

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**APOPTOSE NA GESTAÇÃO: ANÁLISE DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DOS  
GENES *FAS*, *FAS-L*, *BAX*, *BCL-2* E *HLA-G* NA ETIOLOGIA DO  
ABORTAMENTO DE REPETIÇÃO**

**Rafael Tomoya Michita**

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

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientadora: Dra. Priscila Vianna

Porto Alegre

Março de 2015

## **Instituições e Agências Financiadoras**

---

### **Agências Financiadoras:**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

### **Instituição de Origem:**

Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, Instituto de Biociências,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

### **Instituições Colaboradoras:**

Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA)

Laboratório de Genética Médica e Populacional, Departamento de Genética, Instituto de  
Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer algumas pessoas que participaram diretamente desta conquista.

Agradeço primeiramente a minha família, em especial meus pais, pois a confiança e incentivo em mim depositados foram essenciais nesta tão sonhada etapa da minha vida.

Ao meu orientador Professor José Artur Bogo Chies 'Zéca' por ter participado desta tão sonhada etapa e por ter me aceitado no Laboratório, agradeço-o imensamente pelos ensinamentos, sugestões, críticas e também por ser um exemplo de profissional o qual tenho orgulho de me espelhar.

À Dra. Priscila Vianna pela coorientação, pelos ensinamentos e por sempre estar disposta a me ajudar! Obrigado Pri!.

Aos colegas da Imunogenética, Evolução Humana e Bioinformática pela amizade, companheirismo e por todos os dias agradáveis de convivência.

Ao Elmo pela amizade e por sempre estar disposto a resolver tudo!.

À professora Lavínia por ter cedido as amostras do presente estudo e por sempre estar disposta e interessada a resolver quaisquer dúvidas.

Ao Lucas Fraga por ser sempre prestativo em me ajudar, independente da distância.

Por fim, em especial agradeço a Vanessa, minha eterna companheira, pois sem ela nada disso teria sentido algum. Muito Obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
CAPÍTULO 1 .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Aspectos Imunológicos da Gestação .....	13
1.2. Abortamento de repetição .....	15
1.3. Fatores de Risco para o Abortamento de Repetição .....	16
1.4. Fatores Ambientais .....	16
1.4.1. Fatores Uterinos.....	17
1.4.2. Fatores Hormonais e Metabólicos .....	18
1.4.3. Fatores Infecciosos .....	18
1.4.4. Fatores Hemostáticos.....	19
1.4.5. Fatores Imunológicos .....	19
1.5. Fatores Genéticos.....	20
1.6. O Antígeno Leucocitário Humano G .....	21
1.7. Apoptose .....	26
1.7.1. A via extrínseca: o sistema FAS-FAS-L .....	28
1.7.2. A via intrínseca: as proteínas da Família Bcl-2.....	31
CAPÍTULO 2 .....	37
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo Geral.....	38
2.2. Objetivos Específicos.....	38
CAPÍTULO 3 .....	39
<i>The role of apoptotic genes polymorphisms (FAS, FAS-L, BCL-2 and BAX) in early recurrent pregnancy losses.....</i>	39
CAPÍTULO 4 .....	56

<i>The HLA-G 3'UTR locus analysis in women with recurrent pregnancy losses a case-control study.</i> .....	56
CAPÍTULO 5 .....	80
3. DISCUSSÃO.....	81
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88
5. APÊNDICES .....	101

## Lista de Abreviaturas

ACOG: Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia

APAF-1: Fator 1 de ativação da protease apoptótica

AR: Abortamento de Repetição

ASRM: Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva

ATP: Adenosina trifosfato

BAD: *BCL-2 associated agonist of cell death*

BAK: *BCL-2 antagonist killer*

BAX: Proteína X associada à BCL-2

BCL-2: Linfoma de células B do tipo 2

BCL-x<sub>L</sub>: *BCL-2 related protein long-isoform*

BH: Domínio de homologia a BCL-2

CD: Cluster de Diferenciação

DISC: Complexo de sinalização indutor de morte

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNK: Célula *Natural Killer* decidual

DST: Doença sexualmente transmissível

EVT: Trofoblasto extraviloso

FAAD: Domínio de morte associado à FAS

FAS-L: FAS ligante

*Gld*: Doença linfoproliferativa generalizada

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

IL: Interleucina

IMC: Índice de Massa Corporal

LES: Lúpus eritematoso sistêmico

*Lpr*: Limfoproliferação

MCL-1: *Myeloid cell leukemia-1*

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

miRNA: micro RNA

MORT-1: Mediador do receptor induzido por toxicidade-1

NK: Células *Natural Killer*

ORF: Quadro de leitura aberta

P1: Promotor 1 (gene *BCL-2*)

P2: Promotor 2 (gene *BCL-2*)

pb: Pares de bases

PE: Pré-eclâmpsia

RCOG: Colégio Real de Obstetras e Ginecologistas

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensageiro

rs: Sequencia de referência

rTNF: Receptor do fator de necrose tumoral

sFAS: FAS solúvel

sFAS-L: FAS ligante solúvel

sHLA-G: HLA-G solúvel

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

SOP: Síndrome do ovário policístico

Sp1: Proteína estimulatória-1

STAT-1: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

Th: T *helper* (T auxiliar)

TNF: Fator de necrose Tumoral

Treg: T regulatório

UTR: Região não traduzida

## RESUMO

O Abortamento de repetição (AR) é uma condição patológica definida pela ocorrência de duas ou mais perdas gestacionais consecutivas. Estima-se que esta desordem acometa 5% dos casais em idade reprodutiva. Esta condição clínica é classificada em dois subtipos clínicos: AR primário e AR secundário. Apesar dos esforços em investigar as causas desta desordem obstétrica, estima-se que em 50% dos casos a etiologia do AR permanece desconhecida.

A reprodução humana implica em um paradoxo imunológico fundamental: no qual o feto representa uma entidade estranha ao sistema imune materno, sendo constituído por metade de material genético paterno, no entanto, de forma fascinante este não é rejeitado. Sendo assim, a aceitação materna do feto é um evento único e demonstra como o sistema imune materno remodela-se e tolera a presença de células invasivas semi-alogênicas no útero. Casos de AR, pré-eclâmpsia (PE), entre outras desordens gestacionais, levam a uma questão retórica; ‘Porque a mãe rejeitou o feto?’. No entanto, considerando as gestações saudáveis e as complexas interações que ocorrem na interface materno-placentária, talvez, a intrigante e fascinante questão correta que ainda permanece é ‘Porque a mãe não rejeitou o feto?’. Existem muitos mecanismos que protegem o feto de um possível ‘ataque’ do sistema imune materno das quais podemos citar: (i) a baixa expressão de moléculas clássicas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na interface materno-placentária, (ii) a expressão diferencial de moléculas não clássicas de classe I do MHC nas células do trofoblasto, como HLA (antígeno leucocitário humano)-E, HLA-F e HLA-G, (iii) a apoptose de células do sistema imunológico ativadas, entre outras.

A morte celular programada ou apoptose é essencial ao desenvolvimento e funcionalidade dos organismos multicelulares. Os mecanismos apoptóticos mais reconhecidos pela efetividade em desencadear a morte celular são: o sistema FAS-FAS-L (via extrínseca) e BAX-BCL-2 (via intrínseca). A molécula do *HLA-G*, descrita por sua versatilidade imunológica, é essencial na gestação e neste cenário é descrito que, além de contribuir essencialmente na imunotolerância materna, também atua nos processos de angiogênese, apoptose e consequente remodelação tecidual da decídua materna. Considerando que os eventos apoptóticos estão presentes nas diversas etapas da gestação, desde a concepção até o nascimento, e que constituem diferentes interações de proteínas apoptóticas e anti-apoptóticas específicas para manter a adequada homeostasia celular e



tecidual, o presente estudo visa: (i) a compreensão dos principais genes envolvidos neste processo e (ii) o entendimento da contribuição destes na predisposição à recorrência de abortamentos, em um estudo de carácter caso-controle. No total, 138 mulheres diagnosticadas com AR e 156 mulheres saudáveis com mais de dois filhos, sem histórico de complicações gestacionais foram incluídas neste estudo. Os genes e variantes polimórficas analisados no estudo a menos diferentemente especificado correspondem a variações presente na região promotora, são: *FAS* (rs1800682, rs763110), *FASL-L* (rs5030772, rs763110), *BAX* (rs4645878), *BCL-2* (rs2279115) e *HLA-G* [região 3' UTR (região não traduzida) (rs66554220, rs1707, rs1710, rs17179101, rs17179108, rs1063320, rs9380142 e rs1610696)].

Como conclusão, no presente estudo nós não observamos a associação destas variantes ao AR na população estudada. No entanto, algumas ressalvas a respeito deste estudo devem ser mencionadas, são estas: (i) a heterogeneidade genética da população estudada, (ii) o tamanho amostral e (iii) o critério clínico para o diagnóstico do abortamento de repetição como 2 (duas) ou mais perdas gestacionais consecutivas. Portanto, o papel destas variantes genéticas na predisposição ao AR não deve ser descartada e necessitam ser confirmadas em estudos posteriores. Como perspectivas, no intuito de gerar evidências mais satisfatórias sobre o ofício destas variantes genéticas na fisiopatologia do AR, estudos com adequado tamanho amostral capaz de detectar tais efeitos funcionais destas variantes, bem como em diferentes populações são fortemente recomendados.

## ABSTRACT

Recurrent miscarriage (RM) or recurrent pregnancy loss (RPL) is a pathological condition defined by occurrence of two or more consecutive pregnancy losses. It is estimated that about 5% of couples in reproductive age are affected by RM. This clinical condition is classified in two subtypes: primary and secondary RM. In despite of the efforts to investigate the causes of RM, approximately 50% of cases the etiology of RM remains unknown.

Human reproduction involves a fundamental immunological paradox: in which the fetus is seen as foreign entity to the maternal immune system, consisting of half maternal and half paternal genetic material origin; however, in a fascinating way the fetus is not rejected. Thus, maternal-fetal acceptance is a unique example and demonstrates how the maternal immune system shapes and tolerates up the presence of invasive semi-allogeneic cells in utero. Obstetric disorders such as RM, preeclampsia (PE) and other pregnancy complications, lead to a rhetorical question: 'Why the mother rejected the fetus?'. However, considering all healthy pregnancies and complex interactions that occur in the maternal-placental interface, perhaps the intriguing question that remains is 'why the mother did not reject the fetus?' there are many mechanisms that protect the fetus of a possible 'attack' from maternal immune system. Among them we can cite: (i) the low expression of classical class I molecules of the major histocompatibility complex (MHC) in maternal-placental interface, (ii) the differential expression of non-classical class I molecules MHC on the trophoblast cells such as HLA (human leukocyte antigen)-E, HLA-F and HLA-G, (iii) tryptophan catabolism by the enzyme indoleamine (2,3)-dioxygenase, (iv) regulation of the complement system in maternal-placental interface and (v) apoptosis of maternal activated immune system cells.

Programmed cell death or apoptosis is essential to development and function of multicellular organisms. Apoptotic mechanisms recognized for the effectiveness in triggering cell death are: FAS-FAS-L system (extrinsic pathway) and BAX-BCL-2 (intrinsic pathway). HLA-G molecule is described by its immunological versatility being essential to establishment of a healthy gestation. The HLA-G contributes primarily to maternal immunotolerance and is related to many process, such as angiogenesis, apoptosis and consequently to tissue remodeling of maternal decidua. Since the apoptotic events are present at different stages of pregnancy, from conception to birth, and considering different

interactions of apoptotic and specific anti-apoptotic proteins to maintain a suitable cellular and tissue homeostasis, this study aims to: (i) the understanding of key genes involved in the apoptotic process and (ii) the understanding of these genes in the predisposition to recurrent miscarriages, in a case-control study. A total of 138 women diagnosed with RM and 156 healthy women with more than two children with no history of pregnancy complications were included in this study. All polymorphic variants of candidate genes analyzed in the study unless otherwise specified correspond to variations in the promoter region. The variants assessed in study are: *FAS* (rs1800682, rs763110), *FASL-G* (rs5030772, rs763110), *BAX* (rs4645878), *BCL-2* (rs2279115) and *HLA-G* [region 3' UTR (untranslated region) (rs66554220, rs1707, rs1710, rs17179101, rs17179108, rs1063320, rs9380142 and rs1610696)].

In conclusion, we did not observe the association of these variants to the RM risk in the present population. However, some caveats about this study should be mentioned, such as (i) the genetic heterogeneity of the study population, (ii) the sample size and (iii) the clinical criteria for the diagnosis of recurrent miscarriage as two (2) or more consecutive pregnancy losses. Therefore, a definitive conclusion on the role of these genetic variants in the predisposition to RM should not be dismissed and should be further confirmed in future studies. As prospects to generate more satisfactory evidence about the role of these genetic variants in the pathophysiology of RM, further studies with adequate sample size capable of detecting such functional effects of these variants as well as in different populations are strongly recommended.

## **CAPÍTULO 1**

### **Introdução**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos Imunológicos da Gestação

O processo da reprodução humana implica num paradoxo fundamental: apesar de ser essencial para a manutenção da nossa espécie, é relativamente ineficiente. A fecundidade máxima, definida pela probabilidade de concepção durante um ciclo menstrual normal é de aproximadamente 30%, além disso, apenas 60% das concepções avançam além da 20ª semana de gestação (Wilcox et al. 1988; Zinaman et al. 1996). Das perdas gestacionais, estima-se que 75% representem distúrbios na implantação do blastocisto e, portanto, não são consideradas gestações clinicamente reconhecidas (Wilcox et al. 1988). A adaptação evolutiva em mamíferos permitiu a implantação do blastocisto na cavidade uterina materna e constitui um obstáculo imunológico, pois, embora o processo seja necessário para o correto aporte sanguíneo de nutrientes e para a proteção do feto nas fases iniciais do desenvolvimento, o contato íntimo deste com as células maternas o torna um potencial alvo do sistema imunológico materno (Trowsdale e Betz, 2006).

O feto em desenvolvimento representa uma entidade estranha ao sistema imunológico materno uma vez que o feto é constituído por metade do material genético materno e metade paterna. A aceitação materna do feto é um exemplo único que demonstra como o sistema imune materno remodela-se e tolera a presença de células invasivas semi-alogênicas no útero. Embora, o sistema imunológico materno reconheça a presença das células fetais, ele de forma fascinante não o rejeita, reconhecendo-o como temporariamente próprio. Existem muitos mecanismos que protegem o feto do sistema imune materno. Dentre eles podemos citar: (i) uma menor expressão de moléculas clássicas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na interface materno-fetal, (ii) a expressão de moléculas não clássicas do MHC nas células do trofoblasto (Ishitani et al. 2003), (iii) o catabolismo do triptofano pela enzima indoleamina (2,3)-dioxigenase (Munn et al. 1998), (iv) a regulação do sistema complemento na interface materno-fetal (Holmes et al. 1990) e (v) a apoptose de células T (Hunt et al. 1997).

A sobrevivência do concepto no útero materno intriga os imunologistas e diversas hipóteses foram propostas. Inicialmente Medawar (1953) propôs que mecanismos de tolerância imunológica deveriam estar presentes durante a gestação no intuito de proteger o feto das eminentes respostas imunológicas contra os aloantígenos paternos expressos pelas células fetais. De fato, a gestação foi considerada um estado de plena tolerância

imunológica materna ao feto. Atualmente, reconhece-se que a interface materno-placentária não é um sítio imunologicamente inerte, mas um local composto de inúmeras interações imunológicas, destacando-se principalmente a função das citocinas na gestação.

As células T desempenham importante função na imunoregulação e imunoestimulação celular. De forma clássica, a subpopulação de células *T-helper* (Th) eram classificadas em Th1 ou Th2. Estas subpopulações são claramente distinguidas pelo perfil de citocinas que secretam e moléculas de superfície que expressam na membrana celular, designadas por CD (cluster de diferenciação). É descrito ainda que a transição de um perfil peculiar de citocinas secretadas pelas células Th1 para o perfil de citocinas Th2 contribui para o sucesso e a manutenção da gestação, favorecendo um ambiente imunologicamente privilegiado. Tal tolerância imunológica da mãe ao feto foi inicialmente explicada pelo predomínio de uma resposta imune de perfil Th2 durante a gestação saudável (Wegmann et al. 1993). De fato, o predomínio do perfil imunológico Th1 em relação ao Th2 durante a gestação, é implicado em diversas complicações gestacionais, tais como o abortamento espontâneo de repetição, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento fetal e desenvolvimento placentário (Raghupathy 1997; Piccinni et al. 1998; Saito e Sakai 2003; Nahum et al. 2004). No entanto, contrário à hipótese inicial clássica, o predomínio do perfil imune Th2 [principalmente Interleucina (IL) 4 e 10] que caracteriza a gestação saudável já foi relatado em casos de abortamento de repetição e em modelos experimentais, sugerindo que estas citocinas não são exclusivas para o sucesso gestacional (Svensson et al. 2001; Bates et al. 2002).

Atualmente, o paradigma do balanço imune ‘Th1/Th2’ na gestação é incapaz de explicar totalmente os mecanismos de evasão imunológica do feto ao sistema imune materno. Recentemente, este paradigma expandiu-se para o perfil Th1/Th17/Th2/Treg (onde Treg significa Células T regulatórias) (Saito et al. 2010; Fu et al. 2014).

As células Treg e Th17 são duas subpopulações distintas e com funções opostas no contexto imunológico. As células Treg tem um papel na supressão da resposta imune (anti-inflamatórias), prevenindo a rejeição do feto. Uma resposta imunológica com baixos níveis de Treg é fortemente associada ao abortamento do feto na gestação. Por outro lado, as células Th17 contribuem para os processos inflamatórios e autoimunes, e predominam em relação às Tregs em eventos de abortamento (Wang et al. 2010).

## 1.2. Abortamento de repetição

Abortamento é uma das complicações gestacionais mais frequentes, que acomete de 12-25% das gestações clinicamente reconhecidas (Regan et al. 1989; Rai e Regan 2006; ASRM et al. 2012). Esta condição abrange todas as gestações que terminam de forma espontânea antes do feto atingir a viabilidade gestacional. Isto inclui todas as perdas até o período máximo de 24 semanas gestacionais (Rai e Regan 2006).

A perda gestacional pode ser fisicamente e emocionalmente impactante para os casais, especialmente em casos recorrentes. O abortamento de repetição (AR), também referido como abortamento espontâneo de repetição ou perdas gestacionais recorrentes, é uma condição patológica distinta que atinge cerca de 5% das gestações quando definida pela presença de duas ou mais perdas gestacionais consecutivas clinicamente reconhecidas e cerca de 1% quando definida por três ou mais perdas (ACOG 2002; Hogge et al. 2003; Rai e Regan 2006). A importância de se distinguir os casos recorrentes dos esporádicos é embasado na hipótese de que ambas possuem etiologias distintas (Cramer e Wise 2000).

Controvérsias existem referentes à quantidade de abortamentos necessários para o diagnóstico clínico do AR, sendo que algumas diretrizes internacionais o classificam a partir de duas ou mais perdas gestacionais consecutivas (ACOG 2002; ASRM et al. 2012). Outros autores utilizam o critério de três ou mais perdas gestacionais consecutivas (Jauniaux et al. 2006; Bansal 2010; Bhattacharya et al. 2010; Christiansen 2013). No entanto, mulheres com duas ou mais perdas gestacionais consecutivas são candidatas para a avaliação etiológica desta condição, visto que o risco de abortamento após duas perdas gestacionais consecutivas (30%) é clinicamente similar ao risco de recorrência entre as mulheres com três ou mais abortamentos consecutivos (33%) (ACOG, 2002). Diante disto, a presença de dois abortamentos consecutivos já é o suficiente para avaliar a paciente, especialmente se está em idade avançada (Ford e Schust 2009; Jaslow et al. 2010).

Os casais com AR são classificados em subgrupos clínicos distintos de acordo com o seu histórico reprodutivo: AR primário caracteriza-se por perdas consecutivas e nenhuma gestação prévia com sucesso e AR secundário quando houver, no mínimo, uma gestação de sucesso, independente do número de abortamentos (Toth et al. 2010).

Atualmente, as mudanças na sociedade e estilo de vida resultaram no atraso da maternidade, além disso, em um estudo foi observado que o avanço na idade materna é um fator de risco independentemente associado com a incidência de abortamentos (Nybo

Andersen et al. 2000). Além da idade, o histórico reprodutivo do casal é um preditor importante da gestação futura. Sugere-se que a incidência de abortamento seja 4-5 vezes maior em mulheres que nunca sustentaram uma gestação comparada a primíparas ou múltiparas saudáveis. Além disso, é demonstrado que mulheres que possuem o histórico clínico de aborto apresentam um aumento na probabilidade de perdas gestacionais subsequentes, de até 24% após duas perdas, 30% após três e 40% depois de quatro perdas gestacionais sucessivas (Regan et al. 1989).

### **1.3. Fatores de Risco para o Abortamento de Repetição**

O AR é uma condição multifatorial e frequentemente após a avaliação das possíveis causas, estima-se que em 50% dos casos de AR as causas não são identificadas (idiopáticos), o que justifica a condição angustiante do casal e a frustração do clínico (Kiwi 2006; Toth et al. 2010). Dos fatores de risco já identificados que predispõem ao AR citam-se: fatores anatômicos ou uterinos, infecciosos, endócrinos, hematológicos, imunológicos e genéticos (Kiwi 2006; Rai e Regan 2006; Ford e Schust 2009; Pildner von Steingurg e Schneider 2009).

### **1.4. Fatores Ambientais**

Diversos estudos sobre os efeitos da exposição a fatores ambientais na gestação concentram-se apenas no risco ao abortamento esporádico ao invés do risco ao AR. Os resultados em grande parte são conflitantes e dados precisos de doses tóxicas de exposição são difíceis de obter (Rai and Regan 2006). Parece lógico que a exposição de forma ativa ou passiva ao tabaco aumenta o risco de abortamentos esporádicos, devido à ação vasoconstritora da nicotina e consequente redução do fluxo sanguíneo na placenta. No entanto, evidências do efeito desta exposição no risco de abortamentos são controversas e inconclusivas (ACOG 2002; Lindbohm et al. 2002; George et al. 2006).

De forma similar, é questionável o efeito da cafeína no risco de abortamentos esporádicos, embora haja evidências de que quantidades mínimas de café por dia aumentem o risco de maneira dose-dependente (Domínguez-Rojas et al. 1994; Cnattingius et al. 2000). Além disso, é relatado que a cafeína possui efeito na redução do fluxo sanguíneo placentário e também é associada a distúrbios no processo gestacional (Chen et al. 2014). Fatores de risco, como obesidade (Índice de massa corporal (IMC):  $\geq 28$  ou 30



kg/m<sup>2</sup>) estão associados com o aumento do risco para AR em mulheres que já conceberam naturalmente (Boots e Stephenson 2011).

É estabelecido que o consumo de álcool causa efeitos adversos no desenvolvimento fetal, e pode ocasionar o desenvolvimento da síndrome alcóolica fetal, ademais não há quantidade segura da sua ingestão na gestação (ACOG 2011). Outra característica do seu consumo é que um dos seus metabólitos, o Acetaldeído possui ação teratogênica e pode ser o agente causal dos defeitos congênitos relacionado ao álcool (Webster et al. 1983; Hard et al. 2001). Portanto, é difícil correlacionar o seu consumo ao risco de abortamentos espontâneos. Na mesma direção, alguns estudos sugerem que a cocaína representa um fator de risco independente para a perda gestacional, embora os dados sejam conflitantes. Assim, mulheres usuárias de “crack” (*crack-cocaine*) provavelmente são desnutridas e compõem um grupo em alto risco de infecção por DSTs (Doenças Sexualmente Transmitidas) e provavelmente abusam de outras drogas ilícitas e álcool, além disso, presumivelmente não comparecem aos cuidados de rotina pré-natal (Mills 1999; Ness et al. 1999). Dado isto, torna-se difícil determinar os efeitos adversos da cocaína na gestação.

#### **1.4.1. Fatores Uterinos**

As anormalidades anatômicas são observadas em cerca de 15% dos casos de AR, muitas vezes sendo consideradas como o fator causal das perdas gestacionais (Salim et al. 2003; Ford and Schust 2009). As malformações uterinas podem ser de origem adquirida ou congênita. Estima-se que 6% da população feminina apresentam defeitos mullerianos (congênitos) (Kiwi 2006). Das malformações congênitas, frequentemente associadas a perdas gestacionais, citam-se: útero didélfico, bicorno, arqueado e septado, sendo o último o principal fator de risco para perdas gestacionais recorrentes (ACOG 2002; Proctor e Haney 2003; Larsen et al. 2013).

A presença de aderências uterinas “cicatrizadas” ou sinéquias uterinas associadas à síndrome de *Asherman* podem ter impacto no sucesso gestacional resultando no abortamento (ACOG 2002; Ford e Schust 2009). Da mesma forma, a presença de fibroides uterinos (leiomiomas), também está associada a perdas gestacionais, provavelmente por impedir a implantação (Bajekal e Li 2000; Kiwi 2006).

De forma generalizada, sugere-se que os abortamentos ocasionados devido a estas falhas, estão associados a defeitos no remodelamento vascular do endométrio, causando a

implantação e placentação inadequadas do feto, resultando em abortamentos (Kiwi 2006; Ford e Schust 2009; Branch et al. 2010).

#### **1.4.2. Fatores Hormonais e Metabólicos**

Dos distúrbios endócrinos e metabólicos propostos como agentes causais do AR, destaca-se o metabolismo da glicose, a disfunção da tireoide e disfunções dos hormônios sexuais. É descrito que mulheres diabéticas do tipo II, hiperglicêmicas e com altos valores de hemoglobina glicosilada durante o primeiro trimestre de gestação possuem maior risco de abortamento (Rosenn et al. 1994). Doenças relacionadas aos hormônios da tireoide, bem como autoimunidades a esta relacionadas, também são associadas ao risco de AR (Abalovich et al. 2002; Prummel e Wiersinga 2004).

A síndrome do ovário policístico é uma patologia comum que afeta de 10-20% das mulheres na idade reprodutiva, e em mulheres com AR a prevalência é de até 40% (Rai et al. 2000; Toth et al. 2010). Algumas das manifestações desta patologia incluem altos níveis de hormônio luteinizante, glicose e insulina. Sugere-se que a resistência à insulina e a consequente hiperinsulinemia participa na etiologia do AR, visto que, um declínio na taxa de abortamentos é observado em mulheres tratadas com Metformina (Velazquez et al. 1994).

As irregularidades da fase lútea já foram propostas como a causa de abortamentos, no entanto, atualmente, devido à inconsistência dos dados, estas associações permanecem especulativas (Ford e Schust 2009; Pildner von Steingurg e Schneider 2009; ASRM et al. 2012).

#### **1.4.3. Fatores Infeciosos**

Não há evidências de que infecções possam causar perdas gestacionais recorrentes, embora alguns agentes infecciosos, como o *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, vírus do herpes simplex, sarampo e Citomegalovírus sejam reconhecidos como agentes causais de abortamentos esporádicos (ACOG 2002; Ford e Schust 2009; Pildner von Steingurg e Schneider 2009). Portanto, não há evidências que indiquem a pesquisa destes organismos na conduta clínica de mulheres com AR (ASRM et al. 2012).

#### **1.4.4. Fatores Hemostáticos**

A gestação é caracterizada por um estado de hipercoagulação, devido a isto episódios de tromboembolismo venoso podem ser observados durante o período gestacional (Lockwood 2006). Tradicionalmente, a trombofilia é definida como uma tendência ao desenvolvimento de trombose. É descrito que mulheres com trombofilias adquiridas ou herdadas possuem um maior risco de abortamentos e diversas complicações obstétricas, decorrentes dos danos aos vasos coriônicos, redução da perfusão placentária, resultando no acúmulo de espécies reativas de oxigênio e consequente apoptose das células do trofoblasto (Kiwi 2006; Rai e Regan 2006; Baek et al. 2007; McNamee et al. 2012).

Entre as trombofilias adquiridas associadas ao AR estão a hiperhomocisteinemia, resistência à proteína C reativa e a presença de anticorpos antifosfolípidos (Kiwi 2006; Rai e Regan 2006; Larsen et al. 2013).

Já as trombofilias hereditárias devido a mutações em genes responsáveis pelo mecanismo de coagulação tais como o Fator V (Leiden), Fator II (Protrombina), Anti-trombina e Metileno Tetrahydrofolato Redutase são extensamente estudadas no AR (Rai e Regan 2006; McNamee et al. 2012). Devido à contradição observada nestes estudos, principalmente devido ao reduzido tamanho amostral destes, apenas duas meta-análises observaram uma associação entre o risco de perdas gestacionais recorrentes e mutações genéticas, referentes aos genes do Fator V (G1691A) e Fator II (G20210A) (Rey et al. 2003; Kovalevsky et al. 2004). Ainda assim, atualmente é questionado o papel destas mutações em complicações gestacionais, uma vez que grandes estudos prospectivos não observaram tais associações (Dizon-Townson et al. 2005; Said et al. 2010; Silver et al. 2010). No entanto, a inclusão da pesquisa destes fatores hereditários na rotina clínica de mulheres com AR não é atualmente recomendada (ASRM et al. 2012).

#### **1.4.5. Fatores Imunológicos**

Mecanismos imunológicos estão envolvidos no sucesso da implantação do blastocisto. A plasticidade da resposta imunológica materna à implantação é central no estabelecimento da unidade fetal. Portanto, abortamentos podem acontecer como consequência de distúrbios no equilíbrio imune ou inapropriada resposta humoral ou celular direcionada ao feto (Toth et al. 2010). Um crescente interesse centra na função das

células *natural killer* (NK) nos distúrbios reprodutivos, visto que estas células na mucosa uterina atuam no controle da invasão do trofoblasto e na regulação de processos angiogênicos, além disso, observa-se um aumento na frequência destas células em mulheres com AR (Rai e Regan 2006; Quenby et al. 2009; King et al. 2010).

Outras células também relevantes no processo gestacional são as células Treg e Th17, as primeiras possuem papel na supressão da resposta imune, prevenindo a rejeição do feto e as Th17 contribuem para processos inflamatórios e autoimunes. É descrito que a resposta imunológica com altos níveis de Treg esteja associada ao sucesso gestacional. Por outro lado, o predomínio de células Th17 está associado a eventos de abortamento (Wang et al. 2010).

O papel das citocinas também é relevante, visto que na gestação normal observa-se um predomínio de citocinas do tipo Th2. Em contraste, a produção predominante de citocinas Th1 é observada em mulheres com AR (Raghupathy et al. 2000). Atualmente, existe um consenso de que uma série de auto-anticorpos tais como, anti-fosfolípidos, anti-nuclear e anti-tireoide estão elevados em mulheres com AR e possivelmente representem um valor prognóstico negativo. No entanto, não há evidências que comprovem o efeito prejudicial destes na gestação (Larsen et al. 2013). É observado que o antígeno leucocitário humano G tem importante papel nas complicações gestacionais, incluindo o AR (Hviid 2006). É descrito que a atividade das células NK no útero durante a gravidez possa ser atenuada ou modificada pelo HLA-G expresso ou secretado pelas células do trofoblasto (Hviid 2006; Larsen et al. 2013). Dessa forma, a menor expressão de HLA-G pode acarretar em complicações gestacionais.

## **1.5. Fatores Genéticos**

As anormalidades genéticas podem ser de origem estrutural ou citogenética ou mutações em um único gene. No mínimo, estima-se que 50% dos abortamentos são decorrentes de anormalidades citogenéticas, sendo mais frequente a trisomia, seguido por poliploidia e monossomia do cromossomo X (Stephenson e Sierra 2006; Pildner von Steingurg e Schneider 2009). Estima-se que em 5% dos casais com AR, um dos parceiros apresenta anormalidades cromossômicas. Das aberrações mais comumente observadas são as translocações recíprocas e translocações Robertsonianas (De Braekeleer e Dao 1990; Stephenson e Sierra 2006; Franssen et al. 2006). Portadores de translocações recíprocas são

fenotipicamente normais, mas considera-se que 50-70% dos gametas produzidos são não-balanceados, devido a segregação anormal na meiose (Rai e Regan 2006).

Embora as aberrações cromossômicas sejam identificadas nos casos de AR, a incidência tende a reduzir com o número de abortamentos, sugerindo que outros mecanismos atuem na etiologia das perdas gestacionais, principalmente em abortamentos recorrentes (Larsen et al. 2013).

A expressão de uma série de diferentes genes é sugerida como requisito para a manutenção de uma gestação saudável. Em casais cromossomicamente normais, diferentes variantes polimórficas foram propostas como fatores de susceptibilidade ao AR idiopático (vide revisão de Daher et al. 2012). De fato, é observado um aumento na expressão de distintos grupos de genes relacionados ao AR: genes relacionados à imunossupressão, acoplamento embrionário, angiogênese e em especial genes relacionados a apoptose (Choi et al. 2003; Baek 2004).

## **1.6. O Antígeno Leucocitário Humano G**

O HLA-G é uma molécula central na tolerância imune devido à capacidade de inibir diferentes subtipos celulares envolvidos na imunidade inata e adaptativa (Sabbagh et al. 2014). Ele interage com diversos receptores expressos em células imunes e não imunes, tais como células decíduais Natural Killer (dNK), Linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos e células endoteliais (Hunt et al. 2007). Tais interações específicas contribuem: (a) na supressão imune da atividade citotóxica da dNK, inibição da proliferação de linfócitos T CD4+, CD8+ e linfócitos B, bem como na indução da apoptose de linfócitos CD8+ via sistema apoptótico FAS-FAS-L e (b) na estimulação do desenvolvimento placentário através da secreção de fatores angiogênicos pelas células dNK e macrófagos (Fournel et al. 2000; Rajagopalan e Long, 2012; Le Bouteiller 2015). Interessantemente, a molécula esta presente em diversas condições patológicas e benéficas, como em aloenxertos, tumores, infecções virais e autoimunidades (Matte et al. 2004; Lila et al. 2007; Carosella et al. 2008; Cordero et al. 2009).

Devido à expressão preferencial nas células do trofoblasto extraviloso, é proposto que o HLA-G participe da tolerância materno-placentária, permitindo a permanência e sobrevivência do feto no hospedeiro geneticamente diferente durante a gestação saudável. De fato, a estratégia de evasão imune mais importante do feto é a ausência da apresentação

de antígenos paternos por moléculas clássicas do MHC (Trowsdale e Betz, 2006). Apesar do HLA-G possuir a capacidade de ligar-se a peptídeos, até o momento, não há estudos que descrevam a função clássica de apresentação de antígenos, o que sugere outras funções para esta molécula. No que se refere às funções do HLA-G, destacam-se em especial as interações com os receptores inibitórios: ILT-2, ILT-4 (*immunoglobulin-like transcript-2 e -4*) e KIR2DL4 (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor-2DL4*) os quais são expressos em uma variedade de células imunes (vide revisão em Dahl e Hviid 2012). As células do trofoblasto humano não expressam moléculas clássicas de classe I do MHC, como o HLA-A, -B, mas expressam baixas quantidades do -C e principalmente as formas não clássicas de classe I: HLA-E, -F e -G, sendo o antígeno G o mais abundante (Redman et al. 1984; McMaster et al. 1995; Trowsdale e Betz 2006).

O gene do *HLA-G* está localizado no complexo HLA na região cromossômica 6p21.3. Uma característica interessante do gene é o padrão de *splicing alternativo*, que resulta em 7 diferentes isoformas, das quais 3 são solúveis (G5-G7) e 4 são ancoradas na membrana (G1-G4) (Ishitani e Geraghty 1992) (**Figura 1**).

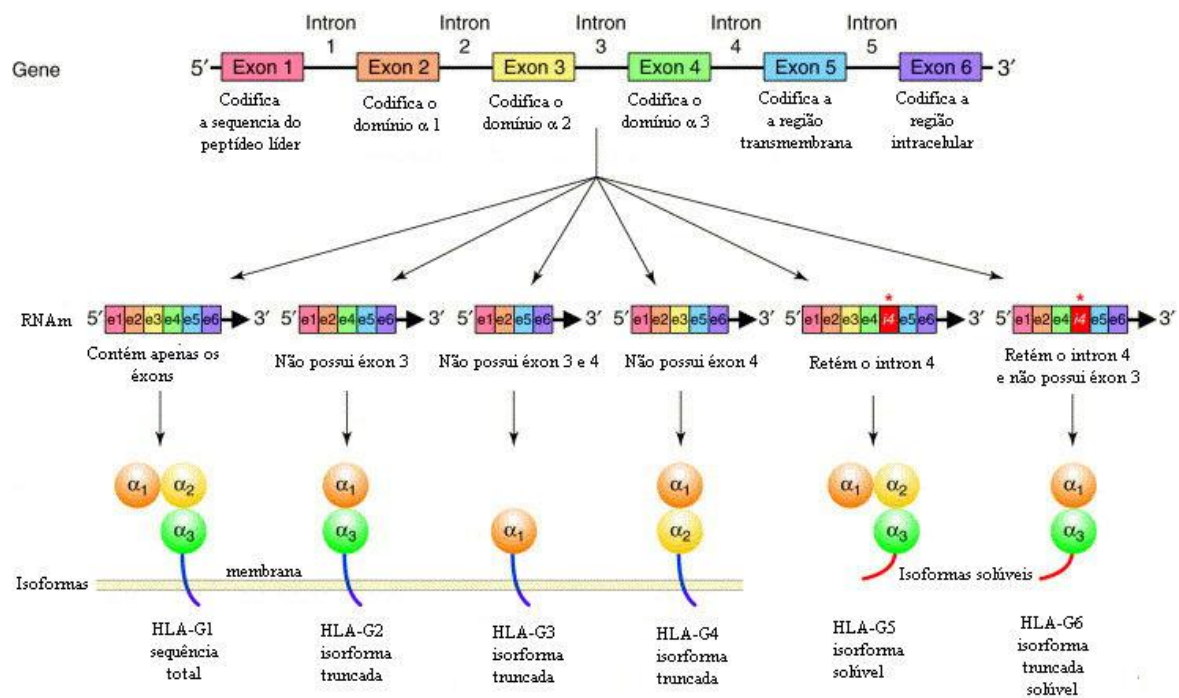


Figura 1. Processamento alternativo do RNA mensageiro do gene *HLA-G*. Adaptado de Donadi et al.,2011.

Diferentemente das suas contrapartes clássicas altamente polimórficas, o gene do *HLA-G* possui baixo polimorfismo na região codificadora, em particular ao nível proteico, o que sugere uma forte seleção purificadora atuando no segmento que codifica a molécula do HLA-G (Castelli et al. 2011; Donadi et al. 2011).

Atualmente, 50 alelos do gene *HLA-G* foram validados conforme descrito no banco de dados do IMGT/HLA versão 3.20.0 (onde IMGT significa projeto internacional de imunogenética) (Robinson et al. 2015). Inversamente, uma alta variação nas regiões regulatórias do gene, é observada. É descrito que as regiões 5' UTR (região não traduzida) e 3' UTR influenciam a magnitude de expressão do HLA-G tanto ao nível transcricional quanto pós-transcricional (Castelli et al. 2011). Das regiões regulatórias do gene, destaca-se principalmente a região 3' UTR, pois é observado que sítios polimórficos nesta região influenciam a expressão do gene, devido a afinidade por micro RNAs (miRNA) ou por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) (Yie et al. 2008; Veit e Chies 2009).

Na região 3' UTR do gene *HLA-G* foram descritos oito variantes frequentes na população brasileira, embora é descrito outras variantes neste *locus* em diferentes populações (Castelli et al., 2015). Na população brasileira foram descritas: a inserção/deleção de 14-pares de bases (pb) na posição +2960 (rs66554220), +3003 T/C (rs1707), +3027 C/A (rs17179101), +3035 C/T (rs17179108), +3142 G/C (rs1063320), +3187 A/G (rs9380142) e +3196 C/G (rs1610696) (Castelli et al. 2010). Destes polimorfismos, três estão implicados na expressão diferencial do *HLA-G*, o inserção/deleção 14-pb, +3142 G/C e +3187 A/G (**Figura 2**).

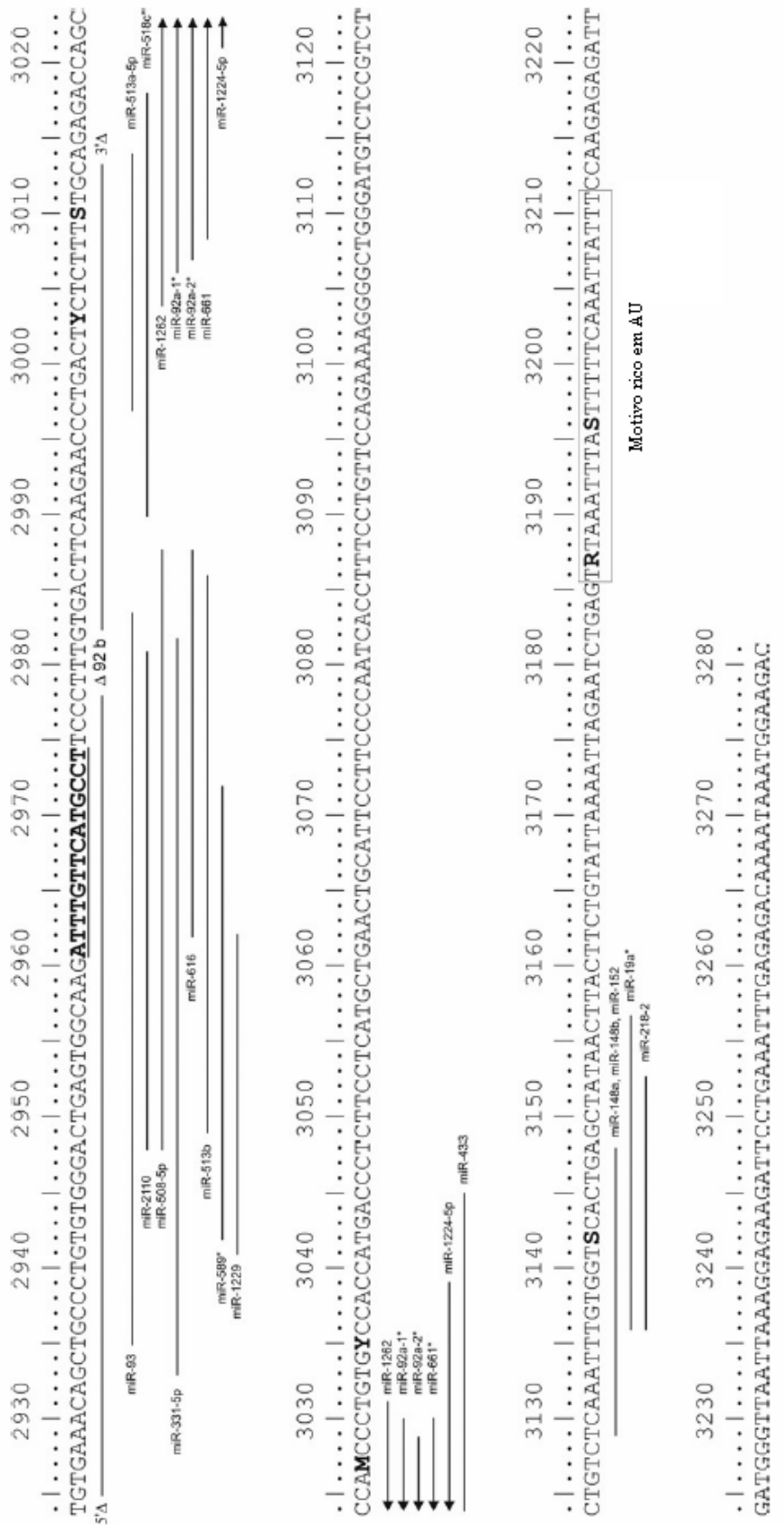


Figura 2. Principais variante genéticas observadas na região 3'UTR do gene *HLA-G* na população brasileira, bem como alguns miRNAs que são influenciados por estas variantes polimórficas. Adaptado de Castelli et al., 2010.



É descrito que a inserção de 14-pb gera um processamento adicional de 92 bases a partir do éxon 8 em uma fração de RNA mensageiros dependendo da linhagem celular. Tal deleção de 92 nucleotídeos (inclui os SNPs +3003 e +3010) resulta numa forma mais estável e com maior resistência a degradação do RNAm em comparação a forma original do transcrito (Rousseau et al. 2003). É importante ressaltar que alguns alelos do *HLA-G* que contém esta inserção são associados com menores níveis de expressão de RNAm tanto para as isoformas ligadas a membrana quanto as solúveis em células do trofoblasto (Hviid et al. 2003). Devido a estas observações, a inserção de 14-pb é associada a diversas condições patológicas como lúpus eritematoso sistêmico (LES), rejeição a transplantes, pré-eclâmpsia (PE) e AR (Crispim et al. 2008; Rizzo et al. 2008; Moreau et al. 2008). No entanto, a associação deste SNP com a pré-eclâmpsia e perdas gestacionais recorrentes ainda permanece controversa (Vianna et al. 2007; Iversen et al. 2008; Wang et al. 2013; Fan et al. 2014).

O SNP +3142 G/C propicia a ligação de miRNAs específicos, que são pequenos RNAs envolvidos na regulação pós-transcricional do gene, com a habilidade de induzir a clivagem do RNAm ou reprimir a tradução. É descrito que a presença do alelo G está associada à maior afinidade de miRNAs ao RNAm, o que de fato é sugerido como o possível mecanismo que explique a susceptibilidade a doenças, como asma e LES (Tan et al. 2007; Castelli et al. 2009; Consiglio et al. 2011; Porto et al. 2015).

Já o SNP +3187 A/G é encontrado próximo a um elemento rico em Adenilato-Uridilato (AU) o qual medeia a degradação do RNAm. A presença do alelo A é associada a menor estabilidade do transcrito *in vitro* e a menor produção de HLA-G pela placenta durante a gestação, favorecendo o desenvolvimento de pré-eclâmpsia (Yie et al. 2008). É importante observar que a variante de 14-pb é quase sempre acompanhada pelos alelos +3142G e +3187A (Ins+G+A), ambos associados previamente a menores níveis de RNAm, o que sugere a menor produção de HLA-G que pode ser o resultado da presença combinada destes polimorfismos (Castelli et al. 2010).

Alguns estudos de associação acerca das variantes polimórficas na região 3' UTR do gene *HLA-G* publicados até o momento têm observado resultados contraditórios entre as populações humanas e isto pode ser devido à associações espúrias devido a diferenças nas frequências dos alelos e/ou frequências haplotípicas entre as diferentes populações o que explica tais inconsistências na literatura (Goldstein e Chikhi 2002; Sabbagh et al. 2014).

Diante disto, com base na fase gamética dos oito polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) observados na região 3' UTR do gene *HLA-G*, Castelli e colaboradores (2010) descreveram oito principais haplótipos (UTR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7 e -8) presentes na população Brasileira, dos quais, o haplótipo UTR-1 é previamente associado a maiores níveis de sHLA-G (HLA-G solúvel), enquanto que o UTR-2, -3, -4 e -6 expressam níveis intermediários e o UTR-5 e -7 os menores níveis (Martelli-Palomino et al. 2013).

### **1.7. Apoptose**

A apoptose é uma forma de morte celular programada, essencial para o desenvolvimento normal e para a função de organismos multicelulares (Kerr et al. 1972). Este processo ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após o dano celular por agentes genotóxicos (Ranganath e Nagashree 2001).

As etapas de sinalização que conduzem a apoptose convergem da formação de um complexo de sinalização indutor de morte celular. O complexo é comum às duas vias possíveis de indução da apoptose.

A ativação da destruição celular é orquestrada através do recrutamento da família de cisteína-proteases ou caspases (possuem uma cisteína no sítio ativo) que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos de aspartato. Além disso, a ativação das caspases potencializa o sinal apoptótico através da ativação de uma ampla variedade de proteínas pró-apoptóticas (Sharp et al. 2010). Tais proteínas podem pertencer à família dos receptores do fator de necrose tumoral e as proteínas da família do BCL-2 (linfoma de células B tipo 2). O processo de iniciação da apoptose pode ser desencadeado por duas vias: a via extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) (**Figura 3**).

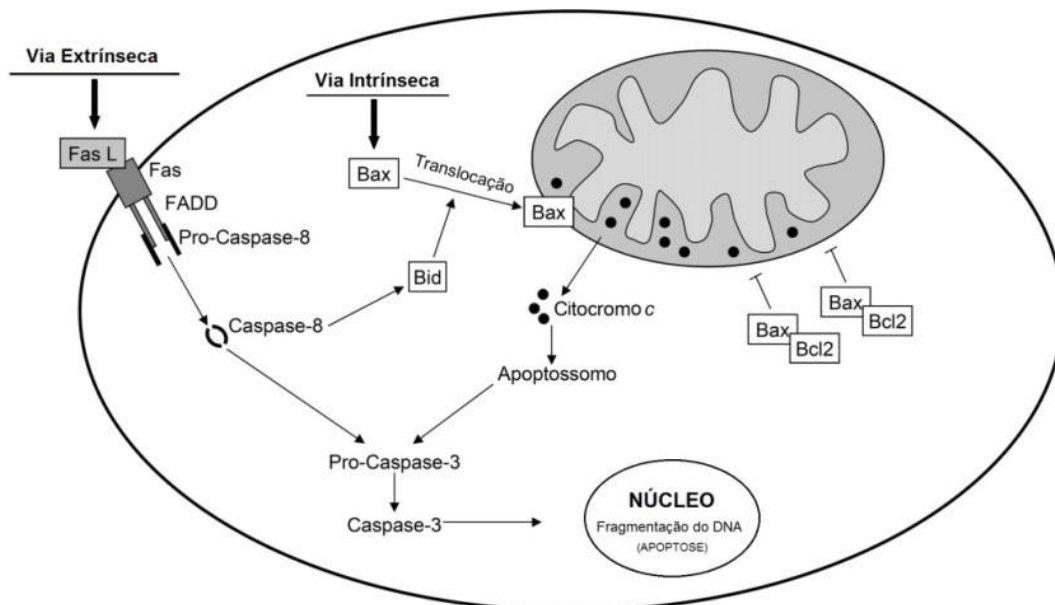


Figura 3. Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Representação esquemática descrevendo as principais moléculas de sinalização envolvidas nas vias extrínseca (receptores de morte) e intrínseca (mitocondrial) da apoptose. Adaptado de Bruin et al., 2008.

Do ponto de vista reprodutivo, é demonstrado que a apoptose é um processo essencial durante os primeiros estágios da gestação, além de participar de muitas funções fisiológicas: promove a adequada remodelação da decídua materna, atua no controle da invasão do trofoblasto e na manutenção do balanço da tolerância imune materno-placentária (Aschkenazi et al. 2002; Huppertz et al. 2006). Durante os processos de diferenciação e invasão, as células do trofoblasto dividem-se para formar a interface materno-placentária, enquanto outros tipos celulares do trofoblasto invadem a decídua materna para remodelar as artérias espirais do endométrio permitindo a acomodação e expansão do tecido extraembrionário e assim estabelecendo um efetivo fluxo sanguíneo para a placenta e para o feto em desenvolvimento (Straszewski-Chavez et al. 2005; Huppertz et al. 2006; Sharp et al. 2010).

Na gestação normal é observada uma contínua mudança nas atividades apoptóticas no tecido placentário, sendo menores no primeiro trimestre e eminentes ao longo do terceiro trimestre de gestação (Smith et al. 1997). É sugerido que a invasão ineficiente do trofoblasto seja um dos eventos implicados na patogênese do abortamento (Sebire et al. 2002; Jauniaux et al. 2003). Portanto, a apoptose parece ter um papel essencial neste processo. Além disso, é observada uma correlação positiva entre a atividade apoptótica nas células do trofoblasto viloso e diversas complicações gestacionais, como PE, restrição do

crescimento fetal e abortamento (Hempstock et al. 2003; Minas et al. 2007; Longtine et al. 2012).

Visto que os processos apoptóticos participam de diversas etapas durante a gestação e que levam à aceitação/não rejeição do feto, se constituindo de diferentes interações entre proteínas apoptóticas específicas para manter a homeostasia tecidual e celular, é sugerido que a atividade apoptótica exacerbada possa ser uma consequência direta de alterações nos genes/proteínas relacionadas à morte celular programada. Além disso, níveis elevados de expressão destas moléculas, foram observados em análises transcriptômicas minuciosas do vilão coriônico de mulheres com AR, sugerindo a possível associação de genes apoptóticos e seus transcritos relacionados à etiopatogenia do AR (Baek et al. 2002; Choi et al. 2003).

#### **1.7.1. A via extrínseca: o sistema FAS-FAS-L**

A via extrínseca é induzida através de sinais que divergem de diversos tipos de estresse extracelulares, os quais são direcionados e propagados por meio receptores transmembrana específicos (Hengartner 2000; Wajant 2002). Tais receptores possuem um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana único e um domínio de morte intracelular, o qual é requerido pelos receptores para ativar o programa apoptótico. A via é controlada principalmente pelos receptores membros da superfamília do fator de necrose tumoral, a qual inclui um receptor para o próprio fator de necrose tumoral (TNF) e pelo receptor de morte FAS (Sharp et al. 2010).

Quando o receptor de membrana FAS, também conhecido como TNFRSF6/CD95/APO-1, está presente na superfície da célula alvo e reconhece seu ligante letal específico FAS-L (FAS ligante), também conhecido como TNFSF6/CD95LG, o domínio de morte presente nas caudas citosólicas dos receptores de morte FAS recrutam moléculas adaptadoras designadas FADD (domínio de morte associado ao FAS), também conhecidas como MORT-1 (mediador do receptor induzido por toxicidade-1) (Igney e Krammer 2002). O acoplamento destas por fim, confere a habilidade de recrutar caspases iniciadoras, como a caspase-8 ou 10, formando o complexo de sinalização indutor de morte (DISC) que irá ativar a caspase-3 e posteriormente irá mediar a morte por apoptose (Daniel 2000) (**Figura 4**).

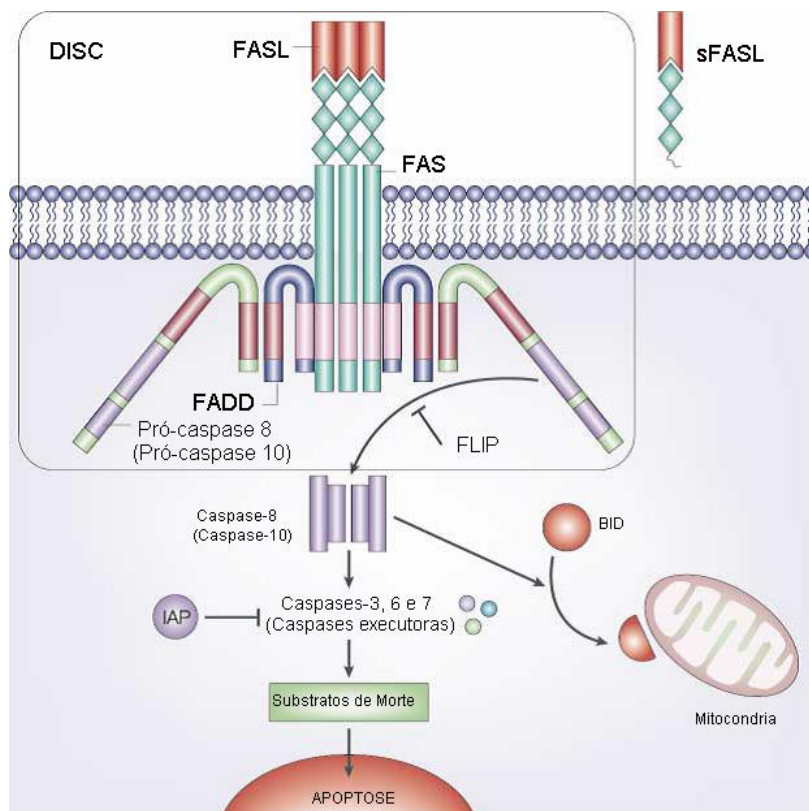


Figura 4. Representação esquemática da via extrínseca. Após a interação entre os receptores de morte (FAS) e seu ligante específico (FAS-L) ocorre o acoplamento de FAAD e formação do complexo indutor de morte (DISC), que por sua vez recruta e ativa as caspases iniciadoras e executoras que iram atuar no processo de morte celular. Adaptado de Igney e Krammer, 2002.

O sistema FAS-FAS-L, é uma das principais vias de apoptose envolvidas na homeostase celular e tecidual e é importante na manutenção do privilégio imune nos olhos, tumores e testículos (O’Connell et al. 2001; Lee and Ferguson 2003). Alguns estudos observam que disparidades nesta via resultam não apenas na redução da expressão de FAS, mas também na aberrante expressão de FAS-L em tumores (Loro et al. 1999; Gastman et al. 1999). Além disso, é descrito que a ativação de linfócitos T por antígenos estranhos é capaz de induzir a expressão de FAS, uma vez que ligado com FAS-L desencadeia a cascata apoptótica que acaba eliminando estes linfócitos e suprimindo a resposta imune (Abrahams et al. 2004; Qiu et al. 2005).

Interessantemente, em camundongos, as mutações no *locus Lpr* (linfoproliferação) e *Gld* (Doença linfoproliferativa generalizada) possuem efeito deletério na expressão do antígeno FAS e FAS-L, respectivamente. Devido à incapacidade destes camundongos em mediar a apoptose via o receptor FAS ou FAS-L, observa-se o desenvolvimento de complexas desordens imunológicas. Dado isto, os genes *FAS* e *FAS-L* são extensamente

estudados em autoimunidades, como LES, artrite reumatoide e câncer (Wu et al. 2003; Zhang et al. 2009; Sezgin et al. 2013; Yildir et al. 2013).

O gene *FAS* está localizado no cromossomo 10q24.1, consiste de nove éxons e oito íntrons e codifica dois produtos através do *splicing alternativo* do RNAm: (1) uma proteína-transmembrana de 334 aminoácidos e (2) a forma solúvel de FAS (sFAS) desprovida de domínio transmembranar, que quando ligada ao FAS-L pode bloquear a apoptose mediada por FAS (Cheng et al. 1994). Entre outros, foram descritos dois interessantes polimorfismos de nucleotídeo único localizados na região promotora do gene *FAS*: (1) o polimorfismo localizado na região -670 (rs1800682) na qual ocorre uma transição de A→G e altera o sítio de ligação do fator de transcrição-1 (STAT-1) e (2) a transição G→A na posição -1377 (rs2234767) que altera estruturalmente o sítio de ligação do fator de transcrição da proteína estimulatória 1 (Sp1) (Sibley et al. 2003).

O gene de *FAS-L* está localizado no cromossomo 1q23 e consiste de quatro éxons e codifica uma proteína de aproximadamente 281 aminoácidos. A clivagem proteolítica de FAS-L acoplada a membrana pode gerar sua forma solúvel (sFASL) que possui fraca atividade apoptótica, e compete com FAS-L de membrana para indução da apoptose (Suda et al. 1997; Shudo et al. 2001). Dois importantes SNPs foram reportados na região promotora: (1) na posição -844 (rs763110) ocorre uma transição de T→C que altera o motivo de ligação para um fator de transcrição putativo (proteína β intensificadora de ligação a *CAAT box*), tal modificação altera os níveis basais da expressão de FAS-L (Wu et al. 2003) e (2) uma transição de A→G na posição 124 no íntron 2 (INV2nt\_124, rs5030772) (Yildir et al. 2013).

Considerando que estas variações na região promotora dos genes *FAS* e *FAS-L* influenciam na expressão gênica, e que estes genes estão envolvidos na regulação da morte celular, a expressão anormal de FAS e FAS-L têm sido correlacionada a complicações na gestação. É relatado que o polimorfismo -670 A/G no gene *FAS* confere susceptibilidade a diversos distúrbios gestacionais, como a ruptura prematura de membranas, restrição do crescimento intrauterino e pré-eclâmpsia (Fuks et al. 2005; Robinson et al. 2009; Ciarmela et al. 2010). Além disto, recentemente, a variação -1377 G/A foi associada ao risco de abortamento recorrente em uma população Indiana (Nair et al. 2012).

Até o momento, a relevância funcional do SNP INV2nt\_124 A/G do gene *FAS-L* não foi reportada em distúrbios gestacionais. No entanto, o SNP -844 T/C foi recentemente

relacionado ao aumento da expressão do RNAm e associado ao risco de AR (Banzato et al. 2013).

Ambas as moléculas FAS e FAS-L são expressas no vilos coriônico e nas camadas decíduais, o que sugere que a morte celular quando induzida por ativação pode ter um papel na etiologia do AR. Estudos prévios sugerem que o privilégio imune estabelecido no sítio de implantação é o resultado do processo de exclusão clonal de células do sistema imunológico que reconhecem antígenos paternos presentes na placenta (Tafari et al. 1995; Hunt et al. 1997; Qiu et al. 2005). Portanto, sugere-se que tal tolerância imunológica seja determinada pela expressão de FAS-L nas células do trofoblasto extraviloso (EVT) e da decídua materna (Jiang e Vacchio 1998; Qiu et al. 2005).

### **1.7.2. A via intrínseca: as proteínas da Família Bcl-2**

A grande maioria dos eventos de morte celular em vertebrados ocorre pela via intrínseca ou mitocondrial (Green e Kroemer 2004). Esse processo pode ser ativado por diversos estímulos intracelulares ou extracelulares, como situações de estresse celular oxidativo, danos no DNA, hipóxia, ativação de oncogenes, entre outros (Galluzzi et al. 2012). Embora a cascata de sinalização que desencadeie a apoptose por esta via seja muito heterogênea, os sinais/estímulos que são transduzidos em resposta a estes danos celulares direcionam-se principalmente para a mitocôndria, geralmente por meio da ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Hengartner 2000). Frequentemente, ao longo da propagação dos estímulos pró-apoptóticos, os mecanismos anti-apoptóticos também são estimulados permitindo que as células lidem com este estresse.

Neste cenário, os estímulos pró e anti-apoptóticos convergem para a membrana mitocondrial. Quando há o predomínio de moléculas pró-apoptóticas membros da família Bcl-2, tais como BAX (proteína X associada à BCL-2) e BAK (*BCL-2 antagonist killer*), ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial externa, bem como a transição da permeabilidade mitocondrial (Kroemer et al. 2007; Galluzzi et al. 2012). Com a transição da permeabilidade mitocondrial, ocorre a perda da homeostasia celular, interrupção da síntese de ATP (adenosina trifosfato), desacoplamento da cadeia respiratória e consequente liberação do citocromo *c*, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, favorecendo um sistema de retroalimentação positiva para a amplificação dos sinais apoptóticos e por fim a liberação de inúmeras proteínas pró-apoptóticas intermembranares

para o citosol (Kroemer et al. 2007) Quando presente no citosol, o citocromo *c* forma um complexo com APAF-1 (fator 1 de ativação da protease apoptótica), denominado apoptossomo, o qual recruta e ativa a caspase-9 que por sua vez ativa a caspase-3, desencadeando a morte celular (Li et al. 1997; Igney e Krammer 2002) (**Figura 5**)

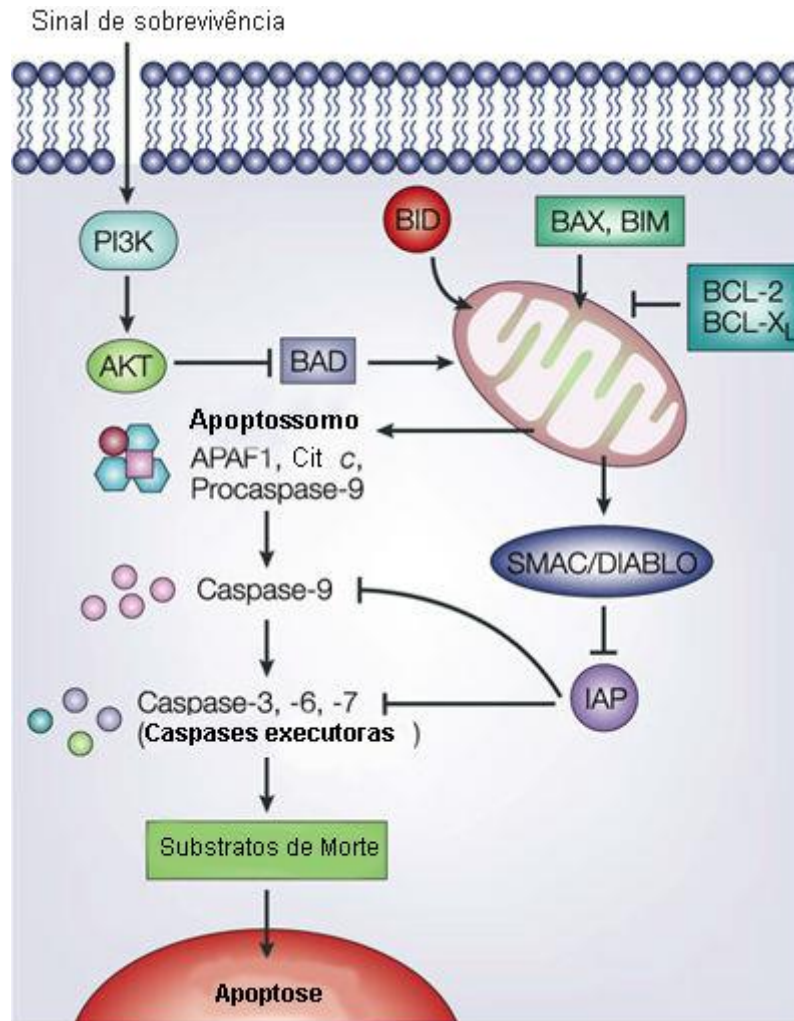


Figura 5. Representação esquemática da via intrínseca. Proteínas da família BCL2 pró-apoptóticas, como BAX, BID, BAD e BIM são importantes mediadores iniciais do processo apoptótico. Adicionalmente, SMAC (Segundo ativador mitocondrial de caspase) /DIABLO (Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI) também contribuem para a sinalização pró-apoptótica. A ação exacerbada destas proteínas na mitocôndria conduz à liberação de citocromo *c* (Cit *c*) para o citosol, onde se liga à APAF-1 para formar o apoptossomo e consequente morte celular. Estímulos anti-apoptóticos também atuam neste processo, através da ação das proteínas BCL2, BCL-XL, ação de proteína inibitórias da apoptose (IAP) e sinais de sobrevivência, tais como fatores de crescimento e citocinas, que ativam a via de fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K), as quais fosforilam e inativam a proteína BAD. Adaptado de Igney e Krammer, 2002.

A maioria das células apresenta um balanço entre os perfis anti e pró-apoptótico, e estas proteínas podem se ligar em várias combinações para formar heterodímeros, nos



quais as duas proteínas inibem as funções umas das outras. Portanto, o balanço entre as atividades dessas duas classes funcionais de proteínas da família Bcl-2 determinam se as células vivem ou morrem. As proteínas anti-apoptóticas contêm quatro domínios em homologia à proteína BCL-2 [(BH1–BH4) onde BH refere-se à homologia a BCL-2] e são geralmente integradas na membrana mitocondrial externa e a outros compartimentos celulares como o citosol e retículo endoplasmático. Os membros da família Bcl-2, como BCL-2, BCL-x<sub>L</sub> (*BCL-2 related protein long-isoform*), BCL-w e MCL-1 (*Myeloid cell leukemia-1*) são os principais membros que possuem atividades anti-apoptóticas e preservam a integridade da membrana mitocondrial através da inibição direta das proteínas pró-apoptóticas (Andersen e Kornbluth, 2013).

Os constituintes pró-apoptóticos formam duas subfamílias, as proteínas BH1, BH2 e BH3 e as proteínas que possuem apenas o domínio BH3. As proteínas BAX e BAK foram originalmente descritas possuindo apenas os domínios BH1, BH2 e BH 3, sem o domínio BH4. No entanto, estudos posteriores revelaram o quarto (BH4) motivo conservado (Kvansakul et al., 2008). As proteínas BH3 apenas compartilham homologia de sequência com *BCL-2* no domínio BH3, como *BID* (*BH3-interacting domain death agonist*), *BAD* (*BCL-2 associated agonist of cell death*), entre outras (Chipuk et al. 2010) (**Figura 6**).

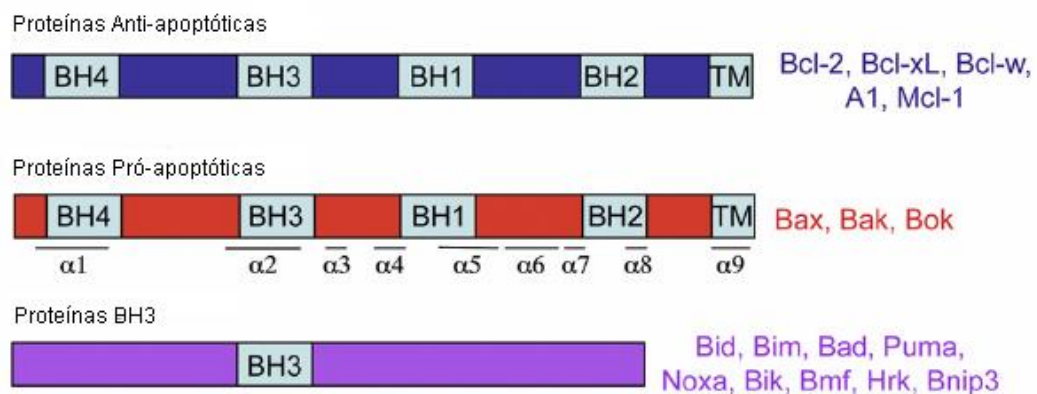


Figura 5. Estrutura das proteínas da família Bcl-2. A família é dividida em três grupos de acordo com seus domínios em homologia (BH). Proteínas pró- e anti-apoptóticas possuem 4 domínios, enquanto as proteínas BH3, apenas o domínio BH3. Adaptado de Martinou e Youle, 2011.

Dentre as proteínas mais bem caracterizadas e estudadas desta família estão a BAX e a BCL-2. A função pró-apoptótica de BAX pode ser ativada em resposta a uma ampla diversidade de estímulos intracelulares e extracelulares, causando mudanças conformacionais em BAX, formando canais na membrana extracelular da mitocôndria, prejudicando a permeabilidade, permitindo a saída do citocromo *c* levando à ativação da cascata das caspases e morte celular. O papel das proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 neste cenário parece ser o de inibir a ação das moléculas pró-apoptóticas, prevenindo a liberação do citocromo *c* (Hengartner 2000).

O gene *BCL-2* consiste de três éxons e dois promotores e está localizado no cromossomo 18q21.3. O segundo promotor do gene (P2) está localizado a aproximadamente 1400 pares de bases a montante do sítio de início da transcrição e diminui a atividade do promotor 1 (P1), funcionando como um elemento regulatório negativo (Young and Korsmeyer 1993; Nüchel et al. 2007). O gene codifica uma proteína que está localizada na membrana mitocondrial e é responsável por prevenir a morte celular em resposta a vários estímulos. Sua superexpressão e elevados níveis proteicos têm sido demonstrados como promotores de sobrevivência celular (Charo et al. 2005). O polimorfismo -938 C/A (rs2279115) está localizado no promotor inibitório (P2) do gene *BCL-2* e está em desequilíbrio de ligação com um SNP silencioso no éxon 1 (+21A>G, rs1801018) (Park et al. 2004). O alelo -938C, em comparação ao alelo A demonstra maior atividade inibitória do P2, devido a maior afinidade de ligação ao fator de transcrição Sp1, portanto, inibe a ativação do P1 e conseqüente transcrição do gene (**Figura 6**). Conseqüentemente, é observado que portadores do genótipo -938 AA possuem maior expressão de BCL-2, o qual é um marcador genético desfavorável em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B (Nüchel et al. 2007). Um segundo polimorfismo, Ala43Thr (G128A) resulta em um aminoácido treonina (códon ACC) inserido na proteína ao invés de uma alanina (códon GCC). Este polimorfismo foi associado com um aumento da resistência a doenças autoimunes e resulta em uma função anti-apoptótica diminuída em uma linhagem de pré-células B (Komaki et al. 1998). Entretanto, as possíveis implicações funcionais destes SNPs no gene *BCL-2* ainda não foram estabelecidas na susceptibilidade a distúrbios gestacionais.

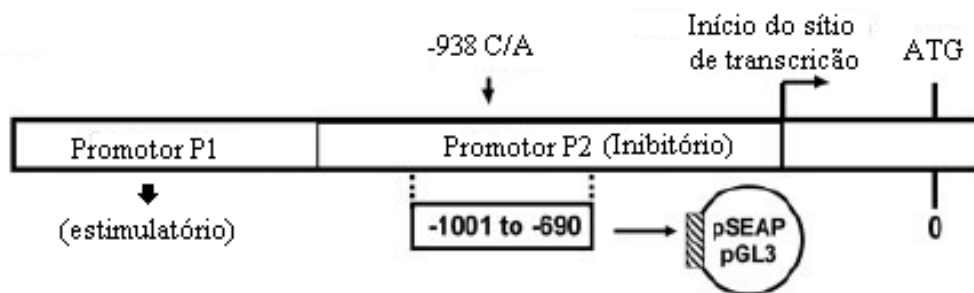


Figura 6. Estrutura da região promotora do gene *BCL-2*. A região promotora do gene consiste em dois promotores: promotor estimulatório (P1) e promotor inibitório (P2). A avaliação da atividade da região promotora foi conduzida através da construção de ‘reporters’ clonados nos vetores pSEAP e pGL3. O alelo C foi associado a maior atividade de P2 e menor expressão de *BCL-2*. Adaptado de Nüchel et al, 2006.

O gene *BAX* possui seis éxons e encontra-se no cromossomo 19q13.3. A região promotora adjacente ao gene contém quatro sítios de ligação à proteína p53, indicando uma forte correlação entre *BAX* e p53. Além disso, foi demonstrado que atividade transcricional do gene *BAX* é positivamente regulada por p53 (Miyashita e Reed 1995). É descrito que o polimorfismo no promotor do gene *BAX* -248 G>A (rs4645878) associado à redução da expressão do gene. Uma vez que o polimorfismo se encontra do lado de fora da fase de leitura aberta (ORF) do gene, este SNP não afeta a sequência de aminoácidos de *BAX*, mas pode afetar a expressão do gene ao nível da transcrição, bem como sua função (Moshynska et al. 2003). Todavia, estudos avaliando estas variantes polimórficas do gene e o risco de AR ainda são escassos. De forma interessante, o polimorfismo é associado com o aumento da sobrevivência dos neutrófilos na osteomielite (Ocaña et al. 2007). Além disto, esta variação resulta numa taxa significativamente menor de sobrevivência em pacientes com leucemia linfocítica crônica (Starczynski et al. 2005).

A expressão e balanço entre *BCL-2*:*BAX* durante o primeiro e terceiro trimestre da gestação possui papel crucial no curso de uma gestação normal. É descrito que os níveis de expressão de *BCL-2* são geralmente menores durante todo o período gestacional e que *BAX* é expresso em baixos níveis durante o primeiro trimestre, porém aumenta ao curso do fim da gestação. Esses dados indicam que *BCL-2* e *BAX* são regulados espaço-temporalmente durante todo o desenvolvimento placentário e que, em parte, a diferente expressão destes genes é responsável pelo delicado balanço entre a proliferação celular e a morte celular na placenta humana durante a gravidez (De Falco et al. 2001).

Muitas hipóteses foram propostas para explicar as possíveis causas que levam a recorrência de abortamentos, entretanto pouco progresso foi feito até o momento. A

maioria dos estudos aborda somente um ou alguns elementos envolvidos nas vias da apoptose de forma independente, o que dificulta uma compreensão global da influência da desregulação apoptótica na patogênese da doença. As causas de origem genéticas são as mais bem aceitas neste cenário. Embora a apoptose seja um fator bem aceito para a etiopatogenia de diversas complicações gestacionais, ainda não está bem esclarecido o seu papel no AR.

Diante disto, nosso estudo propõe a caracterização imunogenética de mulheres com AR, através de diferentes abordagens envolvendo os genes apoptóticos, o gene *HLA-G* e dados clínicos dos pacientes, almejando a identificação dos possíveis fatores genéticos implicados na susceptibilidade ao AR. Dessa forma, o trabalho proposto poderá contribuir para o embasamento da hipótese sobre o mecanismo de ação dos fatores imunogenéticos na ocorrência dos abortamentos recorrentes.

## **CAPÍTULO 2**

### **Objetivos**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho visa à análise dos parâmetros genéticos de pacientes com AER, através da análise da presença e frequência de variantes polimórficas relacionadas ao processo apoptótico, comparando estes dados com indivíduos controle.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as características demográficas e clínicas das mulheres com AR e múltiplas saudáveis;
- Avaliar a associação dos polimorfismos -1377 G>A e -670 A>G do promotor do gene *FAS* no risco do AR;
- Avaliar a associação dos polimorfismos -844 T>C do promotor e INV2nt\_124 A>G do íntron 2 do gene *FAS-L* no risco do AR;
- Avaliar a associação do polimorfismo -938 C>A do promotor do gene *BCL-2* no risco do AR;
- Avaliar a associação dos polimorfismos -248 G>A do promotor do gene *BAX* no risco do AR;
- Avaliar a associação dos polimorfismos 14-pb inserção/deleção, +3003 T/C, +3010 C/G, +3027 C/A, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G e +3196 C/G da região 3' UTR do gene *HLA-G* no risco do AR.

### **CAPÍTULO 3**

*The role of apoptotic genes polymorphisms (FAS, FAS-L, BCL-2 and BAX) in early recurrent pregnancy losses.*

**The role of apoptotic genes polymorphisms (*FAS*, *FAS-L*, *BCL-2* and *BAX*) in early recurrent pregnancy losses**

Rafael Tomoya Michita<sup>a</sup>, Francis Maria Bao Zambra<sup>a</sup>, Lucas Rosa Fraga<sup>a</sup>, Maria Teresa Sanseverino<sup>b,c</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>a</sup> and Priscila Vianna<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Immunogenetics Lab, Department of Genetics, Biosciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>National Institute of Science and Technology in Populational Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Manuscrito em preparação a ser submetido em revista de circulação internacional.

**\*Corresponding author:** Priscila Vianna, Immunogenetics laboratory, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue 9500, Campus do Vale, CEP 91501970, Porto Alegre, RS 15053, Brazil, Tel: +55 51 3316-6740; Fax: +55 51 3316-7311; Email: privianna@gmail.com



## **Abstract**

The recurrent pregnancy loss (RPL) covers two or more consecutive pregnancy interruptions until 24 weeks. The etiology of RPL is well studied, however more than 50% of the RPL are of unknown causes. During pregnancy, apoptosis play an important role in remodeling the endometrium for an effective embryonic development. Here we analyzed six polymorphic variants in genes related to the intrinsic (*BCL-2* and *BAX*) and extrinsic (*FAS* and *FAS-L*) pathways of apoptosis and its relation with RPL. Demographic and clinical characteristics of 294 women were analyzed. The genotypic and allelic frequencies of *FAS*, *FAS-L*, *BAX* and *BCL-2* gene polymorphisms in control and RPL groups did not differ. Our study does not support the hypothesis that the polymorphic variants of the genes *FAS*, *FAS-L*, *BCL-2* and *BAX* here studied could influence the risk of developing RPL in the Brazilian population. However, further studies should be conducted in a larger sample size in attempt to detect these effects.

**Keywords:** Apoptosis; Pregnancy loss; Polymorphisms, Recurrent miscarriages.

## **Introduction**

Apoptosis is a fundamental physiological process for the selective elimination of cells participating in a range of biological events for the maintenance of the organism homeostasis (Kerr et al. 1972). Different proteins are involved in the apoptotic pathway activating or inhibiting the programmed cell death process. Two important routes can trigger the apoptotic process: the intrinsic or the extrinsic pathways. From the physiologic processes controlled by apoptosis, the pregnancy is an event that requires a strong modulation of the trophoblast cells in order to accommodate the recent fertilized oocyte. For this, apoptosis play an important role in remodeling the endometrium for an effective embryonic development. It could be suggested that some pregnancy complications such as abortion may develop by problems during the apoptotic process(Kiwi 2006; Jauniaux et al. 2006; Ford and Schust 2009; Branch et al. 2010).

The FAS and its ligand FAS-L proteins are expressed in many cells types and tissues and are responsible for the activation of the extrinsic apoptotic pathway. The binding of FAS-L and its death receptor FAS recruit some adapters molecules that induce the activation of caspases, forming the Death Inductor Signalizing Complex (DISC). The FAS/FAS-L system is one of the major apoptotic pathway involved in cellular and tissue homeostasis (Nagata and Golstein 1995). The FAS and FAS-L proteins are expressed in the chorionic villous and decidua of trophoblast during pregnancy playing a role in the maintenance of pregnancy.

The Bcl-2 family comprehends anti-apoptotic as well as pro-apoptotic proteins (BCL-2 and BAX, respectively) and is crucial in regulation of the intrinsic pathway of apoptosis. The anti-apoptotic protein BCL-2 prevents apoptosis either by sequestering proforms of death-driving caspase or by precluding the release of mitochondrial apoptogenic factors into the cytoplasm (Tsujimoto 1998). In contrast, the pro-apoptotic member of this family, the BAX protein, induces the release and activation of caspases and mitochondrial apoptogenic factors into the cytoplasm via acting on mitochondrial permeability transition pore. In this way, the Bcl-2 family proteins acts as a critical life-death decision point within the common pathway of apoptosis

Nowadays, the occurrence of abortions has significantly increased. One reason for this could be the advanced age in which women decide to become pregnant. Besides this, there is a range of risk factors involved in abortion, among them: genetic, infectious, morphological, hormonal, metabolic, environmental, and immunological factors. Even with the knowledge of many risk factors for abortion, some women suffered from recurrent

pregnancies losses (RPL) with unknown causes. The recurrent pregnancy loss covers two or more consecutive pregnancy interruptions until 24 weeks (Rai and Regan 2006). The etiology of RPL is well studied, however more than 50% of the RPL are of unknown causes. The RPL can be classified in (i) primary: no successful pregnancy or (ii) secondary: a successful pregnancy at term with a live newborn and miscarriages (Pandey et al. 2005; Toth et al. 2010). Among all the risk factors involved in RPL, the immunological factors are of great importance since the fetus is considered a graft to the maternal immune system. Taking this in consideration the goal of this study is to evaluate genetic polymorphisms in genes of immunological importance in RPL such as the apoptotic pathway genes.

## **Materials and methods**

### **Subjects**

This case-control study enrolled 294 women from the Prenatal Diagnosis Clinic of the Medical Genetics Service of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), located in the Southernmost state of Brazil. The case group included 138 women with unexplained RPL that reported at least two pregnancy losses before 24 weeks of pregnancy with the same partner. A structured interview was performed to obtain information about demographic characteristics, gynecological/obstetrical history, current or past use of tobacco (yes or no), alcohol consumption (yes or no), consumption of other drugs or medications, family history of malformations, age at recruitment, weight, height, and occupation. All patients included in this study underwent a standardized clinical and laboratory evaluation, including hysteroscopy, laparoscopy, ultrasound, and determination of hormonal levels (gonadotropins, FSH, LH, prolactin, thyroid hormones and thyroperoxidase). A karyotypic examination of peripheral lymphocytes was conducted in all couples to detect chromosomal abnormalities. Immunological risk factors were also investigated through the assessment of anticardiolipin, lupus anticoagulant antinuclear antibodies and medical history of autoimmune diseases. These evaluation criteria were used to confirm whether the cases of pregnancy loss were idiopathic or not. The presence of any maternal clinical condition that could be harmful to a pregnancy as well as consanguinity history was an exclusion criterion for this study. Ethnicity was defined according to the classification system of the national *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE* – (Osorio 2003), as White, Brown, Black or other. All participants were self-categorized when the data was collected.

The control group enrolled 156 women with 2 or more successful pregnancies and no history of pregnancy loss or infertility. These women were randomly selected to participate in the study during blood collection for routine laboratory analyses at the HCPA and verbally answered a standardized questionnaire with questions about demographic data, consanguinity, family history, and number of pregnancies.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Studies Group of the *Hospital de Clínicas* in Porto Alegre (HCPA-CEP-CPPG), under the protocol number #11-242. All patients participating in this study gave their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

### **Genomic DNA**

Biological samples were obtained from whole blood or saliva. Genomic DNA was extracted from leucocytes according to Lahiri and Nurnberger (1991), and maintained at -20°C. The DNA from saliva samples were isolated using the Oragene® DNA collection kit (DNA Genotek Inc., Canada), in accordance with the manufacturer's protocol.

### **Polymorphism Genotyping**

All polymorphic variants were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) followed by the restriction fragment length polymorphism method (RFLP). *FAS-L* Inv2nt\_A124G (rs5030772), *FAS* -670 A/G (rs1800682) and *FAS* -1377 G/A (rs2234767) polymorphisms were genotyped using specific primers as previously described by Zhang et al. (2006). The allelic variants of *FAS-L* -844 T/C (rs763110), *BAX* -248 G/A (rs4645878) and *BCL-2* -938 C/A (rs2279115) genes were analyzed according to (Sun et al. 2004), (Moshynska et al. 2003) and (Zhang et al. 2011), respectively. Briefly, the PCR products were digested with *FokI*, *BstUI*, *BsrDI*, *ScrFI*, *AcII* and *BccI* restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, MA) to distinguish the supra mentioned polymorphisms, respectively. All PCR products were visualized on 8% polyacrylamide gel stained with bromide ethidium after electrophoresis. We included, as internal controls, samples with known genotypes. Further, 10% of the samples were randomly selected for genotype confirmation showing 100% of agreement.

### **Statistical Analysis**

The allelic and genotypic frequencies (obtained by direct count) were analyzed by Fisher's exact or Chi-square tests, with the level of significance set at  $p < 0.05$ . Chi-square

and Mann-Whitney U-test were used to analyze categorical and continuous variables, respectively. The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated for the RPL and control groups, and for the total sample, considering all variants evaluated. Testing for linkage disequilibrium was determined by the Expectation-Maximization method using the Haploview 4.2 software. Binary logistic regression (adjusted for known risk factors as well as alcohol consumption, smoking habit, ethnicity and number of gestations) were conducted to provide odds ratio (OR), 95% confidence intervals (CI) and *p*-values for the risk of polymorphisms with clinical condition. All statistical analyses were performed with the software SPSS 20.0 (SPSS for the Social Science for Windows).

## Results

Demographic and clinical characteristics of the subjects enrolled in this study are presented in Table 1. The mean of age at first gestation were similar in both groups ( $p=0.763$ ). About 78% of the RPL (recurrent pregnancy loss) group was classified as primary. In addition, 34%, 36% and 30% of the women in RPL group reported two, three and at least four miscarriages, respectively. The risk factors for miscarriages evaluated only alcohol consumption and the number of pregnancies differed between the studied groups. Higher median of number of pregnancies were observed in woman with RPL when compared to control group (3 vs. 2 pregnancies,  $p<0.001$ ), lower proportion of European ancestry ( $p=0.005$ ) and higher alcohol consumption ( $p<0.001$ ) were also observed in RPL groups when compared to the control group. Smoking habit did not vary between groups, even being more prevalent in the control group (15.2% vs 21.8%,  $p=0.149$ ).

The genotypic and allelic frequencies of *FAS*, *BAX* and *BCL-2* gene polymorphisms in control and RPL groups are shown in Table 2. The genotypic distribution of all SNPs fit the Hardy-Weinberg equilibrium expectations except by the *FAS-L* Ivs2nt A124G polymorphism. Further analysis suggested that the two *FAS* polymorphisms here studied were in linkage disequilibrium ( $D'=1.0$  and  $r^2=0.14$ ,  $p<0.001$  for -1377G/A and -670A/G). We sought to investigate the genotypic frequencies of the aforementioned polymorphisms in both control and recurrent pregnancy loss women accordingly to characteristics of primary or secondary RPL (Table 3). The genotypic distribution of *BAX* -248G/A did not differ between control and RPL groups. However, stratifying the RPL group into primary and secondary losses, higher frequencies of the *BAX* genotype GG were observed in RPL primary group when compared to control group. However, the *p*-value just approached significance after Bonferroni correction (primary RPL 85.7% vs. 79.4% control group

Table 3.  $p=0.015$ ;  $p_{\text{bonf}}=0.01$ ). Binary logistic regression analysis indicate no significant associations between interactions of the genes in the same pathway to the risk of RPL, even when controlled for the number of pregnancies, alcohol consumption, smoking habit and European ancestry (data not shown).

## Discussion

In the present study, we evaluated five single nucleotide polymorphisms in genes related to apoptotic process and the risk of developing recurrent pregnancy loss in a case-control study. To our knowledge, this is the first study that extensively investigated the role of *FAS*, *FAS-L*, *BAX* and *BCL-2* gene polymorphisms in women with RPL. In total, three polymorphic variants from extrinsic pathway and another two from intrinsic pathway of programmed cell death were investigated.

Our results did not indicate that these polymorphisms are possible risk factors for RPL for the Brazilian population. However, several studies have reported that the variant -670A/G of the *FAS* gene is associated with pregnancy disorders, such as preterm, premature rupture of fetal membranes (Kalish et al. 2005), preeclampsia (Ciarmela et al. 2010) and fetal growth restriction (Robinson et al. 2009). Furthermore, the variants of the *FAS* gene here investigated are described to contribute to the risk of non-related pregnancy conditions, such as cancer, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus (Wu et al. 2003; Sun et al. 2004; Zhang et al. 2006; Sezgin et al. 2013).

There are a scarce field of studies evaluating, the *FAS* gene polymorphisms on the risk of developing RPL (Nair et al. 2012; Banzato et al. 2013). At this point, Nair et al. (2012) evaluated the polymorphisms -1377G/A and -670A/G in women with RPL and Banzato et al. (2013) evaluated *FAS*-670 A/G and *FAS-L* -844T/C polymorphisms as well as the mRNA expression levels in PRL patients. Our data corroborated the Banzato et al. study suggesting that the -670 variant of *FAS* gene is not associated with RPL. On the other hand, Nair et al. have demonstrated that the polymorphic variant *FAS* -1377 was associated with the risk of RPL in an Indian population (Nair et al. 2012), while our data suggested no influence of this polymorphism in the risk of RPL in the Brazilian population evaluated. It is possible observe this through the very similar allelic and genotypic frequencies between the control and RPL groups. Interestingly, the variant -844T/C of *FAS-L* gene was associated with the risk of RPL in the Brazilian population (Banzato et al. 2013).

The most studied proteins of the Bcl-2 family are BCL-2 and BAX proteins. In this

study we evaluated the frequencies of *BCL-2* -938C/A and *BAX* -248G/A polymorphisms in the risk of RPL. It's well known that the balance between *BCL-2*/*BAX* during the first and third trimesters of pregnancy has a crucial role in the maintenance of a normal pregnancy. The levels of *BCL-2* in the placenta are generally lower throughout the gestational period, whereas *BAX* gradually increases by the end of pregnancy (De Falco et al. 2001). There are few data evaluating genetic variants of *BCL-2* and *BAX* in the context of human reproduction. We have found no association of *BCL-2* gene polymorphisms and RPL. Some studies have reported the association of the genetic variant -938 of the *BCL-2* gene with the clinical course of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) and solid tumors (Nücker et al. 2007; Bachmann et al. 2007; Heubner et al. 2009; Lehnerdt et al. 2009; Hirata et al. 2009). However, these results are controversial and no agreement has been reached. We could suggest that this variant is under genetic control in a tissue specific manner (Zhang et al. 2011). Similarly, studies evaluating the *BAX* gene polymorphism in the risk of RPL are scarce in the literature. Until now, to our knowledge there are no investigations reporting the *BAX* polymorphism and RPL. We found higher frequencies of the GG wild genotype in women with primary recurrent loss. The women presenting this genotype probably have no alterations in the protein levels of *BAX*. However, the *BAX* AA genotype is related to a low gene expression (Wang et al. 2014), increased survival of neutrophils in osteomyelitis (Ocaña et al. 2007) and lower survival of treated patients with CLL (Starczynski et al. 2005). Also, it is reported that the *BAX* gene promoter is a transcriptional target of the p53 protein after its activation, and *BAX* promoter presented four binding sites to p53 (Selvakumaran et al. 1994; Miyashita and Reed 1995). Thus, it is possible that the real role of the polymorphic variant *BAX* -248 G/A is dependent on the cellular response to p53 activation since interactions between the genetic variants of *TP53* gene are associated with the risk of RPL (Fraga et al. 2014).

Among the well-established risk factors for RPL, alcohol consumption has adverse effects on fetal development and there is no safe amount of its intake during pregnancy (ACOG 2011). Not so less important, although we did not find any difference in our studied population, the habit of smoking is an important risk factor for abortions in a dose dependent manner (Domínguez-Rojas et al. 1994; Kumar 2011). Furthermore, it has been reported that smoking during the first trimester of pregnancy increases the expression of genes related to angiogenesis and apoptosis (*TP53*, *BAX* and *BCL-2*) in the *villi* of female smokers (Kawashima et al. 2014). Our study found significant differences between the RPL and control group in terms of ethnic origin, of which the proportion of non-

European descents was lower in women with RPL compared to the control group. However, there are no data in the literature to support that the ethnic origin is an independent risk factor for RPL development.

Despite the well-conducted and characterized study, we point out some limitations: (i) the sample size is a bit small and (ii) the criteria for clinical diagnosis of recurrent pregnancy loss leads into account two or more consecutives abortions. Some international guidelines consider RPL as the occurrence of three or more consecutives miscarriages. These limitations could influence a definitive conclusion on the functionality of these polymorphic variants in the risk of developing RPL. In conclusion, our study does not support the hypothesis that the polymorphic variants of the gene *FAS*, *FAS-L*, *BCL-2* and *BAX* here studied could influence the risk of developing RPL in the Brazilian population. However, further studies should be conducted in a larger sample size in attempt to detect these effects.

### **Acknowledgements**

This work was supported by *Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). The authors thank all the women who participated as volunteers in this study.

### **Declaration of interest**

The authors report no declaration of interest.



**Table 1. Demographic and clinical characteristics of RPL women and control group.**

	<b>RPL</b>	<b>Control</b>	<b>p-value</b>
<b>Age at first pregnancy [mean (<math>\pm</math>SD)]</b>	23.7 ( $\pm$ 6.7)	22.4 ( $\pm$ 3.8)	0.763 <sup>a</sup>
<b>Age at recruitment [mean (<math>\pm</math>SD)]</b>	33 ( $\pm$ 7.1)	42.5 ( $\pm$ 10.7)	<b>&lt;0.001</b> <sup>a</sup>
<b>Number of pregnancies [median (25-75%)]</b>	3.0 (3.0-4.0)	2.0 (2.0-3.0)	<b>&lt;0.001</b> <sup>a</sup>
<b>Body Mass Index [median (25-75%)]</b>	26.0 (23.0-29.0)	24.0 (21.0-28.0)	0.083 <sup>a</sup>
<b>European descent [n(%)]</b>	86 (62.8)	121 (78.6)	<b>0.005</b> <sup>b</sup>
<b>Alcohol consumption [n(%)]</b>	58 (42.0)	32 (20.5)	<b>&lt;0.001</b> <sup>b</sup>
<b>Smoking [n(%)]</b>	21 (15.2)	34 (21.8)	0.149 <sup>b</sup>
<b>Primary RPL [n(%)]</b>	107 (77.5%)	—	
<b>Miscarriages [mean (<math>\pm</math>SD)]</b>	3.7 ( $\pm$ 1.7)	—	
<b>2 miscarriages [n(%)]</b>	47 (34.1)		
<b>3 miscarriages [n(%)]</b>	50 (36.2)		
<b>&gt;4 miscarriages [n(%)]</b>	41 (29.7)		

<sup>a</sup>Mann-Whitney U-test, <sup>b</sup> Chi-square test.

**Table 2. Genotype and allele frequencies of apoptotic genes in RPL women and control group.**

	RPL n(%)	Control n(%)	OR (95% I.C)	p-value <sup>a</sup>
<b><u>FAS-L IVS2nt-124 A/G</u></b>	n= 138	n= 133		
AA	116 (84.1)	105 (78.9)		
AG	17 (12.3)	24 (18.0)		
GG	5 (3.6)	4 (3.0)		
A	249 (90.0)	234 (88.0)		
G	27 (10.0)	32 (12.0)		
pHWE	<b>&lt;0.001</b>	0.089		
<b><u>FAS-L -844 T/C</u></b>	n= 137	n=156		
TT	42 (30.7)	35 (22.4)	1	
TC	60 (43.8)	77 (49.4)	0.64 (0.37-1.13)	0.279
CC	35 (25.5)	44 (28.2)	0.66 (0.35-1.24)	
T	144 (53.0)	147 (47.0)	1	0.189
C	130 (47.0)	165 (53.0)	0.80 (0.58-1.11)	
pHWE	0.154	0.905		
<b><u>FAS -670 A/G</u></b>	n= 138	n= 156		
AA	31 (22.5)	44 (28.2)	1	
AG	66 (47.8)	78 (50.0)	1.20 (0.68-2.11)	0.245
GG	41 (29.7)	34 (21.8)	1.71 (0.89-3.26)	
A	128 (46.0)	166 (53.0)	1	0.099
G	148 (53.0)	146 (47.0)	1.31 (0.95-1.81)	
pHWE	0.651	0.958		
<b><u>FAS -1377 G/A</u></b>	n= 138	n= 156		
GG	110 (79.7)	126 (80.8)	1	
GA	27 (19.6)	30 (19.2)	1.03 (0.57-1.84)	0.819
AA	1 (0.7)	—	—	
G	247 (89.0)	282 (90.0)	1	0.720
A	29 (11.0)	30 (10.0)	1.10 (0.64-1.89)	
pHWE	0.635	0.183		
<b><u>BAX -248 G/A</u></b>	n=136	n= 155		
GG	113 (83.1)	123 (79.4)	1	
GA	20 (14.7)	32 (20.6)	0.68 (0.37-1.26)	0.069
AA	3 (2.2)	—	—	
G	246 (90.0)	166 (53.0)	1	0.759
A	26 (10.0)	146 (47.0)	0.91 (0.53-1.58)	
pHWE	0.651	0.958		
<b><u>BCL-2 -932 C/A</u></b>	n= 137	n=155		
AA	31 (22.6)	49 (31.6)	1	
CA	62 (45.3)	67 (43.2)	1.78 (0.95-3.32)	0.178
CC	44 (32.1)	39 (25.2)	1.46 (0.83-2.60)	
A	124 (45.0)	165 (53.0)	1	0.055
C	150 (55.0)	145 (47.0)	1.37 (0.99-1.90)	
pHWE	0.310	0.100		

pHWE: probability of adherence to the Hardy–Weinberg equilibrium expectations.

<sup>a</sup> Chi-square or Fisher's test.

**Table 3. Genotype frequencies in both control and recurrent pregnancy loss women accordingly characteristics of primary or secondary RPL.**

	Control <sup>a</sup> n(%)	Recurrent pregnancy loss n (%)		<i>p</i> -value <sup>a,b</sup>	<i>p</i> -value <sup>a,c</sup>
		Primary <sup>b</sup>	Secondary <sup>c</sup>		
<b><u>FAS-L -844 T/C</u></b>	n=156	n= 106	n= 31		
TT	35 (22.4)	33 (31.1)	9 (29.0)	0.257	0.368
TC	77 (49.4)	49 (46.2)	11 (35.5)		
CC	44 (28.2)	24 (22.7)	11 (35.5)		
<b><u>FAS -670 A/G</u></b>	n= 156	n=107	n= 31		
AA	44 (28.2)	22 (20.6)	9 (29.0)	0.208	0.625
AG	78 (50.0)	53 (49.5)	13 (42.0)		
GG	34 (21.8)	32 (29.9)	9 (29.0)		
<b><u>FAS -1377 G/A</u></b>	n= 156	n= 107	n= 31		
GG	126 (80.8)	85 (79.4)	25 (80.6)	0.662	0.987
GA	30 (19.2)	21 (19.6)	6 (19.4)		
AA	—	1 (1.0)	—		
<b><u>BAX -248 G/A</u></b>	n= 155	n= 105	n= 31		
GG	123 (79.4)	90 (85.7)	23 (74.2)	<b>0.015</b>	0.523
GA	32 (20.6)	12 (11.4)	8 (25.8)		
AA	—	3 (2.9)	—		
<b><u>BCL-2 -932 C/A</u></b>	n=155	n=106	n= 31		
AA	49 (31.6)	27 (25.5)	4 (13.0)	0.387	0.109
CA	67 (43.2)	45 (42.5)	17 (54.8)		
CC	39 (25.2)	34 (32.1)	10 (32.2)		

All *p*-values were obtained by  $\chi^2$  test or Fisher's test. Corrected *p* value for multiple comparisons  $\alpha=0.05/5= 0.01$

<sup>a,b</sup> Control vs primary RPL. <sup>a,c</sup> Control vs secondary RPL.

## References

- ACOG (2011) Committee opinion no. 496: At-risk drinking and alcohol dependence: obstetric and gynecologic implications. *Obstet Gynecol* 118:383–8.
- Bachmann HS, Otterbach F, Callies R, Nüchel H, Bau M, Schmid KW, Siffert W and Kimmig R (2007) The AA genotype of the regulatory BCL2 promoter polymorphism ( 938C>A) is associated with a favorable outcome in lymph node negative invasive breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:5790–7.
- Banzato PCA, Daher S, Traina E, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Puccini RF, Pendeloski KPT and Mattar R (2013) FAS and FAS-L Genotype and Expression in Patients With Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod Sci* 2013 Sep;20(9):1111-5.
- Branch DW, Gibson M and Silver RM (2010) Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 363:1740–7.
- Ciarmela P, Boschi S, Bloise E, Marozio L, Benedetto C, Castellucci M and Petraglia F (2010) Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes in preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 148:144–146.
- De Falco M, De Luca L, Acanfora F, Cavallotti I, Cottone G, Laforgia V, De Luca B, Baldi a. and De Luca a. (2001) Alteration of the Bcl-2: Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Histochem J* 33:421–425.
- Domínguez-Rojas V, de Juanes-Pardo JR, Astasio-Arbiza P, Ortega-Molina P and Gordillo-Florencio E (1994) Spontaneous abortion in a hospital population: are tobacco and coffee intake risk factors? *Eur J Epidemiol* 10:665–8.
- Ford HB and Schust DJ (2009) Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2:76–83.
- Fraga LR, Dutra CG, Boquett J a., Vianna FSL, Gonçalves RO, Paskulin DD, Costa OL, Ashton-Prolla P, Sanseverino MT V and Schuler-Faccini L (2014) P53 Signaling Pathway Polymorphisms Associated To Recurrent Pregnancy Loss. *Mol Biol Rep* 41:1871–1877.
- Heubner M, Wimberger P, Otterbach F, Kasimir-Bauer S, Siffert W, Kimmig R and Nüchel H (2009) Association of the AA genotype of the BCL2 (-938C>A) promoter polymorphism with better survival in ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 24:223–9.

- Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kikuno N, Suehiro Y, Tabatabai ZL, Ishii N and Dahiya R (2009) The bcl2 -938CC genotype has poor prognosis and lower survival in renal cancer. *J Urol* 182:721–7.
- Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB and Exalto N (2006) Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 21:2216–22.
- Kalish RB, Nguyen DP, Vardhana S, Gupta M, Perni SC and Witkin SS (2005) A single nucleotide A>G polymorphism at position -670 in the Fas gene promoter: Relationship to preterm premature rupture of fetal membranes in multifetal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 192:208–212.
- Kawashima A, Koide K, Ventura W, Hori K, Takenaka S, Maruyama D, Matsuoka R, Ichizuka K and Sekizawa A (2014) Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester. *PLoS One* 9:e106140.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–57.
- Kiwi R (2006) Recurrent pregnancy loss: Evaluation and discussion of the causes and their management. *Cleve Clin J Med* 73:913–921.
- Kumar S (2011) Occupational, environmental and lifestyle factors associated with spontaneous abortion. *Reprod Sci* 18:915–30.
- Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nüchel H, Lang S, Schmid KW, Siffert W and Bachmann HS (2009) The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 20:1094–9.
- Miyashita T and Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–9.
- Moshynska O, Sankaran K and Saxena a (2003) Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Mol Pathol* 56:205–209.
- Nagata S and Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267:1449–56.

- Nair RR, Khanna A and Singh K (2012) Association of FAS -1377 G>A and FAS -670 A>G functional polymorphisms of FAS gene of cell death pathway with recurrent early pregnancy loss risk. *J Reprod Immunol* 93:114–118.
- Nüchel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Dürig J, Jöckel KH, Dührsen U and Siffert W (2007) Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:290–297.
- Ocaña MG, Valle-Garay E, Montes a H, Meana A, Cartón JA, Fierer J, Celada A and Asensi V (2007) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis. *Genet Med* 9:249–255.
- Osorio RG (2003). O sistema classificatório de "cor ou raça" do IBGE. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2003; 50 p
- Pandey MK, Rani R and Agrawal S (2005) An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 272:95–108.
- Rai R and Regan L (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601–611.
- Robinson R, Hsu CD, Chesebro AL, Nguyen J, Ali N, Maramreddy H and Parton L a. (2009) A single-nucleotide polymorphism (-670) of the maternal Fas gene is associated with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 201:620.e1–620.e4.
- Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B and Liebermann D (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 9:1791–8.
- Sezgin M, Barlas İÖ, Yıldır S, Türköz G, Ankaralı HÇ, Şahin G and Erdal ME (2013) Apoptosis-related Fas and FasL gene polymorphisms' associations with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int* 33:2039–43.
- Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, Bentley P and Fegan C (2005) Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 23:1514–21.

- Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P and Lin D (2004) Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96:1030–6.
- Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ and Makrigiannakis A (2010) Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 85:25–32.
- Tsujimoto Y (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3:697–707.
- Wang X, Lin Y, Lan F, Yu Y, Ouyang X, Liu W, Xie F, Wang X and Huang Q (2014) BAX and CDKN1A polymorphisms correlated with clinical outcomes of gastric cancer patients treated with postoperative chemotherapy. *Med Oncol* 31:249.
- Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, Cooke J, Xie F, Cooper GS and Kimberly RP (2003) A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 170:132–8.
- Zhang N, Li X, Tao K, Jiang L, Ma T, Yan S, Yuan C, Moran MS, Liang F, Haffty BG et al. (2011) BCL-2 (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC Med Genet* 12:48.
- Zhang Z, Wang L-E, Sturgis EM, El-Naggar AK, Hong WK, Amos CI, Spitz MR and Wei Q (2006) Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 12:5596–602.

## **CAPÍTULO 4**

*The HLA-G 3'UTR locus analysis in women with recurrent pregnancy losses a case-control study.*



*HLA-G* 3'UTR gene analysis in women with recurrent pregnancy losses: a case-control study.

Rafael Tomoya Michita<sup>a</sup>, Francis Maria Bao Zambra<sup>a</sup>, Lucas Rosa Fraga<sup>a</sup>, Maria Teresa Sanseverino<sup>b,c</sup>, Priscila Vianna<sup>a</sup> and José Artur Bogo Chies<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Immunogenetics Lab, Department of Genetics, Biosciences Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>National Institute of Science and Technology in Populational Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Manuscrito em preparação a ser submetido em revista de circulação internacional.

\*Corresponding author: José Artur Bogo Chies, Immunogenetics laboratory, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves Avenue 9500, Campus do Vale, CEP 91501970, Porto Alegre, RS 15053, Brazil, Tel: +55 51 3316-6740; Fax: +55 51 3316-7311; Email: jabchies@terra.com.br

## Abstract

Recurrent pregnancy loss (RPL) is a complex obstetric disorder defined as two or more consecutive pregnancy losses. This pathological condition affects about 5% of couples trying to conceive and after evaluation of established etiologic causes approximately half of all cases will remain unexplained. HLA-G is a multitask molecule essential to the acceptance of the fetus and to the development of a healthy pregnancy. To investigate the role of *HLA-G* polymorphisms (SNP) and whether a specific *HLA-G* phased genotype (haplotype) is associated with an increased risk to RPL 132 women reporting at least two pregnancy losses and 152 healthy multiparous women were sequenced for the 3'UTR region of *HLA-G*. The following eight SNPs were evaluated: the 14-bp polymorphism, +3003T/C, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3142G/C, +3187A/G and +3196C/G. To the best of our knowledge, this is the first study to assess the *HLA-G* 3'UTR gene region and the RPL risk. We observed a strong linkage disequilibrium (LD) among all polymorphic variants studied and a near perfect LD between +3010C/G and +3142G/A ( $D'=1.000$ ,  $r^2=0.986$ ,  $p<0.001$ ). Haplotype frequencies did not differ between groups. Corroborating our findings haplotype frequencies observed in the control group agreed with a healthy Brazilian population and a recent study with 21 worldwide populations sample being the UTR-1 (29.0%) haplotype the most frequent followed by UTR-2/3/4/5/6/7. On the other hand, we observed a different pattern in the haplotype frequencies in the RPL group being the UTR-2 (29.6%) haplotype the most frequent followed by UTR-1/3/4/5/6/7. No differences were observed between groups when all SNPs were independently analyzed. Our data suggested that there was no association between *HLA-G* 3' UTR haplotypes and the risk of RPL in this population. Larger sample sizes as well as different populations are strongly recommended to confirm these findings.

**Keywords:** recurrent miscarriage, pregnancy loss, HLA-G, 3'UTR, polymorphism.

## Introduction

Recurrent pregnancy loss (RPL) is a distinct pathological condition that affects about 5% of pregnancies and it is defined by the presence of two or more consecutive miscarriages (Rai and Regan 2006). RPL is classified into different clinical subgroups according to woman reproductive history. Primary RPL is characterized by consecutive losses and no prior successfully pregnancy, while secondary RPL is when there is at least one successful pregnancy, regardless of the number of miscarriages (Toth et al. 2010).

After identification of possible etiologic factors, a specific cause of RPL is clearly identified in only about 50% of all cases (ACOG 2002; Toth et al. 2010). Maternal acceptance of the fetus is a unique example of how maternal immune system shapes and tolerates the presence of semi-allogeneic invasive cells in utero. Interesting, this tolerance is characterized by an unusual combination of HLA expression on extravillous trophoblasts cells (EVT) and the pattern of maternal leucocyte distribution in the decidua. EVT cells do not express class II MHC molecules, but do express non-classical class I MHC antigens HLA-E, F, G, and a low-level expression of classical class I HLA-C (Ishitani et al. 2003).

*HLA-G* is a low polymorphic molecule compared to its classical counterparts and has a restricted tissue expression pattern, moreover, it has a unique pattern of alternative splicing, resulting in seven different isoforms, three of which are soluble (G5-G7) and 4 are anchored on the membrane (G1-G4) (Ishitani and Geraghty 1992). In addition, HLA-G1 can also generates a soluble G1 (sHLA-G1) molecule by cell surface proteolytic shedding (Rizzo et al. 2013). HLA-G is a specific ligand for different receptors expressed on immune and non-immune cells, such as decidual natural killer cells (dNK), T and B lymphocytes, antigen presenting cells (APC) and endothelial cells (Hunt et al. 2007). These specific interactions contribute to: (a) the immune suppression of the cytotoxic activity of dNK, inhibition of proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T and B lymphocytes and induce apoptosis of CD8<sup>+</sup> T cells via FAS-FAS-L pathway and (b) the placental stimulation and development through secretion of angiogenic factors by the dNK cells and macrophages (Fournel et al. 2000; Le Bouteiller 2013).

Several studies have observed differences in expression patterns associated with pregnancy diseases such as preeclampsia, infertility and recurrent miscarriage (Sipak-Szmigiel et al. 2008; Larsen et al. 2010; Dahl et al. 2014). In the 3' UTR region of *HLA-G*, three polymorphic sites have been reported to modify HLA-G expression: the 14-bp

insertion/deletion that is associated to RNA stability (Rousseau et al. 2003), the +3142C/G that has been described as influencing miRNA binding thus decreasing or increasing mRNA availability (Tan et al. 2007) and the +3187G/A that has been described to affect mRNA stability possibly due to an proximity to AU-rich motif (Yie et al. 2008). Other four variants, +3003T/C, +3010C/G, +3027C/A and +3035C/T, although no specific expression regulation mechanism has been described for them, possibly influence miRNA binding (Castelli et al. 2009).

To date, many hypotheses have been proposed regarding HLA-G function to explain the possible causes that lead to RPL, but little progress has been made. As most studies address only one or a few elements involved in the transcriptional and post-transcriptional regulation of the gene, our study proposes the evaluation of the eight polymorphic variants in the *HLA-G* 3' UTR gene in women with RPL.

## **Materials and methods**

### **Subjects**

The study enrolled a total of 284 women (152 healthy and 132 RPL patients). The subjects were recruited from the Prenatal Diagnosis Clinic of the Medical Genetics Service of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA), located in Southern Brazil, between 2000 and 2011. All women reporting at least two pregnancy losses before 24 weeks of gestation with the same partner were invited to participate in the study (ACOG 2002; ASRM et al. 2012; Fraga et al. 2014).

A structured interview was performed to obtain information about demographics, gynecological/obstetrical history, and medical history, current or past use of tobacco (yes or no), alcohol consumption (yes or no), consumption of other drugs or medications, family history of malformations, age at recruitment, weight, height, and occupation. Patients before being included in the study underwent a standardized clinical and laboratory evaluation, which included hysteroscopy, laparoscopy, ultrasound, and comprehensive determination of hormonal status (i.e. gonadotropins, FSH, LH, prolactin, thyroid hormones, and thyroperoxidase), in order to detect known causes of pregnancy losses. A karyotypic examination of peripheral lymphocytes was conducted in all couples to detect chromosomal abnormalities. Immunological risk factors were also investigated through assessment of anticardiolipin, lupus anticoagulant, antinuclear antibodies and

medical history of autoimmune diseases. These evaluation criteria were selected to confirm whether these RPL cases are idiopathic or not. The presence of any maternal clinical condition that could prevent full-term pregnancies was considered to be an exclusion criterion for this study. Ethnicity was defined according to the classification system of the national Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE – (Osorio 2003), as White, Brown, Black or other. All participants were self-categorized when the data was collected.

The control group was compounded by 152 healthy multiparous women, with at least 2 successful pregnancies and no history of pregnancy loss and infertility. These women were randomly selected to participate in the present study during blood collection for routine laboratory analyses at the HCPA and verbally answered a standardized questionnaire with questions about demographics, consanguinity, family history, and the number of pregnancies. All individuals (healthy or patient) with consanguinity history were excluded from the sample.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Studies Group of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA-CEP-CPPG), under the protocol number #11-242. Written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki was obtained from every participant in each group before their inclusion in the study.

### ***HLA-G 3' UTR analysis***

Genomic DNA was obtained from the blood samples and saliva. The DNA extracted from blood was according to Lahiri and Nurnberger (1991) protocol and the DNA from saliva samples was obtained using the Oragene® DNA collection kit (DNA Genotek Inc., Canada), in accordance with the manufacturer's protocol.

The 3' UTR region of *HLA-G* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) according to Zambra et al. (personal communication), using primers previously described HLA-G8F: 5'-TGT GAA ACA GCT GCC CTG TGT-3' (Bermingham et al. 2000; Castelli et al. 2010) e GmiRNA-R: 5'-CTG GTG GGA CAA GGT TCT ACT G- 3' (Cordero et al. 2009). Amplifications were performed in a final volume of 25 µl containing 0.2 mM each of dNTP; 2.0 mM of MgCl<sub>2</sub>; 10 pmol/µl of each primer; 1 unit of Taq Platinum DNA polymerase in 1X PCR-specific buffer (Invitrogen Corporation, CA, USA) and 15 to 30 ng of genomic DNA. The initial denaturation step were conducted at

94°C for 5 minutes; followed by 32 cycles at 94°C for 30 seconds; 65.5°C for 30 seconds; 72°C for 1 minute and by a final extension step at 72°C for 5 minutes. As a result, a 537 base pair (bp) product was amplified when the 14-bp insertion allele (ins) was present (or 523 bp when this allele was absent) and checked in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Next, the PCR products were directly sequenced using the reverse primer (GmiRNA-R) 5'-CTG GTG GGA CAA GGT TCT ACT G- 3' in the ABI 3730 XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by a Sanger method. Finally, the genotyping of 14-bp Ins/Del (rs66554220), +3003 T/C (rs1707), +3010 C/G (rs1710), +3027 C/A (rs17179101), +3035 C/T (rs17179108), +3142 G/C (rs1063320), +3187 A/G (rs9380142) and +3196 C/G (rs1610696) *HLA-G* polymorphic variants was performed by interpretation of chromatogram peaks by the FinchTV software version 1.4.0 (available on <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). In the total, 125 RPL samples were efficiently genotyped another seven samples were excluded from genetic analysis due to a low quality amplification.

### **Haplotype analysis**

Inference of the most likely haplotypes constitution of each sample in the study was performed using a Bayesian method (Monte Carlo Markov chain simulations) implemented in the PHASE software version 2.1 (Stephens et al. 2001; Stephens and Donnelly 2003). For the determination of linkage disequilibrium (LD) between pairs of genetic variants of the study we used the  $r^2$  and  $D'$  coefficient through the Haploview 4.1 software (Barrett et al. 2005). Using default parameters in the PHASE software we conducted ten independent runs with different seed values for the random number generator and checked the consistency of the results (as described in Castelli et al. 2011). Independent seed values provided the same results by the PHASE method. The haplotype overall frequencies generated from the PHASE and the Haploview methodologies showed highly consistent results to both methodologies.

### **Statistical Analysis**

All categorical and continuous variables were analyzed by Chi-square and Mann-Whitney U-test, respectively. The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated for the RPL and control groups, for each polymorphism evaluated in the study. For all instances,  $p$ -

values  $<0.05$  were considered to be significant. The analyses were conducted in overall RPL women and its subgroups (primary and secondary RPL) in comparison to the control group. The strength of association, if present, was estimated by calculating the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI). All statistical analyses were performed with standard software SPSS v.20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## **Results**

### **Clinical and Demographic parameters**

In the current study we assessed clinical and demographic characteristics of 132 RPL and 152 healthy multiparous women (Table 1). We observed that mean age at the first pregnancy were similar between RPL women (23.8 years) and the control group (23.2 years,  $p=0.763$ ); however, the mean age at recruitment in the present study was higher in the control group (42.4 years,  $p<0.001$ ). Also, we observed that a higher European ancestry was related to the control group (78.6%) than RPL women (62.6%,  $p=0.029$ ). The obstetric history of the subjects enrolled in the study was evaluated. The median number of pregnancies was higher in RPL women than control group ( $p<0.001$ ), and about 35%, 37% and 27% of RPL women had two, three and four or plus miscarriages, respectively. When we analyzed the subgroups of RPL, we observed 78% of women in primary RPL subgroup and 22% of them in secondary RPL group. Among the risk factors to pregnancy complications including miscarriage that we were able to retrieve, only alcohol consumption was statistically significant being twice as higher in RPL women (44.7%) than control group (20.5%,  $p<0.001$ ).

### ***HLA-G* 3' UTR molecular analysis**

The genotype distribution of each one of the eight genetic variants relevant to the *HLA-G* transcriptional control did fit the Hardy-Weinberg equilibrium expectation (Table 2). Next, the imputed genotype data into the PHASE software generated all individual probably phased genotypes (haplotypes) with the lowest probability value in overall sample being 0.969 and the most probably value (1.00) was reached for most samples. The most probably haplotype inferred to each individual sample was named as previously described in Castelli et al. (2010) and Martelli-Palomino et al. (2013).

### **HLA-G 3' UTR Haplotype Frequencies**

The analysis of linkage disequilibrium (LD) indicated a strong LD among all polymorphic variants studied. A near perfect LD was observed between +3010C/G and +3142G/A ( $D'=1.000$ ,  $r^2=0.986$ ,  $p<0.001$ , Table 3). The most probably haplotypes inferred are listed in Table 4. No statistical difference between haplotype frequencies in RPL women and healthy multiparous control women was observed. However, UTR-2 (29.6%) haplotype was the most frequent in RPL women and UTR-1 (29.0%) haplotype was the most frequent in the control group ( $p=0.058$ ). In respect to the others haplotypes, we did not observe any tendency, being the frequencies of UTR-3, UTR-4, UTR-5, UTR-6 and UTR-7 similar in both groups. Interestingly, when we stratified the RPL group into primary and secondary RPL, we observed that UTR-2 frequency was higher in secondary RPL (41.0%) than the control group (26.0%), but after correction to multiple comparisons, the  $p$ -value did not remain significant ( $p=0.022$ ,  $\alpha_{\text{bonferroni}}=0.007$ , Table 5).

Considering that low HLA-G expression levels are related to the 14-bp Ins, +3142G and +3187A alleles in previous studies (Hviid et al. 2003; Rousseau et al. 2003; Tan et al. 2007; Yie et al. 2008). Thus, we analyzed the frequencies of carriers and non-carriers of the 14-bp Ins/+3142G/+3187A (InsGA) haplotype risk in RPL women and the control group (Table 6). The frequencies did not differ between groups, but the overall proportion of InsGA carriers was higher in the RPL women (68.0%) than the control group (61.8%). In addition, we also did not observe an association with the number of miscarriages and the presence of InsGA haplotype in overall RPL women and its subgroups (data not shown). Finally, we evaluated the contribution of all genetic variants in an independent-manner to the risk of recurrent pregnancy losses (Table 7). As a result, no differences between groups were observed.

### **Discussion**

As the fetus is not genetically identical to its mother, it is reasonable to think that mechanisms must exist to allow the mother to carry the fetus throughout gestation without a rejection. HLA-G was first identified in the materno-placental interface. Owing to a preferential expression of HLA-G on EVT cells, this molecule has proven to have several and relevant role in reproduction and others distinct functions. Further, HLA-G can also be expressed on endothelial cells of fetal blood vessels in placenta and may act in the



angiogenesis process which is highly active, until term in the *villi* (Blaschitz et al. 1997), being essential to pregnancy maintenance. As previously reported, HLA-G expression pattern is influenced by its regulatory regions, especially the 3' UTR region that contains regulatory elements including AU-rich motifs, polyadenylation signals and polymorphic sites that are implicated with the regulation of HLA-G expression (Castelli et al. 2010). This region has been studied in a wide range of association studies, but in the most of cases, a limited set of putative functional variants are analyzed by studies, whereas only few studies have investigated the full sequence variation in unrelated healthy and non-healthy individuals (Hviid et al. 2002; Graebin et al. 2012; Lucena-Silva et al. 2013).

Taken together, all polymorphic variants assessed in this study, we could by a haplotype inference approach evaluate the contribution of the 3' UTR regulatory region of *HLA-G* to the predisposition to RPL. Our data indicated no association between RPL and the control group in relation to the 7 main haplotypes observed. However, the UTR-1 haplotype was the most frequent followed by UTR-2/3/4/5/6/7 haplotypes in the control group agreeing with a previous studies in health blood donor in a Brazilian population and a 21 worldwide population sample (Castelli et al. 2010; Sabbagh et al. 2014). Interestingly the UTR-1 is the only haplotype lacking the alleles related to a lower sHLA-G expression (Hviid et al. 2003; Rousseau et al. 2003; Tan et al. 2007; Yie et al. 2008). In addition, recent studies reported that UTR-1 haplotype is associated with higher expression levels of sHLA-G (Di Cristofaro et al. 2013; Martelli-Palomino et al. 2013). On the other hand, UTR-2 haplotype was at higher frequencies in RPL and its subgroups, which is one of the haplotypes related to a lower or intermediated sHLA-G expression (Di Cristofaro et al. 2013; Martelli-Palomino et al. 2013). Also, an unexpected higher frequency of UTR-2 in secondary RPL being twice as higher than the control group was observed; however, this RPL subgroup represents a poorly understood group in which a distinction from primary RPL is not usually made.

If these haplotypes are considered lower or intermediated sHLA-G secretors needs to be further clarified. Also, it should be investigated if these findings could be extrapolated to sHLA-G/HLA-G expression on EVT cells. Carriers of haplotypes encompassing the 14-bp Ins/+3142G/+3187A alleles were also evaluated in this study; although no differences were observed between groups. However, carriers of this risk alleles are associated with reduced HLA-G expression and it has been associated with

worst outcome in inflammatory conditions (Graebin et al. 2012; Martelli-Palomino et al. 2013).

Among the polymorphisms of the *HLA-G* 3' UTR region, the most studied SNP is the 14-bp insertion/deletion (5'-ATTTGTTTCATGCCT-3'). It is proposed that a 14 bases insertion in the primary transcript may result by alternative splicing a cut of the first 92 bases in a proportion of the mature *HLA-G* mRNA giving rise to a shorter mRNAs with increased stability. These more stable mRNAs could reflect in an increased surface expression of HLA-G1 in comparison with the transcripts of 14-bp deletion allele. In addition, the 14-bp deletion allele has a higher sHLA-G1/HLA-G1 ratio than the 14-bp insertion allele (Svendsen et al. 2013). Also, low levels of sHLA-G in the maternal blood circulation are associated with the 14-bp insertion homozygous genotype and women having experienced pregnancy disorders (Hviid et al. 2004; Rizzo et al. 2009). No statistically difference between RPL women and the control group was observed, although a remarkably tendency to a higher proportion of 14-bp insertion allele (46.0% *versus* 38.0%, respectively) and 14-bp ins/ins genotype carriers in the RPL group was observed (22.4% *versus* 15.1%). Corroborating our findings, other studies with similar results points out to a higher frequency of 14-bp insertion allele and homozygous genotype in RPL women (Yan et al. 2006; Zhu et al. 2009; Christiansen et al. 2012). Up to now, many studies evaluated the role of this variant in RPL; however, the results are still inconsistent and even the most recent meta-analysis provide controversial conclusions (Wang et al. 2013; Fan et al. 2014). Nonetheless, the overall picture is that differential expression pattern of HLA-G seems to be associated with pregnancy disorders (Cecati et al. 2011).

The +3142G/C SNP is located in a putative binding site for miRNAs which is important for the regulation of *HLA-G* expression (Veit and Chies 2009). It has been demonstrated that a G to C transition affects the binding of miRNAs, as a consequence it can repress or favors mRNA translation (Tan et al. 2007; Castelli et al. 2009). To the best of our knowledge, this is the first study that evaluated this functional variant in RPL women. No influence of this genetic variant in RPL risk was observed in our study, although lower frequencies of +3142C allele (41.0% *vs.* 51.0%) and +3142CC genotype (16.8% *vs.* 26.3%) were observed in RPL women when compared with controls. Interestingly, it has been reported that +3142GG genotype (in fetal samples) is associated with severe preeclampsia in primiparous women (Larsen et al. 2010).

The presence of the +3187A allele is proposed to decrease *HLA-G* expression because of its proximity to an AU-rich element related to mRNA degradation (Castelli et al. 2010). In fact, the presence of an A allele at this position is associated with lower mRNA stability *in vitro* and an increased risk to preeclampsia development (Yie et al. 2008). Our data suggest no association of this variant and the risk of RPL in the currently population. Other four variants +3003T/C, +3010C/G, +3027C/A and +3035C/T possibly influence miRNA binding (Castelli et al. 2009), although no specific regulation mechanism has been described to them. The polymorphic sites assessed in the study are encompassed in a short region in the gene and given a higher LD observed and the gametic phase of all eight SNPs identified here is reasonable to consider that they are possibly acting in sync in the transcriptional and post-transcriptional regulation of *HLA-G* expression.

According to the environmental risk factors evaluated in this study, we observed a higher proportion of alcohol consumption among RPL women. In respect of its consumption, many adverse effects on fetal development has been observed; in addition, there is no safe amount of its intake during pregnancy (ACOG 2011). Ethnic origin was different between the studied groups; however, until now there are no published data implicated in the risk of RPL.

In conclusion our study suggests that *HLA-G* 3' UTR haplotypes are not associated with the risk of RPL in the currently Brazilian population. More studies in order to confirm the role of the haplotypes in RPL as well as functional studies evaluating the EVT expression patterns related to the haplotypes observed in the study are definitely needed to clarify this further.

### **Acknowledgements**

This work was supported by *Fundo de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq). We gratefully acknowledge to PhD. Tiago Degani Veit for their useful suggestions of statistical analysis. The authors thank all the women who participated as volunteers in this study.

### **Conflict interest**

The authors declare no conflict interests.

Table 1. Clinical and demographic characteristics of RPL women and control group

	RPL	Control	<i>p</i> -value
Age at first pregnancy [mean ( $\pm$ SD)]	23.8 ( $\pm$ 6.9)	23.2 ( $\pm$ 4.9)	0.763 <sup>a</sup>
Age at recruitment [mean ( $\pm$ SD)]	32.7 ( $\pm$ 7.9)	42.4 ( $\pm$ 9.7)	<0.001 <sup>a</sup>
Number of pregnancies [median (25-75%)]	4.0 (3.0-4.0)	2.0 (2.0-3.5)	<0.001 <sup>a</sup>
Body Mass Index [median (25-75%)]	26.0 (23.0-29.0)	23.5 (21.0-28.0)	0.102 <sup>a</sup>
European descent [n(%)]	82 (62.6)	121 (78.6)	0.029 <sup>b</sup>
Alcohol consumption [n(%)]	59 (44.7)	32 (20.5)	<0.001 <sup>b</sup>
Smoking [n(%)]	20 (15.2)	34 (21.8)	0.150 <sup>b</sup>
Primary RPL [n(%)]	103 (78.0)	—	
Miscarriages [mean ( $\pm$ SD)]	3.3 ( $\pm$ 1.6)	—	
2 miscarriages [n(%)]	46 (35.1)		
3 miscarriages [n(%)]	49 (37.4)		
>4 miscarriages [n(%)]	36 (27.5)		

<sup>a</sup>Mann-Whitney U-test, <sup>b</sup> Chi-square test.

Table 2. *HLA-G* 3'UTR allelic and genotypic frequencies of 8 polymorphic sites in RPL women and control group.

	Ins/Del 14bp	+3003 T/C	+3010 C/G	+3027 A/C	+3035 C/T	+3142 G/C	+3187 A/G	+3196 C/G	
<u>Cases</u>									
(n=125)									
Genotype	Ins/Ins	22.4	TT 77.6	CC 34.4	AA —	CC 70.4	GG 35.2	AA 61.6	CC 47.2
	Ins/Del	46.4	TC 20.8	CG 47.2	AC 11.2	CT 28.0	GC 48.0	AG 32.8	CG 43.2
	Del/Del	31.2	CC 1.6	GG 18.4	CC 88.8	TT 1.6	CC 16.8	GG 5.6	GG 9.6
Allele	Ins	46.0	T 88.0	C 58.0	A 6.0	C 84.0	G 59.0	A 78.0	C 69.0
	Del	54.0	C 12.0	G 42.0	C 94.0	T 16.0	C 41.0	G 22.0	G 31.0
pHWE <sup>1</sup>	0.469	0.865	0.727	0.507	0.479	0.943	0.620	0.944	
<u>Control</u>									
(n=152)									
Genotype	Ins/Ins	15.1	TT 77.6	CC 25.7	AA —	CC 75.6	GG 25.7	AA 48.7	CC 52.0
	Ins/Del	46.7	TC 21.1	CG 48.6	AC 8.6	CT 23.7	GC 48.0	AG 44.1	CG 43.4
	Del/Del	38.2	CC 1.3	GG 25.7	CC 91.4	TT 0.7	CC 26.3	GG 7.2	GG 4.6
Allele	Ins	38.0	T 88.0	C 50.0	A 4.0	C 87.0	G 49.0	A 71.0	C 74.0
	Del	62.0	C 12.0	G 50.0	C 96.0	T 13.0	C 51.0	G 29.0	G 26.0
pHWE <sup>1</sup>	0.868	0.918	0.745	0.518	0.307	0.629	0.426	0.140	

<sup>1</sup>Probability of adherence to the Hardy–Weinberg equilibrium expectations.

Table 3. Analysis of linkage disequilibrium patterns for all the pairs of polymorphic sites evaluated at the 3' UTR region of the *HLA-G*\*.

	+2960 Ins/del**	+3003 T/C	+3010 C/G	+3027 C/A	+3035 C/T	+3142 G/C	+3187 A/G	+3196 C/G
+2960 Ins/del	—	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>
+3003 T/C	0.965	—	<i>0.000</i>	<i>0.046</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>
+3010 C/G	0.982	1.000	—	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>
+3027 C/A	1.000	1.000	1.000	—	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.001</i>	<i>0.001</i>
+3035 C/T	0.936	1.000	1.000	1.000	—	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>
+3142 G/C	0.991	1.000	0.993	1.000	1.000	—	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>
+3187 A/G	1.000	1.000	0.988	1.000	1.000	1.000	—	<i>0.000</i>
+3196 C/G	0.979	1.000	0.973	1.000	0.959	0.987	1.000	—

\*D' Lewontin Normalized Coefficient (under the line) and the probability of linkage disequilibrium (above the line, p<0.05).

\*\*+2960 Ins/del= 14-bp Insertion/deletion.

Table 4. Haplotype frequencies observed in RPL women and control group in respect to the *HLA-G* 3'UTR polymorphic sites.

Haplotypes <sup>a</sup>	RPL (2n=250)	Frequency (%)	Control (2n=304)	Frequency (%)	<i>p</i> -value
UTR-1 (DelTGCCCGC)	55	22.0	88	29.0	0.058
UTR-2 (InsTCCCGAG)	74	29.6	80	26.3	0.367
UTR-3 (DelTCCCGAC)	29	11.6	33	10.9	0.737
UTR-4 (DelCGCCCAC)	29	11.6	36	11.8	0.947
UTR-5 (InsTCCTGAC)	23	9.2	24	7.9	0.595
UTR-6 (DelTGCCCAC)	19	7.6	28	9.2	0.493
UTR-7 (InsTCATGAC)	14	5.6	13	4.3	0.494
Others <sup>b</sup>	7	2.8	2	0.6	-

<sup>a</sup>Haplotype consensus sequences are represented by 14bpIns/Del +3003T/C +3010C/G +3027C/A +3035C/T +3142G/C +3187A/G +3196C/G.

<sup>b</sup>Group of haplotypes with frequency lower than 1%.

Table 5. Haplotype frequencies observed in RPL women and control group at the *HLA-G* 3'UTR polymorphic sites

Haplotypes	Control <sup>a</sup> 2n=304(%)	RPL <sup>b</sup> 2n=250(%)	<i>p</i> -value <sup>a,b#</sup>	Primary <sup>c</sup> RPL 2n=192(%)	<i>p</i> -value <sup>a,c#</sup>	Secondary <sup>d</sup> RPL 2n=58(%)	<i>p</i> -value <sup>a,d#</sup>
UTR-1 (DeITGCCCGC)	88 (29.0)	55 (22.0)	0.058	42 (21.9)	0.084	13 (22.4)	0.303
UTR-2 (InsTCCCGAG)	80 (26.3)	74 (29.6)	0.367	50 (26.0)	0.958	24 (41.4)	0.022
UTR-3 (DeITCCCGAC)	33 (10.9)	29 (11.6)	0.737	23 (12.0)	0.718	6 (10.5)	0.908
UTR-4 (DeICGCCAC)	36 (11.8)	29 (11.6)	0.947	24 (12.5)	0.833	5 (8.6)	0.576
UTR-5 (InsTCCTGAC)	24 (7.9)	23 (9.2)	0.595	18 (9.4)	0.565	5 (8.6)	0.696
UTR-6 (DeITGCCAC)	28 (9.2)	19 (7.6)	0.493	17 (8.9)	0.937	2 (3.4)	0.156
UTR-7 (InsTCATGAC)	13 (4.3)	14 (5.6)	0.494	12 (6.2)	0.349	2 (3.4)	0.858
Others <sup>1</sup>	2 (0.6)	7 (2.8)	—	6 (3.1)	—	1 (1.7)	—

<sup>1</sup>Group of all haplotypes with frequencies lower than 1%. Bonferroni corrected *p*-value for multiple comparisons  $\alpha=0.05/7=0.007$ .

#Fisher's test.

<sup>a,b</sup>*p*-value = Control X RPL. <sup>a,c</sup>*p*-value = Control X Primary RPL. <sup>a,d</sup>*p*-value = Control X Secondary RPL.



Table 6. Carriers and non-carriers of the 14-bp Ins\_+3142G\_+3187A haplotype alleles in RPL women and control group.

	RPL n=125	Control n=152	<i>p</i> -value <sup>1</sup>
Carriers n(%)	85 (68.0)	94 (61.8)	0.285
Non-carriers n(%)	40 (32.0)	58 (38.2)	
	Primary RPL n=96	Control n=152	
Carriers n(%)	62 (64.6)	94 (61.8)	0.639
Non-carriers n(%)	34 (35.4)	58 (38.2)	
	Secondary RPL n=29	Control n=152	
Carriers n(%)	23 (79.3)	94 (61.8)	0.073
Non-carriers n(%)	6 (20.7)	58 (38.2)	

<sup>1</sup> Fisher's exact test

Table 7. Genotype and allele frequencies of the *HLA-G* 3'UTR polymorphisms evaluated for women with RPL and the control group.

	RPL n=125(%)	Control n=152(%)	Odds Ratio (95% CI)	<i>p</i> -value <sup>1</sup>
14-bp Ins/Del				
Del/Del	39 (31.2)	58 (38.2)	1	
Del/Ins	58 (46.4)	71 (46.7)	1.36 (0.75-2.49)	0.310
Ins/Ins	28 (22.4)	23 (15.1)	1.70 (0.79-3.70)	0.172
+3003 T/C				
TT	97 (77.6)	118 (77.6)	1	
TC	26 (20.8)	32 (21.1)	1.14 (0.59-2.20)	0.699
CC	2 (1.6)	2 (1.3)	1.79 (0.21-15.3)	0.593
+3010 C/G				
GG	23 (18.4)	39 (25.7)	1	
CG	59 (47.2)	74 (48.6)	1.42 (0.72-2.82)	0.310
CC	43 (34.4)	39 (25.7)	1.44 (0.69-3.00)	0.336
+3027 C/A				
CC	111 (88.8)	139 (91.4)	1	
CA	14 (11.2)	13 (8.6)	1.54 (0.59-4.00)	0.375
AA	—	—		
+3035 C/T				
CC	88 (70.4)	115 (75.6)	1	
CT	35 (28.0)	36 (23.7)	1.27 (0.69-2.37)	0.437
TT	2 (1.6)	1 (0.7)	3.14 (0.20-50.4)	0.418
+3142 G/C				
CC	21 (16.8)	40 (26.3)	1	
GC	60 (48.0)	73 (48.0)	1.62 (0.81-3.24)	0.174
GG	44 (35.2)	39 (25.7)	1.64 (0.77-3.48)	0.197
+3187 A/G				
GG	7 (5.6)	11 (7.2)	1	
AG	41 (32.8)	67 (44.1)	0.84 (0.28-2.52)	0.754
AA	77 (61.6)	74 (48.7)	1.24 (0.42-3.64)	0.695
+3196 C/G				
CC	59 (47.2)	79 (52.0)	1	
CG	54 (43.2)	66 (43.4)	1.03 (0.59-1.80)	0.906
GG	12 (9.6)	7 (4.6)	2.12 (0.74-6.11)	0.161

<sup>1</sup>*p*-values were obtained by binary logistic regression (with smoking, alcohol consumption, ethnicity and number of pregnancies) among groups, without Bonferroni correction.

## References

- ACOG (2002) ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 78:179–190.
- ACOG (2011) Committee opinion no. 496: At-risk drinking and alcohol dependence: obstetric and gynecologic implications. *Obstet Gynecol* 118:383–8.
- Barrett JC, Fry B, Maller J and Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–5
- Bermingham J, Jenkins D, McCarthy T and O'Brien M (2000) Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans* 28:215–9.
- Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, Le Bouteiller P and Dohr G (1997) Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27:3380–8.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, Carosella ED, Moreau P and Donadi E a (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 11:134–141.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P and Donadi E a. (2011) A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: Implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol* 28:3069–3086.
- Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Giuliatti S, Carosella ED, Donadi EA, Chiromatzo AOE et al. (2009) In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 70:1020–1025.
- Cecati M, Giannubilo SR, Emanuelli M, Tranquilli AL and Saccucci F (2011) HLA-G and pregnancy adverse outcomes. *Med Hypotheses* 76:782–784.
- Christiansen OB, Kolte AM, Dahl M, Larsen EC, Steffensen R, Nielsen HS and Hviid T V (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* 73:699–705.

- Cordero EAA, Veit TD, da Silva MAL, Jacques SMC, Silla LMDR and Chies JAB (2009) HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 74:308–13.
- Dahl M, Djuricic S and Hviid TVF (2014) The many faces of human leukocyte antigen-G: Relevance to the fate of pregnancy. *J Immunol Res*.
- Di Cristofaro J, El Moujally D, Agnel A, Mazières S, Cortey M, Basire A, Chiaroni J and Picard C (2013) HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. *Hum Immunol* 74:203–206.
- Fan W, Li S, Huang Z and Chen Q (2014) Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: A meta-analysis of non-family-based studies. *J Assist Reprod Genet* 31:173–184.
- Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam a, Toubert a, Bensussan a and Le Bouteiller P (2000) Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8<sup>+</sup> cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164:6100–6104.
- Graebin P, Veit TD, Alho CS, Dias FS and Chies JA (2012) Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients. *Crit Care* 16:R211.
- Hunt JS, Morales PJ, Pace JL, Fazleabas AT and Langat DK (2007) A commentary on gestational programming and functions of HLA-G in pregnancy. *Placenta* 28 Suppl A:S57–63.
- Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C and Christiansen OB (2002) HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 60:122–132.
- Hviid TVF, Hylenius S, Rørbye C and Nielsen LG (2003) HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 55:63–79.
- Hviid TVF, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A and Baricordi OR (2004) HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 56:135–41.

- Ishitani A and Geraghty DE (1992) Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3947–51.
- Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H and Geraghty DE (2003) Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 171:1376–84.
- Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Larsen MH, Hylenius S, Andersen A-MN and Hviid TVF (2010) The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: revisited. *Tissue Antigens* 75:253–61.
- Le Bouteiller P (2013) Human decidual NK cells: unique and tightly regulated effector functions in healthy and pathogen-infected pregnancies. *Front Immunol* 4:404.
- Lucena-Silva N, de Souza VSB, Gomes RG, Fantinatti A, Muniz YCN, de Albuquerque RS, Monteiro ALR, Diniz GTN, Coelho MRCD, Mendes-Junior CT et al. (2013) HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 Brazilian Populations. *J Rheumatol* 40:1104–1113.
- Martelli-Palomino G, Pancotto J a., Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, Krawice-Radanne I, Poras I, Rebmann V, Carosella ED et al. (2013) Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential hla-g Soluble Levels in the Brazilian and French Population. *PLoS One* 8:1–10.
- Osorio RG (2003). O sistema classificatório de "cor ou raça" do IBGE. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2003; 50 p
- Rai R and Regan L (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601–611.
- Rizzo R, Andersen AS, Lassen MR, Sørensen HC, Bergholt T, Larsen MH, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR and Hviid TVF (2009) Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 62:320–38.
- Rizzo R, Trentini A, Bortolotti D, Manfrinato MC, Rotola A, Castellazzi M, Melchiorri L, Di Luca D, Dallochio F, Fainardi E et al. (2013) Matrix metalloproteinase-2

- (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding. *Mol Cell Biochem* 381:243–55.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED and Moreau P (2003) The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 64:1005–10.
- Sipak-Szmigiel O, Cybulski C, Lubiński J and Ronin-Walknowska E (2008) HLA-G polymorphism in a Polish population and reproductive failure. *Tissue Antigens* 71:67–71.
- Stephens M and Donnelly P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162–9
- Stephens M, Smith NJ and Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–89.
- Svendsen SG, Hantash BM, Zhao L, Faber C, Bzorek M, Nissen MH and Hviid TVF (2013) The expression and functional activity of membrane-bound human leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region. *Hum Immunol* 74:818–827.
- Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D et al. (2007) Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 81:829–34.
- Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ and Makrigiannakis A (2010) Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 85:25–32.
- Veit TD and Chies J a B (2009) Tolerance versus immune response - MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* 20:229–231.
- Wang X, Jiang W and Zhang D (2013) Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: A meta-analysis. *Tissue Antigens* 81:108–115.
- Yan WH, Lin a., Chen XJ, Dai MZ, Gan LH, Zhou MY, Zhu M, Shi WW and Liu JM (2006) Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 68:521–523.

- Yie S, Li L, Xiao R and Librach CL (2008) A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 14:649–53.
- Zhu Y, Huo Z, Lai J, Li S, Jiao H, Dang J and Jin C (2009) Case-control study of a HLA-G 14-bp insertion-deletion polymorphism in women with recurrent miscarriages. *Scand J Immunol* 71:52–54.

## **CAPÍTULO 5**

### **Discussão**



### 3. DISCUSSÃO

O sucesso gestacional depende da adequada invasão do blastocisto na decídua materna. Isto é dependente de três principais fatores: da qualidade do embrião, da receptividade do endométrio e da interação entre os dois. Devido a isto, a aberrante placentação ocasionada pela extensiva ou ineficaz invasão das células extravilosas do trofoblasto é considerada como principal causa de complicações gestacionais, tais como abortamentos, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento intrauterino, prematuridade e até mesmo morte materna e/ou fetal (vide revisão em Hammer, 2011).

Os mecanismos apoptóticos são muito importantes do ponto de vista reprodutivo, pois é demonstrado que a apoptose é um processo essencial durante os primeiros estágios da gestação além de participar de muitas funções fisiológicas como: promover a adequada remodelação da decídua materna, atuar no controle da invasão do trofoblasto e na manutenção do balanço da tolerância imune materno-placentária (Aschkenazi et al. 2002; Huppertz et al. 2006).

No presente estudo, visamos compreender o papel de variantes polimórficas dos genes relacionados ao processo apoptótico. O sistema FAS-FAS-L e BAX-BCL-2, principais representantes das vias extrínseca e intrínseca, respectivamente, foram analisados. Além disso, o HLA-G relacionado aos processos apoptóticos e de imunoregulação também foi abordado neste estudo. Embora, diferenças significativas não foram observadas entre mulheres com AR e múltíparas saudáveis, nossos achados contribuem para a atual compreensão desta complexa desordem gestacional.

O sistema FAS-FAS-L inicialmente demonstrado ser importante na manutenção do privilégio imune nos olhos, testículos, tumores, entre outros sítios, também é observado no sítio de implantação do blastocisto, sendo o FAS-L expresso tanto nas células da decídua materna como nas células EVT atuando como um mecanismo de exclusão clonal de células do sistema imunológico que reconhecem antígenos paternos presentes nas células fetais (Wajant 2002; Qiu et al. 2005; Peter et al. 2007). Além disso, a ativação de linfócitos T por antígenos estranhos é capaz de induzir a expressão de FAS e este quando interage com seu ligante desencadeia a cascata apoptótica que acaba eliminado estes linfócitos e suprimindo a resposta imune (Abrahams et al. 2004; Qiu et al. 2005). A variante -670 A/G do gene *FAS*, não está associada ao risco de AR na atual população estudada, resultado que está de acordo com outros estudos prévios em mulheres com AR (Nair et al. 2012; Banzato et al.

2013). Interessantemente, o alelo G desta variante genética está associado ao risco de complicações gestacionais mais severas, como ruptura prematura das membranas, pré-eclâmpsia e restrição do crescimento fetal (Fuks et al. 2005; Kalish et al. 2005; Sziller et al. 2005; Robinson et al. 2009; Ciarmela et al. 2010). Sugere-se que a redução na sinalização apoptótica dos linfócitos T maternos possa ser atribuída a esta variante, visto que ela favorece uma capacidade prolongada destes linfócitos reconhecerem e destruir as células do trofoblasto durante o processo de invasão da decídua materna e artérias espirais (Sziller et al. 2005). Outra hipótese sugere que a variante -670G resulte na resistência seletiva de apenas células de perfil Th1, portanto permitindo que estas células secretem mais citocinas de perfil inflamatório (Fuks et al. 2005). Não obstante, a variante FAS -670A/G também contribui para o risco de outras condições patológicas, como câncer, osteoartrite e lúpus eritematoso sistêmico (Wu et al. 2003; Sun et al. 2004; Zhang et al. 2006; Sezgin et al. 2013). O outro polimorfismo analisado neste estudo foi o -1377G/A do gene *FAS*, também localizado na região promotora do gene. Até o momento, apenas um estudo analisou esta variante no contexto do abortamento de repetição. Nair e colaboradores (2012) observaram que o alelo A estava independentemente associado ao risco de AR na população Indiana, e de forma interessante estes pesquisadores demonstraram que a presença combinada dos genótipos -1377AA e -670GG conferiam o maior risco para AR na população estudada. Nossos dados não indicaram diferenças significativas nas frequências deste polimorfismo entre os grupos. No entanto, a distribuição do alelo A difere entre as populações com diferentes composições étnicas, sendo mais frequente nas populações asiática (1000 Genomes Project Consortium).

A via mitocondrial ou intrínseca da apoptose que compreende as proteínas pró-apoptóticas (BAX) e anti-apoptóticas (BCL-2), também foram investigadas no presente estudo. Foram analisadas as variantes polimórficas dos genes *BAX* -248G/A e *BCL-2* -938C/A, ambas localizadas na região promotora. A avaliação desta via apoptótica é fundamentada na interação existente entre as duas vias de morte celular, visto que a via extrínseca pode ativar a via intrínseca e amplificar os sinais apoptóticos (Igney and Krammer 2002). Portanto, a avaliação de ambas possibilita uma compreensão mais detalhada do processo apoptótico em mulheres com AR. Na gestação saudável, o delicado balanço entre BAX:BCL-2 é crucial durante o primeiro e terceiro trimestre da gestação, sendo os níveis de expressão de BCL-2 na placenta geralmente menores a medida que a

gestação progride, por outro lado, BAX gradualmente aumenta ao término da gestação (De Falco et al. 2001). Dada às circunstâncias, propõe-se que a desregulação do processo apoptótico possa ocasionar a disfunção placentária e conseqüentemente as desordens gestacionais (Cobellis et al. 2007).

As análises das variantes polimórficas dos genes *BAX* e *BCL-2* não indicaram a associação ao risco de AR na atual população. Até o momento, este é o primeiro estudo que avalia estas variantes polimórficas no contexto gestacional. Por outro lado, estas variantes são extensamente estudadas em doenças autoimunes e câncer (Starczynski et al. 2005; Nüchel et al. 2007; Bachmann et al. 2007; Heubner et al. 2009; Zhang et al. 2011). De forma interessante, é descrito que a região promotora do gene *BAX* possui motivos de ligação para a proteína p53 (que atua como um importante fator de transcrição), embora a variante estudada não influencie na ligação de p53, é possível que esta variante seja dependente da ativação de p53 nestes sítios, uma vez que interações gene-gene na rede do *TP53* estão associadas ao risco de AR (Fraga et al. 2014).

Devido ao feto não ser geneticamente idêntico à mãe, é racional considerar que existem mecanismos específicos que permitam à mãe prosseguir gestando o concepto sem rejeição. De fato, durante a gestação as células e tecidos fetais estão em contato direto com as células do sistema imune materno. A população de células dominante na decídua é composta principalmente por células dNK e macrófagos. Por outro lado, Linfócitos T CD4+, T CD8+ e células dendríticas são os menos representados, enquanto que células B e NK são raras (Erlebacher 2013).

Neste cenário, o HLA-G destaca-se por sua versatilidade, visto que a funcionalidade da molécula é mediada pela ligação a específicos receptores presentes nas células maternas imunes e não imunes, incluindo os receptores CD8, LILR (*leukocyte immunoglobulin-like receptor*) B1, LILRB2, KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) 2DL4 e possivelmente CD160 (vide revisão em Le Bouteiller 2015). Tais interações específicas contribuem tanto para ativação ou inibição destas células. Por exemplo, o HLA-G pode limitar a resposta do sistema imune materno contra antígenos paternos através da inibição da atividade citotóxica das células dNK, inibição da proliferação de células T e B e indução da apoptose de células T CD8+ ativadas. Ainda, estas interações contribuem para estimular o desenvolvimento placentário/remodelação através da secreção de fatores angiogênicos pelas células dNK (Rajagopalan e Long 2012).

Além disso, é observado que a expressão do HLA-G nas células EVT's aumentam à medida que elas migram em direção a vasculatura uterina (McMaster et al. 1995).

É descrito que as regiões 5' UTR e 3' UTR do gene *HLA-G* influenciam a magnitude de expressão do HLA-G tanto ao nível transcricional e pós-transcricional (Castelli et al. 2011). Das regiões regulatórias do gene, destaca-se principalmente a região 3' UTR, pois é observado que sítios polimórficos nesta região influenciam na regulação direta da expressão do gene, devido a afinidade por miRNAs ou por afetarem a estabilidade do RNA mensageiro (Rousseau et al. 2003; Yie et al. 2008; Veit e Chies 2009).

Nosso estudo avaliou a região 3' UTR do gene *HLA-G*, a qual contém oito variantes polimórficas putativamente funcionais relacionadas a regulação da expressão do gene. Como resultado, as frequências genotípicas e alélicas das variantes: 14-pb inserção/deleção, +3003T/C, +3010C/G, +3027C/A, +3035C/T, +3142G/C, +3187A/G e +3196C/G não diferiram entre os grupos estudados. A análise da frequência dos haplótipos de forma similar não diferiu estatisticamente entre os grupos. No entanto, nós observamos que os potenciais alelos de risco 14-pb Inserção, +3142G e +3187A são mais representados no grupo de mulheres com AR em relação a múltiparas saudáveis. Ainda, na análise de haplótipos observamos um padrão relevante na frequência do UTR-2, (descrito previamente associado a menores níveis de expressão de HLA-G solúvel) no grupo de mulheres com AR do que no grupo controle, a mesma observação comporta-se de uma maneira inversa para as mulheres múltiparas saudáveis, as quais apresentam uma tendência a maior frequência do haplótipo UTR-1, relacionado previamente a maiores níveis de expressão da proteína (Martelli-Palomino et al. 2013). Apesar das frequências haplotípicas observadas não diferirem estatisticamente entre os grupos, é importante salientar que em um estudo de tríade no desfecho de pré-eclâmpsia analisando o polimorfismo 14-pb inserção/deleção não foram observadas diferenças significativas na distribuição genotípica entre as mulheres com tal condição e grupo controle. No entanto, foi observado um excesso de homozigotos para o alelo de inserção nos recém-nascidos de mulheres com PE, sugerindo que isto se deve a transmissão diferencial paterna dos alelos da variante 14-pb, visto que, é observado uma menor combinação nos genótipos de 14-pb inserção de origem paterna em relação ao recém-nascido na tríade controle e uma predominância oposta da transmissão paterna do alelo de inserção em tríades com pré-eclâmpsia (Hylenius et al.

2004). Até o momento, não há evidências que comprovem o papel da variante 14-pb Ins/Del no risco ao AR, além disso, duas recentes meta-análises sugerem resultados contraditórios (Tripathi et al. 2004; Yan et al. 2006; Sipak-Szmigiel et al. 2008; Zhu et al. 2009; Jassem et al. 2012; Wang et al. 2013; Fan et al. 2014).

A variante +3142G/C localiza-se em um importante sítio de ligação para miRNAs e é reportado que a transição de uma Guanina para Citosina influencie na ligação de diversos miRNAs (Tan et al. 2007; Veit e Chies 2009; Castelli et al. 2009). Até o momento poucos estudos avaliaram esta variante no risco de AR. Corroborando nossos dados Jassem e colaboradores (2012) também não observaram a associação desta variante com o risco de AR. No entanto, é observado que o genótipo +3142GG (fetal) é associado a PE em primíparas (Larsen et al. 2010). Além disso, em condições patológicas não relacionadas à gestação observa-se que esta variante contribui para o risco de doenças autoimunes como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (Consiglio et al. 2011; Veit et al. 2014).

A variante +3187 A/G está associada à degradação do mRNA, pois localiza-se próximo a um importante elemento regulatório rico em AU (adenilato-uridilato), o qual é um determinante comum da estabilidade de mRNA (Chen e Shyu 1995). Dados na literatura associando esta variante ao risco de AR são escassos. Na PE é demonstrado que o alelo +3187A confere menor estabilidade do mRNA *in vitro* e risco a PE (Yie et al. 2008). No entanto, Larsen e colaboradores (2010) avaliaram mulheres primíparas com PE e observaram resultados contraditórios. Uma possível explicação para estes resultados contraditórios é que polimorfismos na região promotora que estão associados ao nível de expressão podem estar em desequilíbrio de ligação com o +3187A/G, atuando de forma sinérgica no controle transcricional e pós-transcricional (Ober et al. 2006; Nilsson et al. 2014).

Outras quatro variantes investigadas, são elas: +3003, +3010,+3027 e +3035 não possuem um mecanismo de regulação específico, mas possivelmente contribuem para a ligação de miRNAs (Castelli et al. 2009). É importante observar que as variantes analisadas podem compor um bloco haplotípico e possivelmente atuarem na regulação pós-transcricional do *HLA-G*. Nossos dados não indicam diferenças significativas na frequência dos haplótipos entre os grupos. Porém, observamos que o haplótipo mais frequente no grupo controle foi o UTR-1, o qual é o único haplótipo que não possui qualquer alelo associado a menor expressão do *HLA-G*. De fato, é descrito que o UTR-1 é

correlacionado com maiores níveis de expressão de HLA-G solúvel em pessoas saudáveis (Di Cristofaro et al. 2013; Martelli-Palomino et al. 2013). Inversamente, o haplótipo UTR-2 foi o mais frequente no grupo de mulheres com AR, o qual possui os principais alelos associados a menor expressão de *HLA-G* (Martelli-Palomino et al. 2013). Além do UTR-2, os haplótipos -5 e -7 também apresentam tais alelos, sendo estes haplótipos similarmente mais representados nas mulheres com AR. Interessantemente, Larsen e colaboradores (2010) observaram que recém-nascidos portadores em homozigose do haplótipo composto pelos alelos 14-pb inserção, +3010C, +3142G, +3187A e +3196G (UTR-2/5/7) são mais propensos ao risco de pré-eclâmpsia, possivelmente devido a menor expressão do *HLA-G* ocasionado pela presença concomitante desta variantes funcionais. Se estes haplótipos são considerados secretores baixo ou intermediário de HLA-G solúvel ainda permanece a ser esclarecido (Di Cristofaro et al. 2013; Martelli-Palomino et al. 2013). Além disso, permanece a ser avaliado se estes achados podem ou não ser extrapolados para a expressão de HLA-G solúvel pelas células EVT. Outro aspecto que deve ser considerado é a análise dos haplótipos estendidos, visto que tal abordagem poderia determinar de forma mais correta a regulação transcricional do gene.

Dos fatores de risco já estabelecidos para o AR, nosso estudo observou que o consumo de álcool foi mais frequente em mulheres com AR em relação ao grupo controle. O consumo de álcool causa efeitos adversos no desenvolvimento fetal, além disso, não há nenhuma quantidade segura do seu consumo durante a gravidez (ACOG 2011). Não tão menos importante, embora não tenhamos observado diferença estatística nas frequências entre os grupos, o hábito de fumar é considerado um importante fator de risco para o abortamento e o risco é modulado de maneira dose-dependente (Domínguez-Rojas et al. 1994; Kumar 2011). Além disso, é relatado que o fumo durante o primeiro trimestre da gravidez aumenta a expressão de genes relacionados à angiogênese e a apoptose (*TP53*, *BAX* e *BCL-2*) nas células vilosas (Kawashima et al. 2014). A composição étnica entre os grupos estudados diferiram. No entanto, até o momento não há dados que suportam a origem étnica como um fator de risco independente para o desenvolvimento AR.

Em conclusão, nosso estudo sugere que as variantes polimórficas dos genes *FAS*, *FAS-L*, *BCL-2* e *BAX*, bem como os haplótipos da região 3' UTR do *HLA-G* não estão associadas ao risco de AR na atual população. No entanto, estudos com maior tamanho

amostral e em diferentes populações devem ser realizados para confirmar os achados do presente estudo.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, Maccallini G, Garcia A and Levalle O (2002) Overt and subclinical hypothyroidism complicating pregnancy. *Thyroid* 12:63–8. doi: 10.1089/105072502753451986
- Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT and McVean GA (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491:56–65.
- Abrahams VM, Straszewski-Chavez SL, Guller S and Mor G (2004) First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10:55–63.
- ACOG (2002) ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 78:179–190.
- ACOG (2011) Committee opinion no. 496: At-risk drinking and alcohol dependence: obstetric and gynecologic implications. *Obstet Gynecol* 118:383–8.
- Andersen JL, Kornbluth S. The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. *Mol Cell*. 2013 Feb 7;49(3):399-410.
- Aschkenazi S, Straszewski S, Verwer KMA, Foellmer H, Rutherford T and Mor G (2002) Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells. *Biol Reprod* 66:1853–61.
- ASRM, Practice T and Medicine R (2012) Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertil Steril* 98:1103–1111.
- Bachmann HS, Otterbach F, Callies R, Nüchel H, Bau M, Schmid KW, Siffert W and Kimmig R (2007) The AA genotype of the regulatory BCL2 promoter polymorphism ( 938C>A) is associated with a favorable outcome in lymph node negative invasive breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:5790–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2673
- Baek K-H (2004) Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod* 10:291–297. doi: 10.1093/molehr/gah049
- Baek K-H, Choi BC, Lee J-H, Choi H-K, Lee S-H, Kim J-W, Hill JA, Chung H-M, Ko JJ and Cha KY (2002) Comparison of gene expression at the feto-maternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients. *Reprod Fertil Dev* 14:235–40.
- Baek K-H, Lee E-J and Kim Y-S (2007) Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med* 13:310–317.
- Bajekal N and Li TC (2000) Fibroids, infertility and pregnancy wastage. *Hum Reprod Update* 6:614–20.
- Bansal AS (2010) Joining the Immunological Dots in Recurrent Miscarriage. *Am J Reprod Immunol* 64:307–315.
- Banzato PCA, Daher S, Traina E, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Puccini RF, Pendeloski KPT and Mattar R (2013) FAS and FAS-L Genotype and Expression in Patients With Recurrent Pregnancy Loss. *Reprod Sci* 1933719113477488–.
- Barrett JC, Fry B, Maller J and Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–5. doi: 10.1093/bioinformatics/bth457



- Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM and Vince GS (2002) Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? *Hum Reprod* 17:2439–44.
- Bermingham J, Jenkins D, McCarthy T and O'Brien M (2000) Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans* 28:215–9.
- Bhattacharya S, Townend J and Bhattacharya S (2010) Recurrent miscarriage: Are three miscarriages one too many? Analysis of a Scottish population-based database of 151,021 pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 150:24–27.
- Blaschitz A, Lenfant F, Mallet V, Hartmann M, Bensussan A, Geraghty DE, Le Bouteiller P and Dohr G (1997) Endothelial cells in chorionic fetal vessels of first trimester placenta express HLA-G. *Eur J Immunol* 27:3380–8.
- Boots C and Stephenson MD (2011) Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med* 29:507–13. doi: 10.1055/s-0031-1293204
- Branch DW, Gibson M and Silver RM (2010) Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 363:1740–7. doi: 10.1056/NEJMc1005330
- Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J and Rouas-Freiss N (2008) HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29:125–32.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS, de Albuquerque RS, Muniz YCN, Simões RT, Carosella ED, Moreau P and Donadi E a (2010) The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 11:134–141.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P and Donadi E a. (2011) A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: Implication for gene regulation and evolution. *Mol Biol Evol* 28:3069–3086.
- Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, Giuliatti S, Carosella ED, Donadi EA, Chiromatzo AOE et al. (2009) In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 70:1020–1025.
- Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A, Donadi EA, Mendes-Junior CT (2015) Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. *Front Immunol*. 2014 Oct 6;5:476.
- Cecati M, Giannubilo SR, Emanuelli M, Tranquilli AL and Saccucci F (2011) HLA-G and pregnancy adverse outcomes. *Med Hypotheses* 76:782–784.
- Charo J, Finkelstein SE, Grewal N, Restifo NP, Robbins PF and Rosenberg SA (2005) Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific T-cell survival. *Cancer Res* 65:2001–8.
- Chen CY and Shyu AB (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 20:465–70.
- Chen L-W, Wu Y, Neelakantan N, Chong MF-F, Pan A and van Dam RM (2014) Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Med* 12:174.
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ and Mountz JD (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759–62.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ and Green DR (2010) The BCL-2 Family Reunion. *Mol Cell* 37:299–310.

- Choi H-K, Choi BC, Lee S-H, Kim JW, Cha KY and Baek K-H (2003) Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 66:24–31.
- Christiansen OB (2013) Reproductive immunology. *Mol Immunol* 55:8–15.
- Christiansen OB, Kolte AM, Dahl M, Larsen EC, Steffensen R, Nielsen HS and Hviid T V (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* 73:699–705.
- Ciarmela P, Boschi S, Bloise E, Marozio L, Benedetto C, Castellucci M and Petraglia F (2010) Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes in preeclamptic women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 148:144–146.
- Cnattingius S, Signorello LB, Annerén G, Clausson B, Ekblom A, Ljunger E, Blot WJ, McLaughlin JK, Petersson G, Rane A et al. (2000) Caffeine intake and the risk of first-trimester spontaneous abortion. *N Engl J Med* 343:1839–45.
- Cobellis L, De Falco M, Torella M, Trabucco E, Caprio F, Federico E, Manente L, Coppola G, Laforgia V, Cassandro R et al. (2007) Modulation of Bax expression in physiological and pathological human placentas throughout pregnancy. *In Vivo* 21:777–83.
- Consiglio CR, Veit TD, Monticeli OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JCT and Chies JAB (2011) Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 77:540–5.
- Cordero EAA, Veit TD, da Silva MAL, Jacques SMC, Silla LMDR and Chies JAB (2009) HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 74:308–13.
- Cramer DW and Wise LA (2000) The epidemiology of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 18:331–9.
- Crispim JCO, Mendes-Junior CT, Wastowski IJ, Costa R, Castelli EC, Saber LT and Donadi EA (2008) Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome. *Tissue Antigens* 71:35–41.
- Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY and Torloni MR (2012) Genetic Polymorphisms and Recurrent Spontaneous Abortions: An Overview of Current Knowledge. *Am J Reprod Immunol* 67:341–347.
- Dahl M, Djuricic S and Hviid TVF (2014) The many faces of human leukocyte antigen-G: Relevance to the fate of pregnancy. *J Immunol Res*.
- Dahl M and Hviid TVF (2012) Human leucocyte antigen class Ib molecules in pregnancy success and early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 18:92–109.
- Daniel PT (2000) Dissecting the pathways to death. *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund, UK* 14:2035–2044.
- De Braekeleer M and Dao TN (1990) Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses. *Hum Reprod* 5:519–28.
- De Falco M, De Luca L, Acanfora F, Cavallotti I, Cottone G, Laforgia V, De Luca B, Baldi a. and De Luca a. (2001) Alteration of the Bcl-2: Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Histochem J* 33:421–425.
- Di Cristofaro J, El Moujally D, Agnel A, Mazières S, Cortey M, Basire A, Chiaroni J and Picard C (2013) HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. *Hum Immunol* 74:203–206.

- Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B, Spong CY, Thom E, Wendel G, Wenstrom K, Samuels P, Cotroneo MA, Moawad A et al. (2005) The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus. *Obstet Gynecol* 106:517–24.
- Domínguez-Rojas V, de Juanes-Pardo JR, Astasio-Arbiza P, Ortega-Molina P and Gordillo-Florencio E (1994) Spontaneous abortion in a hospital population: are tobacco and coffee intake risk factors? *Eur J Epidemiol* 10:665–8.
- Donadi E a., Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D and Moreau P (2011) Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 68:369–395.
- Erlebacher A (2013) Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol* 31:387–411.
- Fan W, Li S, Huang Z and Chen Q (2014) Relationship between HLA-G polymorphism and susceptibility to recurrent miscarriage: A meta-analysis of non-family-based studies. *J Assist Reprod Genet* 31:173–184.
- Ford HB and Schust DJ (2009) Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2:76–83.
- Fournel S, Aguerre-Girr M, Huc X, Lenfant F, Alam a, Toubert a, Bensussan a and Le Bouteiller P (2000) Cutting edge: soluble HLA-G1 triggers CD95/CD95 ligand-mediated apoptosis in activated CD8+ cells by interacting with CD8. *J Immunol* 164:6100–6104.
- Fraga LR, Dutra CG, Boquett J a., Vianna FSL, Gonçalves RO, Paskulin DD, Costa OL, Ashton-Prolla P, Sanseverino MT V and Schuler-Faccini L (2014) P53 Signaling Pathway Polymorphisms Associated To Recurrent Pregnancy Loss. *Mol Biol Rep* 41:1871–1877.
- Franssen MTM, Korevaar JC, van der Veen F, Leschot NJ, Bossuyt PMM and Goddijn M (2006) Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index [corrected]-control study. *BMJ* 332:759–63.
- Fu B, Tian Z and Wei H (2014) TH17 cells in human recurrent pregnancy loss and pre-eclampsia. *Cell Mol Immunol* 11:564–70.
- Fuks A, Parton L a., Polavarapu S, Netta D, Strassberg S, Godi I and Hsu CD (2005) Polymorphism of Fas and Fas ligand in preterm premature rupture of membranes in singleton pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 193:1132–1136.
- Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C and Kroemer G (2012) Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res* 111:1198–1207. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268946
- Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H and Whiteside TL (1999) Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 59:5356–64.
- George L, Granath F, Johansson AL V, Annerén G and Cnattingius S (2006) Environmental tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* 17:500–5.
- Goldstein DB and Chikhi L (2002) Human migrations and population structure: what we know and why it matters. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:129–52.
- Graebin P, Veit TD, Alho CS, Dias FS and Chies JA (2012) Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients. *Crit Care* 16:R211.

- Green DR and Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626–9.
- Hammer A (2011) Immunological regulation of trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 90:21–28.
- Hard ML, Einarson TR and Koren G (2001) The role of acetaldehyde in pregnancy outcome after prenatal alcohol exposure. *Ther Drug Monit* 23:427–34.
- Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N and Burton GJ (2003) The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. *Hum Pathol* 34:1265–75.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770–776.
- Heubner M, Wimberger P, Otterbach F, Kasimir-Bauer S, Siffert W, Kimmig R and Nüchel H (2009) Association of the AA genotype of the BCL2 (-938C>A) promoter polymorphism with better survival in ovarian cancer. *Int J Biol Markers* 24:223–9.
- Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kikuno N, Suehiro Y, Tabatabai ZL, Ishii N and Dahiya R (2009) The bcl2 -938CC genotype has poor prognosis and lower survival in renal cancer. *J Urol* 182:721–7.
- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC and Surti U (2003) The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 189:397–400; discussion 400–402.
- Holmes CH, Simpson KL, Wainwright SD, Tate CG, Houlihan JM, Sawyer IH, Rogers IP, Spring FA, Anstee DJ and Tanner MJ (1990) Preferential expression of the complement regulatory protein decay accelerating factor at the fetomaternal interface during human pregnancy. *J Immunol* 144:3099–105.
- Huang QR, Morris D and Manolios N (1997) Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 34:577–82.
- Hunt JS, Morales PJ, Pace JL, Fazleabas AT and Langat DK (2007) A commentary on gestational programming and functions of HLA-G in pregnancy. *Placenta* 28 Suppl A:S57–63. doi: 10.1016/j.placenta.2007.01.004
- Hunt JS, Vassmer D, Ferguson TA and Miller L (1997) Fas ligand is positioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. *J Immunol* 158:4122–8.
- Huppertz B, Kadyrov M and Kingdom JCP (2006) Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol* 195:29–39.
- Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C and Christiansen OB (2002) HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 60:122–132.
- Hviid TVF (2006) HLA-G in human reproduction: Aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 12:209–232.
- Hviid TVF, Hylenius S, Rørbye C and Nielsen LG (2003) HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 55:63–79.
- Hviid TVF, Rizzo R, Christiansen OB, Melchiorri L, Lindhard A and Baricordi OR (2004) HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 56:135–41.
- Hylenius S, Andersen A-MN, Melbye M and Hviid TVF (2004) Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 10:237–46.

- Igney FH and Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277–88.
- Ishitani A and Geraghty DE (1992) Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3947–51.
- Ishitani A, Sageshima N, Lee N, Dorofeeva N, Hatake K, Marquardt H and Geraghty DE (2003) Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F, and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 171:1376–84.
- Iversen A-C, Nguyen OTD, Tømmerdal LF, Eide IP, Landsem VM, Acar N, Myhre R, Klungland H and Austgulen R (2008) The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidual HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 78:158–65.
- 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* 93:1234–1243
- Jassem RM, Shani WS, Loisel D a., Sharief M, Billstrand C and Ober C (2012) HLA-G polymorphisms and soluble HLA-G protein levels in women with recurrent pregnancy loss from Basrah province in Iraq. *Hum Immunol* 73:811–817.
- Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB and Exalto N (2006) Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 21:2216–22.
- Jauniaux E, Hempstock J, Greenwold N and Burton GJ (2003) Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies. *Am J Pathol* 162:115–25.
- Jiang SP and Vacchio MS (1998) Multiple mechanisms of peripheral T cell tolerance to the fetal “allograft”. *J Immunol* 160:3086–90.
- Kalish RB, Nguyen DP, Vardhana S, Gupta M, Perni SC and Witkin SS (2005) A single nucleotide A>G polymorphism at position -670 in the Fas gene promoter: Relationship to preterm premature rupture of fetal membranes in multifetal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 192:208–212.
- Kawashima A, Koide K, Ventura W, Hori K, Takenaka S, Maruyama D, Matsuoka R, Ichizuka K and Sekizawa A (2014) Effects of maternal smoking on the placental expression of genes related to angiogenesis and apoptosis during the first trimester. *PLoS One* 9:e106140.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–57.
- King K, Smith S, Chapman M and Sacks G (2010) Detailed analysis of peripheral blood natural killer (NK) cells in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 25:52–8.
- Kiwi R (2006) Recurrent pregnancy loss: Evaluation and discussion of the causes and their management. *Cleve Clin J Med* 73:913–921.
- Komaki S, Kohno M, Matsuura N, Shimadzu M, Adachi N, Hoshide R, Nishiyama S and Matsuda I (1998) The polymorphic 43Thr bcl-2 protein confers relative resistance to autoimmunity: An analytical evaluation. *Hum Genet* 103:435–440.
- Kovalevsky G, Gracia CR, Berlin JA, Sammel MD and Barnhart KT (2004) Evaluation of the association between hereditary thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 164:558–63.

- Kroemer G, Galluzzi L and Brenner C (2007) Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev* 99:163.
- Kumar S (2011) Occupational, environmental and lifestyle factors associated with spontaneous abortion. *Reprod Sci* 18:915–30.
- Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM and Macklon N (2013) New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med* 11:154.
- Larsen MH, Hylenius S, Andersen A-MN and Hviid TVF (2010) The 3'-untranslated region of the HLA-G gene in relation to pre-eclampsia: revisited. *Tissue Antigens* 75:253–61.
- Le Bouteiller P (2015) HLA-G in human early pregnancy: Control of uterine immune cell activation and likely vascular remodeling. *Biomed J* 38:32–8.
- Le Bouteiller P (2013) Human decidual NK cells: unique and tightly regulated effector functions in healthy and pathogen-infected pregnancies. *Front Immunol* 4:404.
- Lee HO and Ferguson T a. (2003) Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:325–335.
- Lehnerdt GF, Franz P, Bankfalvi A, Grehl S, Kelava A, Nüchel H, Lang S, Schmid KW, Siffert W and Bachmann HS (2009) The regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 20:1094–9.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES and Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–89.
- Lila N, Amrein C, Guillemain R, Chevalier P, Fabiani J-N and Carpentier A (2007) Soluble human leukocyte antigen-G: a new strategy for monitoring acute and chronic rejections after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 26:421–2.
- Lindbohm M-L, Sallmén M and Taskinen H (2002) Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health* 28 Suppl 2:84–96.
- Lockwood CJ (2006) Pregnancy-associated changes in the hemostatic system. *Clin Obstet Gynecol* 49:836–43.
- Longtine MS, Chen B, Odibo AO, Zhong Y and Nelson DM (2012) Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR. *Placenta* 33:352–9. doi: 10.1016/j.placenta.2012.01.017
- Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC, Liavaag PG and Jonsson R (1999) Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28:82–7.
- Lucena-Silva N, de Souza VSB, Gomes RG, Fantinatti A, Muniz YCN, de Albuquerque RS, Monteiro ALR, Diniz GTN, Coelho MRCD, Mendes-Junior CT et al. (2013) HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 Brazilian Populations. *J Rheumatol* 40:1104–1113.
- Martelli-Palomino G, Pancotto J a., Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, Krawice-Radanne I, Poras I, Rebmann V, Carosella ED et al. (2013) Polymorphic Sites at the 3' Untranslated Region of the HLA-G Gene Are Associated with Differential hla-g Soluble Levels in the Brazilian and French Population. *PLoS One* 8:1–10.

- Matte C, Lajoie J, Lacaille J, Zijenah LS, Ward BJ and Roger M (2004) Functionally active HLA-G polymorphisms are associated with the risk of heterosexual HIV-1 infection in African women. *AIDS* 18:427–31.
- McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C and Fisher SJ (1995) Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol* 154:3771–8.
- McNamee K, Dawood F and Farquharson R (2012) Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 24:229–34.
- Medawar P (1953) Some immunological and endocrinological problems raised by evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 7:320–328.
- Mills JL (1999) Cocaine, smoking, and spontaneous abortion. *N Engl J Med* 340:380–1.
- Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K and Makrigiannakis a. (2007) Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: A role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod* 13:663–673.
- Miyashita T and Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–9.
- Moreau P, Contu L, Alba F, Lai S, Simoes R, Orrù S, Carcassi C, Roger M, Rabreau M and Carosella ED (2008) HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G\*0106 allele with preeclampsia and miscarriage. *Biol Reprod* 79:459–467.
- Moshynska O, Sankaran K and Saxena a (2003) Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Mol Pathol* 56:205–209.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C and Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191–3.
- Nagata S and Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science* 267:1449–56.
- Nahum R, Brenner O, Zahalka MA, Traub L, Quintana F and Moroz C (2004) Blocking of the placental immune-modulatory ferritin activates Th1 type cytokines and affects placenta development, fetal growth and the pregnancy outcome. *Hum Reprod* 19:715–22.
- Nair RR, Khanna A and Singh K (2012) Association of FAS -1377 G>A and FAS -670 A>G functional polymorphisms of FAS gene of cell death pathway with recurrent early pregnancy loss risk. *J Reprod Immunol* 93:114–118.
- Ness RB, Grisso JA, Hirschinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL and Kline J (1999) Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 340:333–339.
- Nilsson LL, Djuricic S and Hviid TVF (2014) Controlling the immunological crosstalk during conception and pregnancy: HLA-G in reproduction. *Front Immunol* 5:1–10.
- Nüchel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Dürig J, Jöckel KH, Dührsen U and Siffert W (2007) Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:290–297.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J and Melbye M (2000) Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320:1708–12.
- O’Connell J, Houston A, Bennett MW, O’Sullivan GC and Shanahan F (2001) Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med* 7:271–4.

- Ober C, Billstrand C, Kuldane S and Tan Z (2006) The miscarriage-associated HLA-G - 725G allele influences transcription rates in JEG-3 cells. *Hum Reprod* 21:1743–8.
- Ocaña MG, Valle-Garay E, Montes a H, Meana A, Cartón JA, Fierer J, Celada A and Asensi V (2007) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis. *Genet Med* 9:249–255.
- Pandey MK, Rani R and Agrawal S (2005) An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 272:95–108.
- Park BL, Kim LH, Cheong HS, Cho HY, Kim EM, Shin HD, Kim Y-S and Lee C (2004) Identification of variants in cyclin D1 ( CCND1) and B-Cell CLL/lymphoma 2 ( BCL2). *J Hum Genet* 49:449–54.
- Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H et al. (2007) The CD95 Receptor: Apoptosis Revisited. *Cell* 129:447–450.
- Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G and Romagnani S (1998) Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4:1020–1024.
- Pildner von Steingurg S and Schneider K (2009) Recurrent spontaneous abortions- an update on diagnosis and management. *J Reproduktionsmedizin Endokrinol* 6:11–16.
- Porto IO, Mendes-Junior CT, Felício LP, Georg RC, Moreau P, Donadi EA, Chies JA, Castelli EC (2015) MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. *Mol Immunol Jun*;65(2):230-41.
- Proctor JA and Haney AF (2003) Recurrent first trimester pregnancy loss is associated with uterine septum but not with bicornuate uterus. *Fertil Steril* 80:1212–5.
- Prummel MF and Wiersinga WM (2004) Thyroid autoimmunity and miscarriage. *Eur J Endocrinol* 150:751–5.
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK and Gruslin A (2005) Fas ligand expression by maternal decidual cells is negatively correlated with the abundance of leukocytes present at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol* 65:121–132.
- Quenby S, Nik H, Innes B, Lash G, Turner M, Drury J and Bulmer J (2009) Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure. *Hum Reprod* 24:45–54.
- Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 18:478–82.
- Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M and Farhat R (2000) Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 15:713–8.
- Rai R, Backos M, Rushworth F and Regan L (2000) Polycystic ovaries and recurrent miscarriage--a reappraisal. *Hum Reprod* 15:612–5.
- Rai R and Regan L (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601–611.
- Rajagopalan S and Long EO (2012) KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front Immunol* 3:1–6.
- Ranganath RM and Nagashree NR (2001) Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 202:159–242.
- RCOG (2003) The investigation and treatment of couples with recurrent miscarriage. Guidel. no. 17 RCOG. London 17:



- Redman CW, McMichael AJ, Stirrat GM, Sunderland CA and Ting A (1984) Class 1 major histocompatibility complex antigens on human extra-villous trophoblast. *Immunology* 52:457–68.
- Regan L, Braude PR and Trembath PL (1989) Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 299:541–545.
- Rey E, Kahn SR, David M and Shrier I (2003) Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 361:901–8.
- Rizzo R, Andersen AS, Lassen MR, Sørensen HC, Bergholt T, Larsen MH, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR and Hviid TVF (2009) Soluble human leukocyte antigen-G isoforms in maternal plasma in early and late pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 62:320–38.
- Rizzo R, Hviid TVF, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, Stignani M, Carturan S, Grappa MT, Fotinidi M et al. (2008) HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 71:520–9.
- Rizzo R, Trentini A, Bortolotti D, Manfrinato MC, Rotola A, Castellazzi M, Melchiorri L, Di Luca D, Dallochio F, Fainardi E et al. (2013) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) generates soluble HLA-G1 by cell surface proteolytic shedding. *Mol Cell Biochem* 381:243–55.
- Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P and Marsh SGE (2015) The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Research* 43:D423–31
- Robinson R, Hsu CD, Chesebro AL, Nguyen J, Ali N, Maramreddy H and Parton L a. (2009) A single-nucleotide polymorphism (-670) of the maternal Fas gene is associated with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 201:620.e1–620.e4.
- Rosenn B, Miodovnik M, Combs CA, Khoury J and Siddiqi TA (1994) Glycemic thresholds for spontaneous abortion and congenital malformations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 84:515–20.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED and Moreau P (2003) The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 64:1005–10.
- Sabbagh a, Luisi P, Castelli EC, Gineau L, Courtin D, Milet J, Massaro JD, Laayouni H, Moreau P, Donadi E a et al. (2014) Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity. *Genes Immun* 15:95–106.
- Said JM, Higgins JR, Moses EK, Walker SP, Borg AJ, Monagle PT and Brennecke SP (2010) Inherited thrombophilia polymorphisms and pregnancy outcomes in nulliparous women. *Obstet Gynecol* 115:5–13.
- Saito S, Nakashima A, Shima T and Ito M (2010) Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63:601–610.
- Saito S and Sakai M (2003) Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 59:161–73.
- Salim R, Regan L, Woelfer B, Backos M and Jurkovic D (2003) A comparative study of the morphology of congenital uterine anomalies in women with and without a history of recurrent first trimester miscarriage. *Hum Reprod* 18:162–166.

- Sebire NJ, Fox H, Backos M, Rai R, Paterson C and Regan L (2002) Defective endovascular trophoblast invasion in primary antiphospholipid antibody syndrome-associated early pregnancy failure. *Hum Reprod* 17:1067–71.
- Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B and Liebermann D (1994) Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 9:1791–8.
- Sezgin M, Barlas İÖ, Yıldır S, Türköz G, Ankaralı HÇ, Şahin G and Erdal ME (2013) Apoptosis-related Fas and FasL gene polymorphisms' associations with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int* 33:2039–43.
- Sharp AN, Heazell AEP, Crocker IP and Mor G (2010) Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol* 64:159–169.
- Shudo K, Kinoshita K, Imamura R, Fan H, Hasumoto K, Tanaka M, Nagata S and Suda T (2001) The membrane-bound but not the soluble form of human Fas ligand is responsible for its inflammatory activity. *Eur J Immunol* 31:2504–11.
- Sibley K, Rollinson S, Allan JM, Smith AG, Law GR, Roddam PL, Skibola CF, Smith MT and Morgan GJ (2003) Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 63:4327–30.
- Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G, Wenstrom K, Samuels P, Caritis SN, Sorokin Y, Miodovnik M et al. (2010) Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol* 115:14–20.
- Sipak-Szmigiel O, Cybulski C, Lubiński J and Ronin-Walknowska E (2008) HLA-G polymorphism in a Polish population and reproductive failure. *Tissue Antigens* 71:67–71.
- Smith SC, Baker PN and Symonds EM (1997) Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 177:1395–401.
- Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, Bentley P and Fegan C (2005) Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 23:1514–21.
- Stephens M and Donnelly P (2003) A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162–9.
- Stephens M, Smith NJ and Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–89.
- Stephenson MD and Sierra S (2006) Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement. *Hum Reprod* 21:1076–82.
- Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM and Mor G (2005) The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev* 26:877–97.
- Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T and Nagata S (1997) Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* 186:2045–50.
- Sun T, Miao X, Zhang X, Tan W, Xiong P and Lin D (2004) Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96:1030–6.
- Svendsen SG, Hantash BM, Zhao L, Faber C, Bzorek M, Nissen MH and Hviid TVF (2013) The expression and functional activity of membrane-bound human

- leukocyte antigen-G1 are influenced by the 3'-untranslated region. *Hum Immunol* 74:818–827.
- Svensson L, Arvola M, Sällström MA, Holmdahl R and Mattsson R (2001) The Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are not crucial for the completion of allogeneic pregnancy in mice. *J Reprod Immunol* 51:3–7.
- Sziller I, Nguyen D, Halmos A, Hupuczi P, Papp Z and Witkin SS (2005) An A > G polymorphism at position - 670 in the Fas (TNFRSF6) gene in pregnant women with pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Mol Hum Reprod* 11:207–210.
- Tafuri A, Alferink J, Möller P, Hämmerling GJ and Arnold B (1995) T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* 270:630–3.
- Tan Z, Randall G, Fan J, Camoretti-Mercado B, Brockman-Schneider R, Pan L, Solway J, Gern JE, Lemanske RF, Nicolae D et al. (2007) Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 81:829–34.
- Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ and Makrigiannakis A (2010) Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol* 85:25–32.
- Tripathi P, Abbas A, Naik S and Agrawal S (2004) Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 64:706–10.
- Trowsdale J and Betz AG (2006) Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 7:241–246.
- Tsujimoto Y (1998) Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3:697–707.
- Veit TD and Chies J a B (2009) Tolerance versus immune response - MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol* 20:229–231.
- Veit TD, de Lima CPS, Cavaleiro LC, Callegari-Jacques SM, Brenol C V, Brenol JCT, Xavier RM, da Cunha Sauma MFL, dos Santos EJM and Chies JAB (2014) HLA-G +3142 polymorphism as a susceptibility marker in two rheumatoid arthritis populations in Brazil. *Tissue Antigens* 83:260–6.
- Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F and Glueck CJ (1994) Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 43:647–54.
- Vianna P, Dalmáz C a., Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I and Chies J a B (2007) Immunogenetics of pregnancy: Role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* 68:668–674.
- Wajant H (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296:1635–1636.
- Wang W-J, Hao C-F, Qu Q-L, Wang X, Qiu L-H and Lin Q-D (2010) The deregulation of regulatory T cells on interleukin-17-producing T helper cells in patients with unexplained early recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 25:2591–6.
- Wang X, Jiang W and Zhang D (2013) Association of 14-bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene with unexplained recurrent spontaneous abortion: A meta-analysis. *Tissue Antigens* 81:108–115.
- Wang X, Lin Y, Lan F, Yu Y, Ouyang X, Liu W, Xie F, Wang X and Huang Q (2014) BAX and CDKN1A polymorphisms correlated with clinical outcomes of gastric cancer patients treated with postoperative chemotherapy. *Med Oncol* 31:249.

- Webster WS, Walsh DA, McEwen SE and Lipson AH (1983) Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: implications for the study of the fetal alcohol syndrome. *Teratology* 27:231–43.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L and Mosmann TR (1993) Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 14:353–356.
- 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* 319:189–94.
- Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, Cooke J, Xie F, Cooper GS and Kimberly RP (2003) A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 170:132–8.
- Yan WH, Lin a., Chen XJ, Dai MZ, Gan LH, Zhou MY, Zhu M, Shi WW and Liu JM (2006) Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 68:521–523.
- Yie S, Li L, Xiao R and Librach CL (2008) A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 14:649–53.
- Yıldır S, Sezgin M, Barlas İÖ, Türköz G, Ankaralı HÇ, Şahin G and Erdal ME (2013) Relation of the Fas and FasL gene polymorphisms with susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 33:2637–45.
- Young RL and Korsmeyer SJ (1993) A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol* 13:3686–97.
- Zhang N, Li X, Tao K, Jiang L, Ma T, Yan S, Yuan C, Moran MS, Liang F, Haffty BG et al. (2011) BCL-2 (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC Med Genet* 12:48.
- Zhang Z, Qiu L, Wang M, Tong N, Li J and Zhang Z (2009) The FAS ligand promoter polymorphism, rs763110 (-844C>T), contributes to cancer susceptibility: evidence from 19 case-control studies. *Eur J Hum Genet* 17:1294–303.
- Zhang Z, Wang L-E, Sturgis EM, El-Naggar AK, Hong WK, Amos CI, Spitz MR and Wei Q (2006) Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 12:5596–602.
- Zhu Y, Huo Z, Lai J, Li S, Jiao H, Dang J and Jin C (2009) Case-control study of a HLA-G 14-bp insertion-deletion polymorphism in women with recurrent miscarriages. *Scand J Immunol* 71:52–54.
- Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, O'Connor J and Selevan SG (1996) Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 65:503–9.

## **5. APÊNDICES**

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo dos casos;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo dos controles;
- Questionário utilizado para coleta de dados dos grupos casos e controles.

**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, da qual será extraído o DNA e, possivelmente, células da corrente sanguínea que serão armazenados para as análises dessas alterações que podem estar contribuindo para esse problema. 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 perdas gestacionais recorrentes serão comparados com pacientes que não tiveram essas complicações. 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 as conclusões serão utilizadas para publicações em anais de eventos científicos e revistas científicas.

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
PARA CONTROLES EM PROJETOS DE PESQUISA ENVOLVENDO FATORES  
GENÉTICOS DE RISCO PARA EVENTOS ADVERSOS NA GESTAÇÃO**

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

Estamos realizando um trabalho que visa compreender melhor os mecanismos genéticos que podem ter efeito sobre as perdas gestacionais repetidas. Entre esses estão algumas alterações genéticas que podem modificar o bom funcionamento de uma gestação. Para isso, necessitamos fazer a comparação entre um grupo de mulheres com esse problema com um grupo de mulheres saudáveis, sem histórico de infertilidade e de perdas gestacionais, com no mínimo duas gestações normais e bem sucedidas com filhos saudáveis. Gostaríamos de convidá-la para participar desse estudo como parte do grupo controle.

Para o diagnóstico e estudo dessas alterações é necessária uma amostra de sangue e/ou saliva, da qual será extraído o DNA e, possivelmente, células da corrente sanguínea que serão armazenados para as análises dessas alterações. 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.

A sua participação é importante para que possamos chegar a conclusões que possam aumentar a compreensão dos mecanismos que levam às perdas gestacionais bem como beneficiar às mulheres com esse problema. A sua participação é voluntária 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 as conclusões serão utilizadas para publicações em anais de eventos científicos e revistas científicas. Além disso, você tem o direito de não querer saber o resultado dos seus exames bem como querer participar desse estudo de forma anônima.

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.

Em relação aos benefícios para sua saúde, pode não haver benefícios diretos. O estudo será importante para que possamos entender melhor os mecanismos genéticos das perdas gestacionais recorrentes. Se for de sua vontade, entraremos em contato com você para informar os resultados dos exames caso esses apareçam alterados.

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 às questões a seguir:

▪ Se, durante a minha avaliação, for identificada alguma alteração genética de risco importante para eventos adversos durante a gestação, quero ser comunicada deste resultado.

sim       não

▪ Autoriza o uso do seu material biológico para estudos futuros do nosso grupo que envolvam 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

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

Reg. HCPA	Reg. LGM	Reg. DPN	Reg. Tromb.	Reg. SGM
-----------	----------	----------	-------------	----------

**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 Câncer em familiar de primeiro grau:**

	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
24. Fumo			
25. Álcool			

26. Outras drogas			
27. Medicamentos			
28. Antecedentes de malformação			
29. Grupo étnico			
30. Doença crônica			