)	0,405
	T	72	(24,2)	112	(26,9)	

## 5.2. Mulheres com duas perdas gestacionais e mulheres com três ou mais perdas gestacionais

Foram analisadas características clínicas, frequências alélicas e genotípicas de SNPs nos genes *VEGFA*, *PTGS2*, *iNOS*, *eNOS*, *TP53*, *TP63*, *TP73* e *LIF* entre os subgrupos de mulheres com duas e mulheres com mais de duas perdas gestacionais (Tabelas 2 e 3).

Idades na primeira gestação, consumo de tabaco e álcool não foram diferentes entre os grupos. Frequências alélicas e genotípicas foram diferentes entre mulheres com 2 abortamentos e mulheres com 3 ou mais abortamentos para o SNP em *eNOS* +894G/T ( $p=0.01$  e  $p=0.039$ , respectivamente).

**Tabela 2.** Dados clínicos dos subgrupos de mulheres com dois e mulheres com três ou mais abortamentos.

Características	Duas perdas	Três ou mais perdas	<i>p</i>
N	52 (34,9)	97 (65,1)	--
Idade na primeira gestação	24,38 ± 7,01	23,37 ± 7,8	0,559
Número de gestações	2,00 ± 0	3,97 ± 1,64	< 0,001
Fumo (%)	9 (17,3)	14 (14,4)	0,813
Consumo de álcool (%)	26 (50,0)	34 (35,1)	0,083
Etnia [n(%)]			0,723
Descendência africana	21 (40,4)	35 (36,1)	
Descendência europeia	31 (59,6)	62 (63,9)	

Dados contínuos apresentados no formato de média ± desvio padrão.

**Tabela 3.** Frequências alélicas e genótípicas de polimorfismos em *VEGFA*, *PTGS2*, *iNOS*, *eNOS*, *TP53*, *TP63*, *TP73* e *LIF* em mulheres com 2 e com 3 ou mais abortamentos.

SNP	Genótipo/Alelo	Duas perdas		Três ou mais perdas		p	
		N	%	n	%		
<b><i>VEGFA</i></b>							
-2578C/A (rs699947)	CC	19	(36,5)	44	(45,4)	0,619	
	CA	20	(38,5)	33	(34,0)		
	AA	13	(25)	20	(20,6)		
	C	58	(55,8)	121	(62,4)	0,321	
	A	46	(44,2)	73	(37,6)		
-1154G/A (rs1570360)	GG	30	(57,7)	56	(57,7)	1,000	
	GA	18	(34,6)	33	(34,0)		
	AA	4	(7,7)	8	(8,2)		
	G	78	(75,0)	145	(74,7)		1,000
	A	26	(25,0)	49	(25,3)		
-634 G/C (rs2010963)	GG	26	(50,0)	38	(39,2)	0,228	
	GC	18	(34,6)	48	(49,5)		
	CC	8	(15,4)	11	(11,3)		
	G	70	(67,3)	124	(63,9)		0,611
	C	34	(32,7)	70	(36,1)		
+936C/T (rs3025039)	CC	40	(76,9)	78	(80,4)	0,847	
	CT	11	(21,2)	17	(17,5)		
	TT	1	(1,9)	2	(2,1)		
	C	91	(87,5)	173	(89,2)		0,704
	T	13	(12,5)	21	(10,8)		
<b><i>PTGS2</i></b>							
-1290T/C (rs689465)	TT	36	(69,2)	73	(75,3)	0,070	
	TC	13	(25,0)	24	(24,7)		
	CC	3	(5,8)	0	(0)		
	T	85	(81,7)	170	(87,6)		0,167
	C	19	(18,3)	24	(12,4)		
-1195T/C (rs689466)	TT	32	(61,5)	67	(69,1)	0,674	
	TC	18	(34,6)	27	(27,8)		
	CC	2	(3,8)	3	(3,1)		
	T	82	(78,8)	161	(83,0)		0,434
	C	22	(21,2)	33	(17,0)		

**Tabela 3,** Frequências alélicas e genótípicas de polimorfismos em *VEGFA*, *PTGS2*, *iNOS*, *eNOS*, *TP53*, *TP63*, *TP73* e *LIF* em mulheres com 2 e com 3 ou mais abortamentos.

(continuação)

SNP	Genótipo/Alelo	Duas perdas		Três ou mais perdas		p
		N	%	n	%	
<b><i>iNOS</i></b>						
-1026C>A (rs2779249)	CC	18	(34,6)	35	(36,1)	0,226
	CA	22	(42,3)	50	(51,5)	
	AA	12	(23,1)	12	(12,4)	
	C	58	(55,8)	120	(61,9)	0,323
	A	46	(44,2)	74	(38,1)	
+2087G>A (rs2297518)	GG	35	(67,3)	59	(60,8)	0,683
	GA	15	(28,8)	35	(36,1)	
	AA	2	(3,8)	3	(3,1)	
	G	85	(81,7)	153	(78,9)	0,650
	A	19	(18,3)	41	(21,1)	
<b><i>eNOS</i></b>						
-786T/C (rs2070744)	TT	29	(55,8)	46	(47,4)	0,276
	TC	20	(38,5)	37	(38,1)	
	CC	3	(5,8)	14	(14,4)	
	T	78	(75,0)	129	(66,5)	0,147
	C	26	(25,0)	65	(33,5)	
+894G/T (rs1799983)	GG	37	(71,2)	49	(50,5)	0,039
	GT	14	(26,9)	40	(41,2)	
	TT	1	(1,9)	8	(8,2)	
	G	88	(84,6)	138	(71,1)	0,010
	T	16	(15,4)	56	(28,9)	
<b><i>TP53</i></b> (rs1042522)	GG	29	(55,8)	41	(42,3)	0,191
	GC	16	(30,8)	45	(46,4)	
	CC	7	(13,5)	11	(11,3)	
	G	74	(71,2)	127	(65,5)	0,365
	C	30	(28,8)	67	(34,5)	
<b><i>TP63</i></b> (rs17506395)	TT	31	(59,6)	64	(66,0)	0,764
	TG	18	(34,6)	28	(28,9)	
	GG	3	(5,8)	5	(5,2)	
	T	80	(76,9)	156	(80,4)	0,550
	G	24	(23,1)	38	(19,6)	

**Tabela 3,** Frequências alélicas e genótípicas de polimorfismos em *VEGFA*, *PTGS2*, *iNOS*, *eNOS*, *TP53*, *TP63*, *TP73* e *LIF* em mulheres com 2 e com 3 ou mais abortamentos.

(continuação)

SNP	Genótipo/Alelo	Duas perdas		Três ou mais perdas		p
		N	%	n	%	
<b><i>TP73</i></b> (rs6695978)	GG	35	(67,3)	61	(62,9)	0,831
	GA	15	(28,8)	31	(32,0)	
	AA	2	(3,8)	5	(5,2)	
	G	85	(81,7)	153	(78,9)	0,650
	A	19	(18,3)	41	(21,1)	
<b><i>LIF</i></b> (rs929271)	TT	28	(53,8)	49	(50,5)	0,690
	TG	21	(40,4)	38	(39,2)	
	GG	3	(5,8)	10	(10,3)	
	T	77	(74,0)	136	(70,1)	0,503
	G	27	(26,0)	58	(29,9)	



**CAPÍTULO 6**  
**DISCUSSÃO**

---

## 6. Discussão

O termo AR ainda não é amplamente compreendido da mesma maneira. O termo clássico é definido como a perda de 3 ou mais gestações consecutivas (Rai e Regan, 2006). Após a comprovação de que não há diferenças na prevalência de resultados de testes diagnósticos alterados entre mulheres com números de perdas gestacionais diferentes, a avaliação clínica dos casais passou a começar após dois abortamentos (Jaslow *et al.*, 2010). Atualmente, é crescente o número de grupos e comitês que consideram AR como 2 ou mais perdas gestacionais (ASRM, 2012). Isso faz com que a incidência de 1-3% para AR alcance até 5% dos casais sexualmente ativos (ASRM, 2012).

Estima-se que cerca de 50% dos AR sejam explicados por fatores de risco substanciais, como translocações parentais ou malformações uterinas (Li *et al.*, 2002). No entanto, estudos mais recentes debatem que um diagnóstico é definido em menos de 10% dos casos (Christiansen, 2014). Além disso, quanto maior o número de perdas gestacionais, menor é a probabilidade de que elas sejam associadas a anormalidades cromossômicas fetais (Kwinecka-Dmitriew *et al.*, 2010), reforçando o papel da presença de fatores de risco maternos na etiologia dos AR.

Alterações na implantação embrionária e no crescimento placentário podem levar ao crescimento fetal intrauterino restrito, pré-eclâmpsia, nascimento prematuro e morte perinatal. A associação significativa desses desfechos adversos, além de baixo peso ao nascer e outras complicações obstétricas, foi demonstrada em mulheres com AR quando comparadas a controles (Christiansen, 2014). Adicionalmente, mulheres com pelo menos uma perda gestacional apresentam risco aumentado de infarto do miocárdio, infarto cerebral e hipertensão. Esse risco aumenta quanto maior o número de abortamentos, mesmo controlando para fatores de confusão como o fumo e o álcool (Ranthe *et al.*, 2013). Uma possível interpretação para essa elevação de risco é o aumento de processos inflamatórios e do *stress* oxidativo, que podem ter mecanismos comuns em AR e eventos ateroscleróticos.

Dessa forma, o estudo de polimorfismos genéticos como fatores de risco se mostra importante na determinação de susceptibilidade aos AR e na possível formação de subgrupos de pacientes com diferentes desfechos e prognósticos. No presente trabalho foram estudados polimorfismos em genes relacionados a processos inflamatórios, *stress*

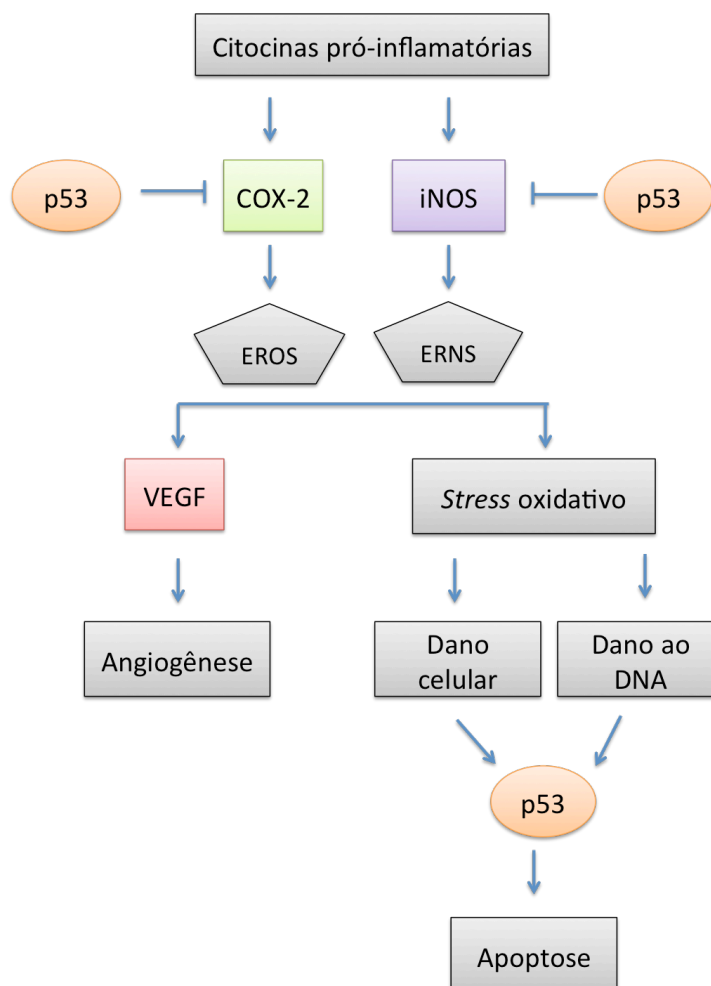
oxidativo, implantação, ciclo celular e angiogênese, de modo a avaliar genes envolvidos em diferentes etapas do estabelecimento e da manutenção da gestação.

Um microambiente inflamatório é necessário para o sucesso da implantação e o remodelamento tecidual no primeiro trimestre da gestação (Challis *et al.*, 2009). Essa inflamação envolve a maior expressão de citocinas e quimiocinas, porém, a reação inflamatória excessiva pode levar a perdas gestacionais e a outras complicações (Chaouat *et al.*, 2007). Defeitos na placentação podem causar fragmentação do trofoblasto e redução da invasão do citotrofoblasto, levando a uma elevação precoce de oxigenação do feto (Jauniaux *et al.*, 2006). A hipóxia fisiológica do primeiro trimestre da gestação pode proteger o feto contra os efeitos deletérios das EROs e das ERNs (Jauniaux *et al.*, 2003a).

Na reação inflamatória, a COX-2 e a iNOS induzem a formação de EROs e de ERNs. Neste trabalho não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos -1290T/C e -1195T/C em *PTGS2* entre pacientes com AR e controles. Todavia, quando avaliados os SNPs -1026C/A e +2087G/A em *iNOS*, foi encontrada uma maior frequência de portadoras do polimorfismo -1026A (CA/AA) no grupo de AR. O alelo -1026A foi associado a um aumento de 4,7 a 5,9 vezes na atividade da iNOS (Fu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010); essa elevação na expressão da *iNOS* pode gerar produção excessiva de NO e peroxinitrito, um potente pró-oxidante. O peroxinitrito pode provocar quebras de DNA e alterações proteicas, acarretando em possíveis perdas ou ganhos de função. O haplótipo de -1026C/A e +2087G/A em *iNOS* contendo dois alelos polimórficos (A A) e a frequência do alelo +2087A foram mais frequentes nas pacientes com AR, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. O alelo +2087A já foi estudado em pacientes com pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional, e foi significativamente associado ao risco de pré-eclâmpsia (Amaral *et al.*, 2012). Assim, um maior tamanho amostral pode ser capaz de detectar uma diferença significativa na frequência do SNP +2087G/A entre mulheres com AR e controles.

A superprodução de NO e de peroxinitrito pode causar também a fosforilação e a subsequente acumulação de p53, acarretando em morte celular (Hussain *et al.*, 2003), e finalmente resultando em defeitos na invasão embrionária e na proliferação placentária. Embora não tenhamos encontrado diferenças nas frequências alélicas e genótípicas de variantes genéticas da família p53 (nos genes *TP53*, *TP63*, *TP73*), é possível que esses

genes estejam envolvidos no mecanismo da perda gestacional de forma semelhante a mecanismos descritos em câncer (**Figura 3**), pois p53 pode regular a COX-2 e a iNOS à nível transcricional (Hussain *et al.*, 2003).



**Figura 4.** Radicais livres podem inibir ou exacerbar a angiogênese e a apoptose, dependendo de suas concentrações, *background* genético e microambiente de ação. Citocinas pró-inflamatórias induzem a óxido nítrico sintase (iNOS) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) que geram espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Tanto a iNOS quanto a COX-2 podem ter sua transcrição reprimida por p53. As respostas ao *stress* celular incluem dano celular e ao DNA. EROs e ERNs podem estimular ou inibir a angiogênese através da modulação da expressão de VEGF de maneira dose-dependente (Figura adaptada de Hussain *et al.*, 2003)

A COX-2 e as prostaglandinas derivadas de COX-2 são capazes também de modular a expressão de *VEGFA*. Não houve diferença entre as frequências alélicas e genóticas dos SNPs em *VEGFA* -2578C/A, -1154G/A, -634 G/C e +936C/T entre mulheres com AR e controles. Entretanto, o SNP -2578C/A, associado à menor expressão de *VEGFA*, não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg em pacientes com AR, independentemente de sua etnia e procedência. Este achado já foi relatado em pacientes com AR de outras populações (Almawi *et al.*, 2013). Em nosso estudo, o genótipo AA foi mais frequente do que o esperado e, como o alelo -2578A foi previamente associado à menor produção de VEGF (Shahbazi *et al.*, 2002), o genótipo homocigoto -2578AA pode estar associado a AR.

Apesar da ampliação do tamanho amostral e da descendência africana comparável entre os grupos de estudo, análises de frequências alélicas e genóticas para polimorfismos em *LIF* e *eNOS* não detectaram diferenças estatisticamente significantes entre mulheres com AR e controles. Estes resultados confirmam estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (Dutra *et al.*, 2014; Fraga *et al.*, 2014b).

Quando comparadas mulheres com duas perdas gestacionais às mulheres com três ou mais perdas gestacionais foi detectada diferença no polimorfismo em *eNOS* +894G/T. Esse SNP no éxon 7 do gene *eNOS* foi associado à redução da atividade da enzima e consequente redução na produção de NO (Karvela *et al.*, 2008). Estudos prévios associaram maiores frequências do alelo +894T ao maior risco para abortamentos de repetição e, o genótipo +894GG à proteção para complicações na gestação (Medica *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2013), embora isso não tenha sido evidenciado em nossa e em outras populações (Hefler *et al.*, 2002; Karvela *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2014).

O alelo ancestral +894G e o genótipo GG foram encontrados em maior frequência em mulheres com apenas duas perdas gestacionais quando comparadas às mulheres com mais abortamentos. Esse resultado parece contrastante com nossos achados relacionados a *iNOS*, porém ele corrobora hipóteses de que o NO é produzido pelas diferentes isoformas de NOS em concentrações e em intervalos de tempo diferentes (Ignarro, 2010). Enquanto a *iNOS* é capaz de gerar altas concentrações de NO por longos períodos, a produção NO ocorre em pulsos e em menores concentrações (Guzik *et al.*, 2003). Dessa forma, é

possível que a ação das duas enzimas para a produção de NO ocorra em diferentes momentos do desenvolvimento da gestação e para diferentes fins.

Achados conflitantes de nossos estudos em relação à literatura podem ser devidos a diferentes *backgrounds* genéticos. Apesar da distribuição similar de ancestralidade africana e europeia entre nossos grupos de estudo, é preciso considerar a heterogeneidade étnica da população brasileira (Salzano e Sans, 2014). A ancestralidade pode influenciar as frequências alélicas de variantes genéticas, podendo ser de grande importância para alguns genes como o *VEGFA* (Muniz *et al.*, 2009).

Uma maior frequência de consumo de álcool foi relatada pelas mulheres com AR em relação aos controles, embora não tivéssemos dados detalhados sobre o padrão de consumo. O consumo de álcool durante a gestação está associado a efeitos teratogênicos, causando malformações, crescimento intrauterino restrito, déficits de aprendizado, problemas de saúde comportamentais, sociais e mentais (Kingsbury *et al.*, 2014). Não há um nível seguro de consumo de álcool durante a gestação. O consumo de álcool pré-concepcional está associado ao consumo durante a gestação, particularmente em gestações não planejadas (Skagerstrom *et al.*, 2011). Além disso, o consumo moderado de álcool está associado a um aumento de três vezes no risco de abortamento espontâneo no primeiro trimestre (Kesmodel *et al.*, 2002). É de extrema importância a avaliação de fatores relacionados ao estilo de vida em estudos de associação genética. O uso de álcool e de tabaco são alguns dos poucos fatores de risco para complicações durante a gestação que podem ser modificados, potencialmente prevenindo muitas perdas gestacionais espontâneas (Feodor Nilsson *et al.*, 2014).

A complexidade das rotas de regulação da expressão das proteínas relacionadas à implantação embrionária, *stress* oxidativo e angiogênese pode dificultar o estabelecimento de associações significativas entre polimorfismos de base única e o risco para AR. Os SNPs são utilizados como marcadores para potencial papel dos genes, portanto a sua não associação com o desfecho não exclui a possibilidade de associação dos genes estudados nos mecanismos por trás dos AR.

Também é preciso considerar a potencial importância dos genótipo embrionário para essas variantes e sua influência no desenvolvimento da gestação. Estudos começaram a avaliar o papel do genótipo paterno em polimorfismos relacionados aos AR (Udry *et al.*,

2014). No futuro talvez possamos estimar o genótipo embrionário para as variantes com base nas informações parentais, possibilitando uma nova abordagem.

Novos estudos em outras populações devem ser realizados para a confirmação de nossos achados. Estudos futuros envolvendo o acompanhamento dos desfechos dos casos de AR aqui avaliados poderão contribuir para a compreensão do papel das variantes genéticas na manutenção da gestação.

Este trabalho confirma a natureza multifatorial das perdas gestacionais recorrentes, mostrando que o consumo de álcool e variantes de genes associados à produção de óxido nítrico e o *stress* oxidativo têm efeito na fisiopatologia dos AR. Este trabalho corrobora estudos anteriores referentes a importância da investigação de fatores de risco para os AR. Mostramos pela primeira vez a associação de um SNP em *iNOS* e o risco para AR, o que evidencia o envolvimento do *stress* oxidativo na susceptibilidade aos AR.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## Referências bibliográficas

ACOG, American College of Obstetricians and Gynecologists (2002) American College of Obstetricians and Gynecologists practice bulletin: Management of recurrent pregnancy loss. . Int J Gynaecol Obstet 2: 179-90.

Aktan F (2004) iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci 6: 639-53.

Al-Khateeb GM, Mustafa FE, Sater MS and Almawi WY (2011) Effect of the functional VEGFA-583C/T variant on vascular endothelial growth factor levels and the risk of recurrent spontaneous miscarriage. Fertil Steril 8: 2471-3.

Almawi WY, Saldanha FL, Mahmood NA, Al-Zaman I, Sater MS and Mustafa FE (2013) Relationship between VEGFA polymorphisms and serum VEGF protein levels and recurrent spontaneous miscarriage. Hum Reprod 10: 2628-35.

Amaral LM, Palei AC, Sandrim VC, Luizon MR, Cavalli RC, Duarte G and Tanus-Santos JE (2012) Maternal iNOS genetic polymorphisms and hypertensive disorders of pregnancy. J Hum Hypertens 9: 547-52.

Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Hussain SP, Tzeng EE, Geller DA, Billiar TR and Harris CC (1998) p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. Nat Med 12: 1371-6.

ASRM, American Society for Reproductive Medicine (2012) Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril 5: 1103-11.

Bansal RK, Goldsmith PC, He Y, Zaloudek CJ, Ecker JL and Riemer RK (1997) A decline in myometrial nitric oxide synthase expression is associated with labor and delivery. J Clin Invest 10: 2502-8.

Bhatnagar S, Bhattacharjee J, Vaid M, Madan T, Trivedi SS and Sarma PU (2007) Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism in pre-eclampsia: a pilot study in North India. Aust N Z J Obstet Gynaecol 6: 477-82.

Branch DW, Gibson M and Silver RM (2010) Clinical practice. Recurrent miscarriage. N Engl J Med 18: 1740-7.

Brezina PR and Kutteh WH (2014) Classic and cutting-edge strategies for the management of early pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1: 1-18.

Burton GJ and Jauniaux E (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 3: 287-99.

Calleja-Agius J, Jauniaux E, Pizzey AR and Muttukrishna S (2012) Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. *Hum Reprod* 2: 349-57.

Cao Y, Zhang Z, Xu J, Wang J, Yuan W, Shen Y and Du J (2014) Genetic association studies of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a systematic and meta-analysis. *Mol Biol Rep* 6: 3981-9.

Cha J, Sun X and Dey SK (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 12: 1754-67.

Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, 3rd and Petraglia F (2009) Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci* 2: 206-15.

Chaouat G, Dubanchet S and Ledee N (2007) Cytokines: Important for implantation? *J Assist Reprod Genet* 11: 491-505.

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L and Stewart CL (2000) Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology* 12: 4365-72.

Christiansen OB (2014) Recurrent miscarriage is a useful and valid clinical concept. *Acta Obstet Gynecol Scand* 9: 852-7.

Christiansen OB, Kolte AM, Dahl M, Larsen EC, Steffensen R, Nielsen HS and Hviid TV (2012) Maternal homozygosity for a 14 base pair insertion in exon 8 of the HLA-G gene and carriage of HLA class II alleles restricting HY immunity predispose to unexplained secondary recurrent miscarriage and low birth weight in children born to these patients. *Hum Immunol* 7: 699-705.

Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, Kutteh WH, Laird SM, Li TC and Van Der Ven K (2005) Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 4: 821-39.

Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP, Banks TC and Moss J (1998) Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 3: 871-8.

De Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Jr., Billiar TR and Geller DA (1996) Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 3: 1054-9.

Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Racicot K and Mor G (2014) The role of inflammation for a successful implantation. *Am J Reprod Immunol* 2: 141-7.

Di Simone N, Maggiano N, Caliandro D, Riccardi P, Evangelista A, Carducci B and Caruso A (2003) Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features. *Biol Reprod* 4: 1129-34.

Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B, Spong CY, Thom E, Wendel G, Jr., Wenstrom K, Samuels P, Cotroneo MA, Moawad A, Sorokin Y, Meis P, Miodovnik M, O'sullivan MJ, Conway D, Wapner RJ, Gabbe SG, National Institute of Child H and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units N (2005) The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. *Obstet Gynecol* 3: 517-24.

Dor Y, Porat R and Keshet E (2001) Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 6: C1367-74.

Dunn CL, Kelly RW and Critchley HO (2003) Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 2: 151-61.

Dutra CG, Fraga LR, Nacul AP, Passos EP, Goncalves RO, Nunes OL, Godoy BA, Leistner-Segal S, Vianna FS, Schuler-Faccini L and Sanseverino MT (2014) Lack of association between thrombophilic gene variants and recurrent pregnancy loss. *Hum Fertil (Camb)* 2: 99-105.

Edmonds DK, Lindsay KS, Miller JF, Williamson E and Wood PJ (1982) Early embryonic mortality in women. *Fertil Steril* 4: 447-53.

Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ and Hu W (2011) Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 7: 2245-55.

Feodor Nilsson S, Andersen PK, Strandberg-Larsen K and Nybo Andersen AM (2014) Risk factors for miscarriage from a prevention perspective: a nationwide follow-up study. *BJOG* 11: 1375-84.

Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 4: 581-611.

Ferrara N and Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1: 4-25.

Ferrara N, Gerber HP and Lecouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 6: 669-76.

Ford HB and Schust DJ (2009) Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2: 76-83.

Fraga LR, Boquett JA, Dutra CG, Vianna FS, Heck C, Goncalves RO, Paskulin DD, Costa OL, Ashton-Prolla P, Sanseverino MT and Schuler-Faccini L (2014a) Interaction between TP63 and MDM2 genes and the risk of recurrent pregnancy loss. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*: 7-10.

Fraga LR, Dutra CG, Boquett JA, Vianna FS, Goncalves RO, Paskulin DD, Costa OL, Ashton-Prolla P, Sanseverino MT and Schuler-Faccini L (2014b) p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss. *Mol Biol Rep* 3: 1871-7.

Fu L, Zhao Y, Lu J, Shi J, Li C, Liu H and Li Y (2009) Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population. *J Hypertens* 5: 991-1000.

Galazios G, Papazoglou D, Tsikouras P and Kolios G (2009) Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 5: 371-8.

Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, Chiarugi V and Masini E (2001) Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 1: 53-61.

Gardella JR and Hill JA, 3rd (2000) Environmental toxins associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 4: 407-24.

Guzik TJ, Korbout R and Adamek-Guzik T (2003) Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 4: 469-87.

Hefler LA, Tempfer CB, Bashford MT, Unfried G, Zeillinger R, Schneeberger C, Koelbl H, Nagele F and Huber JC (2002) Polymorphisms of the angiotensinogen gene, the endothelial nitric oxide synthase gene, and the interleukin-1beta gene promoter in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 1: 95-100.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT and De Bruijn EA (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 4: 549-80.

Hu W (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6: a001073.

Hu W, Feng Z, Atwal GS and Levine AJ (2008) p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle* 7: 848-52.

Hu W, Feng Z, Teresky AK and Levine AJ (2007) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 7170: 721-4.

Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 276-85.

Ignarro LJ. (2010) Nitric oxide : biology and pathobiology. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam,

Jaslow CR, Carney JL and Kutteh WH (2010) Diagnostic factors identified in 1020 women with two versus three or more recurrent pregnancy losses. *Fertil Steril* 4: 1234-43.

Jauniaux E, Gulbis B and Burton GJ (2003a) The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the fetus--a review. *Placenta*: S86-93.

Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N and Burton GJ (2003b) Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 1: 115-25.

Jauniaux E, Poston L and Burton GJ (2006) Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 6: 747-55.

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN and Burton GJ (2000) Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 6: 2111-22.

Johnson AR, Milner JJ and Makowski L (2012) The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev* 1: 218-38.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ and Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24: 9761-6.

Karvela M, Papadopoulou S, Tsaliki E, Konstantakou E, Hatzaki A, Florentin-Arar L and Lamnissou K (2008) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet* 4: 349-52.

Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB and Secher NJ (2002) Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol* 1: 87-92.

Kim YW and Byzova TV (2014) Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 5: 625-31.

Kingsbury AM, Hayatbakhsh R, Gibbons K, Flenady V and Najman JM (2014) Women's frequency of alcohol consumption prior to pregnancy and at their pregnancy-booking visit 2001-2006: A cohort study. *Women Birth*.

Kroncke KD, Fehsel K and Kolb-Bachofen V (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 2: 147-56.

Krussel J, Behr B, Hirchenhain J, Wen Y, Milki AA, Cupisti S, Bielfeld P and Polan ML (2000) Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human preimplantation embryos derived from tripronuclear zygotes. *Fertil Steril* 6: 1220-6.

Krussel JS, Behr B, Milki AA, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P and Lake Polan M (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 1: 57-63.

Kwinecka-Dmitriew B, Zakrzewska M, Latos-Bielenska A and Skrzypczak J (2010) [Frequency of chromosomal aberrations in material from abortions]. *Ginekol Pol* 12: 896-901.

Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM and Macklon N (2013) New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med*: 154.

Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D and Kim NK (2010) Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 4: 1244-7.

Lessey BA (2000) The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod*: 39-50.

Li TC, Iqbal T, Anstie B, Gillham J, Amer S, Wood K and Laird S (2002) An analysis of the pattern of pregnancy loss in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 5: 1100-6.

Li W, Liu H, Fu L, Li D and Zhao Y (2010) Identification of Yin Yang 1-interacting partners at -1026C/A in the human iNOS promoter. *Arch Biochem Biophys* 2: 119-26.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM and Dey SK (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 2: 197-208.

Luizon MR, Palei AC and Sandrim VC (2012) Polymorphisms and haplotypes in candidate genes related to angiogenesis and endothelial dysfunction in preeclampsia. *J Pregnancy*: 914704.

Luo L, Li DH, Wei SG, Zhang HB, Li SB and Zhao J (2013) Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene associated with recurrent miscarriage. *Genet Mol Res* 3: 3879-86.

Marions L and Danielsson KG (1999) Expression of cyclo-oxygenase in human endometrium during the implantation period. *Mol Hum Reprod* 10: 961-5.

Medica I, Kastrin A and Peterlin B (2007) Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2: 115-26.

Mojarrad M, Hassanzadeh-Nazarabadi M and Tafazoli N (2013) Polymorphism of genes and implantation failure. *Int J Mol Cell Med* 1: 1-8.

Mor G, Cardenas I, Abrahams V and Guller S (2011) Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci*: 80-7.

Muniz JJ, Izidoro-Toledo TC, Metzger IF, Sandrim VC and Tanus-Santos JE (2009) Interethnic differences in the distribution of clinically relevant vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms. *DNA Cell Biol* 11: 567-72.

Nedelcu AM and Tan C (2007) Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. *Dev Genes Evol* 11-12: 801-6.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1: 9-22.

Norwitz ER, Schust DJ and Fisher SJ (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 19: 1400-8.

Ogasawara M, Aoki K, Okada S and Suzumori K (2000) Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril* 2: 300-4.

Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Coeli-Lacchini FB, Junior HM and Tanus-Santos JE (2013) Inducible nitric oxide synthase haplotype associated with hypertension and responsiveness to antihypertensive drug therapy. *Gene* 2: 391-5.

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA and Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 12: 3131-9.

Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E and Maroulis GB (2005) Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 4: 959-63.



Paria BC, Reese J, Das SK and Dey SK (2002) Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science* 5576: 2185-8.

Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C and Kleinert H (2010) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2: 75-93.

Perez-Sala D and Lamas S (2001) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal* 2: 231-48.

Philipp T, Philipp K, Reiner A, Beer F and Kalousek DK (2003) Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod* 8: 1724-32.

Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID, Briet E, Berntorp E, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, Mariani G, Noteboom W, Pabinger I, Legnani C, Scharrer I, Schulman S and Van Der Meer FJ (1996) Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *Lancet* 9032: 913-6.

Rai R and Regan L (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 9535: 601-11.

Ranthe MF, Andersen EA, Wohlfahrt J, Bundgaard H, Melbye M and Boyd HA (2013) Pregnancy loss and later risk of atherosclerotic disease. *Circulation* 17: 1775-82.

Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, Vonnahme KA, Luther JS, Buchanan DS, Hafez SA, Grazul-Bilska AT and Redmer DA (2010) Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int J Dev Biol* 2-3: 355-66.

Reynolds LP, Killilea SD and Redmer DA (1992) Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 3: 886-92.

Rodesch F, Simon P, Donner C and Jauniaux E (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 2: 283-5.

Salazar LA, Inostroza M, Jara C, Vega F, Garcia R, Ciuffardi I and Guzman N (2010) Association of -765G>C polymorphism of the COX-2 gene with recurrent embryo implantation failure in Southern Chilean women. *Clin Chim Acta* 21-22: 1822-4.

Salzano FM and Sans M (2014) Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. *Genet Mol Biol* 1 Suppl: 151-70.

Saravelos SH and Regan L (2014) Unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1: 157-66.

Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV and Harden PN (2002) Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 1: 260-4.

Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, Shim SH, Choi DH and Kim NK (2010) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1: 64-7.

Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G, Jr., Wenstrom K, Samuels P, Caritis SN, Sorokin Y, Miodovnik M, O'sullivan MJ, Conway D, Wapner RJ, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child H and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units N (2010) Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol* 1: 14-20.

Skagerstrom J, Chang G and Nilsen P (2011) Predictors of drinking during pregnancy: a systematic review. *J Womens Health (Larchmt)* 6: 901-13.

Smeenk L and Lohrum M (2010) Behind the scenes: unravelling the molecular mechanisms of p53 target gene selectivity (Review). *Int J Oncol* 5: 1061-70.

Smith ML and Schust DJ (2011) Endocrinology and recurrent early pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 6: 482-90.

Smith WL, Urade Y and Jakobsson PJ (2011) Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev* 10: 5821-65.

Stephenson M and Kutteh W (2007) Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol* 1: 132-45.

Stirrat GM (1990) Recurrent miscarriage. *Lancet* 8716: 673-5.

Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC and Adak S (2004) Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 35: 36167-70.

Su MT, Lin SH and Chen YC (2011) Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 6: 803-12.

Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Katano K, Suzumori N and Mizutani E (2011) Uterine anomaly and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 6: 514-21.

Suh EK, Yang A, Kettenbach A, Bamberger C, Michaelis AH, Zhu Z, Elvin JA, Bronson RT, Crum CP and Mckeon F (2006) p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 7119: 624-8.

Sullivan AE, Silver RM, Lacoursiere DY, Porter TF and Branch DW (2004) Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 4: 784-8.

Takamiya R, Baron RM, Yet SF, Layne MD and Perrella MA (2008) High mobility group A1 protein mediates human nitric oxide synthase 2 gene expression. *FEBS Lett* 5: 810-4.

Thannickal VJ and Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 6: L1005-28.

Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS, Iovanna JL, Squire J, Jurisica I, Kaplan D, Melino G, Jurisicova A and Mak TW (2008) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 19: 2677-91.

Udry S, Aranda FM, Latino JO and De Larranaga GF (2014) Paternal factor V Leiden and recurrent pregnancy loss: a new concept behind fetal genetics? *J Thromb Haemost* 5: 666-9.

Valenzuela FJ, Perez-Sepulveda A, Torres MJ, Correa P, Repetto GM and Illanes SE (2012) Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. *J Pregnancy*: 632732.

Van Den Boogaard E, Kaandorp SP, Franssen MT, Mol BW, Leschot NJ, Wouters CH, Van Der Veen F, Korevaar JC and Goddijn M (2010) Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status? *Hum Reprod* 6: 1411-4.

- Vogelstein B, Lane D and Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 6810: 307-10.
- Vuorela P, Carpen O, Tulppala M and Halmesmaki E (2000) VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage. *Mol Hum Reprod* 3: 276-82.
- Wang Y, Zhao AM and Lin QD (2010) Role of cyclooxygenase-2 signaling pathway dysfunction in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Chin Med J (Engl)* 12: 1543-7.
- Wilcox AJ, Baird DD and Weinberg CR (1999) Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 23: 1796-9.
- Wilcox AJ, Weinberg CR, O'connor JF, Baird DD, Schlatterer JP, Canfield RE, Armstrong EG and Nisula BC (1988) Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 4: 189-94.
- Wu KK (1995) Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol*: 179-207.
- Xu W, Comhair SA, Zheng S, Chu SC, Marks-Konczalik J, Moss J, Haque SJ and Erzurum SC (2003) STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1: L137-48.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C and Mckeeon F (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 6729: 714-8.
- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, Vagner C, Bonnet H, Dikkes P, Sharpe A, Mckeeon F and Caput D (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 6773: 99-103.
- Zamora R, Vodovotz Y and Billiar TR (2000) Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med* 5: 347-73.
- Zhang EG, Burton GJ, Smith SK and Charnock-Jones DS (2002) Placental vessel adaptation during gestation and to high altitude: changes in diameter and perivascular cell coverage. *Placenta* 10: 751-62.

Zhuang JC, Wright TL, Derojas-Walker T, Tannenbaum SR and Wogan GN (2000) Nitric oxide-induced mutations in the HPRT gene of human lymphoblastoid TK6 cells and in *Salmonella typhimurium*. *Environ Mol Mutagen* 1: 39-47.

Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U and Liang OD (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*: S10-8.

## APÊNDICES

---

## **Apêndices**

### **APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **FATORES GENÉTICOS DE RISCO PARA PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES**

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

Gostaríamos de convidá-la para participar de um estudo para investigação de fatores de risco para perdas gestacionais recorrentes. Entre os fatores de risco estão algumas alterações genéticas que podem modificar o bom funcionamento de uma gestação. Para o diagnóstico e estudo dessas alterações é necessária uma amostra de sangue e/ou saliva, no qual será analisado o DNA (material genético). As amostras coletadas serão usadas para análises desse estudo e armazenadas para possíveis outras análises futuras que visem melhorar o entendimento das causas das perdas gestacionais. As amostras serão armazenadas no Laboratório de Genética Médica do Departamento de Genética da UFRGS.

As pacientes com duas ou mais perdas gestacionais serão comparadas com mulheres que não tiveram perdas de gravidez. A sua participação é importante para que possamos chegar a conclusões que possam lhe beneficiar ou a outras pacientes em futuras gestações. A sua participação é voluntária, sem prejuízo de seu tratamento e sem qualquer custo, e você tem o direito de se retirar do estudo a qualquer momento, bastando unicamente manifestar a sua vontade. As informações são confidenciais e serão analisadas em conjunto sem identificação individual. Estes resultados serão publicados em revistas científicas especializadas.

Para viabilizarmos o estudo é necessário que, além de responder a um questionário, sejam coletados 10mL de sangue de uma veia periférica e/ou saliva. O volume coletado não tem repercussão sobre seu organismo e o risco da coleta de sangue pode ser a dor da punção, a formação de uma pequena mancha escura na pele (equimose) ou um sangramento mínimo.

Os resultados dos exames realizados a partir da coleta estarão a sua disposição com os pesquisadores no Serviço de Genética Médica / Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O presente documento tem por finalidade esclarecer as informações sobre esse projeto de pesquisa e é elaborado em duas vias, ficando uma com a participante e outra arquivada com o pesquisador responsável por esse projeto. Se estiver de acordo em participar do estudo, favor assinar a linha correspondente a seu nome e responda como achar melhor a questão a seguir:

Autoriza o uso do seu material biológico para estudos futuros do nosso grupo que envolva fatores genéticos de risco para eventos adversos durante a gestação?

( ) sim ( ) não

Nome da paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Pesquisador Responsável:

Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino – pesquisadora responsável

Serviço de Genética Médica do HCPA – fone 3359-8011

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA – 3359-8304



APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO PADRONIZADO PARA COLETA DE DADOS DOS CASOS E CONTROLES

**VARIANTES GÊNICAS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA PROTEÍNA TP53 E SUA RELAÇÃO COM PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES**

<b>Reg. HCPA</b>	<b>Reg. LGM</b>	<b>Reg. DPN</b>	<b>Reg. Tromb.</b>	<b>Reg. SGM</b>
------------------	-----------------	-----------------	--------------------	-----------------

**IDENTIFICAÇÃO**

**Cônjuge da Paciente**

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Data nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_
3. Profissão/ocup: \_\_\_\_\_
4. Escolaridade: \_\_\_\_\_

**Paciente**

5. Nome: \_\_\_\_\_
6. Endereço: \_\_\_\_\_
7. Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_
8. CEP: \_\_\_\_\_
9. Fone casa: \_\_\_\_\_ Fone Cel: \_\_\_\_\_

10. Data nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_
11. Profissão/ocup: \_\_\_\_\_
12. Escolaridade: \_\_\_\_\_
13. Peso habitual: \_\_\_\_\_ kg Peso atual: \_\_\_\_\_ kg Altura: \_\_\_\_\_ m IMC: \_\_\_\_\_
14. Doença auto-imune: \_\_\_\_\_
15. Histórico de Tumor/Câncer: \_\_\_\_\_

	Paciente	Cônjuge	Familiares da paciente	Familiares do Cônjuge
Tumor				
Câncer				

16. Grupo Sanguíneo: \_\_\_\_\_ Fator RH: ( ) positivo ( ) negativo ( ) não sabe
17. Consangüinidade do Casal: ( ) Sim ( ) Não Obs: \_\_\_\_\_
18. Dificuldades para engravidar? ( ) Sim ( ) Não
19. Gestações: \_\_\_\_\_
20. NV: \_\_\_\_\_
21. NM: \_\_\_\_\_
22. Abortamento espontâneo: \_\_\_\_\_
23. Abortamento provocado: \_\_\_\_\_
24. Filhos vivos: \_\_\_\_\_  
(heredograma no verso)

	Materna	Paterna	Obs
25. Fumo			
26. Álcool		_____	
27. Outras drogas		_____	
28. Medicamentos			
29. Antecedentes de malformação			
30. Grupo étnico			
31. Doença crônica			



### 33. Resumo da investigação realizada

CAUSA	EXAME	S/N	DATA	NORMAL	ANORMAL	OBS
Genética	<b>Cariótipo do esposa</b>					
	<b>Cariótipo do esposo</b>					
	<b>Cariótipo do material de aborto</b>					
Anatômica	<b>Histeroscopia</b>					
	<b>Ecografia</b>					
	<b>Laparoscopia</b>					
	<b>Histerossalpingografia</b>					
	<b>Defeito mülleriano</b>					
	<b>Incompetência Istmocervical</b>					
Endócrina	<b>Biópsia de endométrio</b>					
	<b>Gonadotrofinas</b>					
	<b>Prolactina</b>					
	<b>Hormônios tireóideos</b>					
	<b>TPO - tireoperoxidase</b>					
	<b>Glicemia</b>					
	<b>Outros distúrbios identificados</b>					
trombofilias adquiridas	<b>Ac anticardiolipina</b>					
	<b>Ac lúpico anticoagulante</b>					
	<b>FAN fator antinuclear</b>					
outras						