

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Imunologia da Gestação: Análise da variante polimórfica CCR5 Δ 32 e o sucesso gestacional

Bianca de Paula Telini

Orientação: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientação: Dra. Priscila Vianna

Porto Alegre

Julho/2014

Bianca de Paula Telini

Imunologia da Gestação: Análise da variante polimórfica CCR5 Δ 32 e o sucesso gestacional

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como um dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da UFRGS, Ênfase Biotecnologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientação: Dra. Priscila Vianna

Porto Alegre

Julho/2014

O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Artur Bogo Chies, ou carinhosamente Zéca, pela oportunidade de realizar essa pesquisa, pelas discussões sadias e pela orientação. Obrigada por dividir sua paixão pela ciência conosco. Vou levá-la como inspiração em minha vida acadêmica.

À Priscila Vianna, por ser essa mãezona, uma profissional maravilhosa e uma pessoa melhor ainda, que me ajudou sempre que foi necessário e me acalmou nos momentos de desespero. Sou muito grata por ter podido trabalhar com você.

À todos os colegas do laboratório de imunogenética pelo ambiente de trabalho tão harmonioso e por todos os cafés compartilhados. Vocês tornaram o desenvolvimento desse trabalho mais leve e prazeroso.

Ao meu tio, Johny, por “salvar a minha vida” disponibilizando seu notebook o tempo que eu precisei (sem pensar duas vezes) para que eu pudesse escrever esse trabalho. Vou devolver o note inteiro, prometo!

À Fefa e à Yo, minhas joanas lindas, por estarem do meu lado desde que eu me lembro. Que vocês permaneçam na minha vida pra sempre e que nós possamos celebrar juntas todas as nossas vitórias.

À minha família, que de perto ou de longe torceu e torce pela minha vitória. Vocês são minha base e eu devo parte do que me tornei à cada um.

À todos os meus amigos, minhas paulistas Lari e Di e aos integrantes do baile da saudade: Vocês fazem a minha vida mais feliz. Obrigada por estarem do meu lado!

Ao meu irmão, Bruno, por me ensinar a exercer a arte da paciência e por todos os bons cafés passados durante esse semestre. É maravilhoso ter um companheiro pra vida toda.

Aos meus pki's queridos, meus companheiros de jornada, meus amigos de coração. Vocês são os responsáveis pelas alegrias dos meus dias. Com vocês o meu caminho foi mais fácil e mais gratificante. Que eu possa tê-los pra sempre do meu lado.

À minha mãe, minha âncora, meu porto seguro. Muito obrigada por afugentar meus medos quando eles surgiram, por acreditar mais em mim do que eu mesma e por me dar sempre a certeza de que eu estava no caminho certo. Obrigada também pelos bolos, pizzas e molhos de cachorro-quente desse ano.

Ao meu pai, por toda ajuda espiritual, financeira e afetiva. Obrigada por ser esse poço de bons conselhos que sempre me auxiliou em tudo que eu precisei e ser o melhor exemplo de força e perseverança que eu tenho na vida.

Ao meu namorado, João Pedro, simplesmente por ser o que ele é. Desde o início da minha jornada universitária esteve presente me apoiando, aguentando os surtos de fim de semestre e comemorando comigo cada uma das minhas vitórias. Agradeço por cada momento de compreensão. Você é essencial na minha vida.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença que acomete mais de 7% de todas as gestações. A PE geralmente se desenvolve na segunda metade da gestação, sendo caracterizada por eventos de disfunção endotelial e inflamação. Há evidências do aumento da inflamação sistêmica durante o primeiro trimestre da gestação em mulheres com PE. Respostas imunológicas inadequadas durante a gestação podem levar a complicações ou até mesmo perdas gestacionais. A perda gestacional é considerada a complicação mais comum na gravidez e é definida como a interrupção espontânea da gestação. A perda de três ou mais gestações consecutivas clinicamente comprovadas em um período inferior a 20 semanas de gestação é tradicionalmente definida como aborto espontâneo recorrente (AER). Diversos componentes do sistema imunológico atuam diretamente no controle da gestação, como as quimiocinas, que são consideradas as principais determinantes de uma resposta inflamatória. Elas podem estar diretamente relacionadas ao desenvolvimento da PE e outras complicações através da exacerbação dos processos inflamatórios. O receptor de quimiocina (CCR5) é uma proteína codificada pelo gene CCR5, e uma variante polimórfica deste receptor, resultante da deleção de 32 pares de bases neste gene, leva a produção de uma isoforma com perda de função e tem sido relacionada a alterações das respostas inflamatórias e doenças auto-imunes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência da variante polimórfica CCR5 Δ 32 em mulheres com e sem essas patologias. Na pré-eclâmpsia, observamos uma frequência maior de portadores do alelo mutante Δ 32 no grupo controle quando comparada ao grupo com PE. Nossas análises apontam o CCR5 Δ 32 como um fator de proteção contra a pré-eclâmpsia, demonstrando que os portadores do alelo Δ 32 apresentam uma menor chance de desenvolver a doença. Quando investigamos o papel desta variante na ocorrência do AER, não observamos diferença estatística nas frequências alélicas e genóticas entre os grupos estudados. Nossos dados estão de acordo com aqueles relacionados à influência étnica que demonstram uma baixa frequência do CCR5 Δ 32 em indivíduos afro-descendentes. Acreditamos que estudos de funcionalidade do receptor CCR5 podem ser úteis para o correto entendimento da fisiopatologia do AER.

Palavras-chave: pré-eclâmpsia, aborto espontâneo recorrente, polimorfismo, CCR5.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a condition that affects more than 7% of all pregnancies. PE usually develops in the second half of pregnancy and is characterized by events of endothelial dysfunction and inflammation. There is evidence of increased systemic inflammation during the first trimester of pregnancy in women with PE. An imbalance in the immunological network during pregnancy can lead to complications or even pregnancy loss. Pregnancy loss is considered the most common complication of pregnancy and is defined as the spontaneous termination of pregnancy. The loss of three or more consecutive pregnancies (before the 20th week of pregnancy) is defined as Recurrent Spontaneous Abortion (RSA). Several components of the immune system act directly in the control of pregnancy, such as chemokines, which are considered major determinants of the inflammatory responses. They may be directly related to the development of PE and other complications through the exacerbation of inflammatory processes. The chemokine receptor (CCR5) is a protein encoded by the CCR5 gene, and a polymorphic variant of this receptor, resulting from deletion of 32 base pairs in this gene leads to the production of an isoform with loss of function and has been linked to changes in inflammatory responses and autoimmune diseases. The objective of this study was to evaluate the frequency of the polymorphic variant CCR5 Δ 32 in women with and without these pathologies. In pre-eclampsia analyses, we found a higher frequency of Δ 32 mutant allele in the control group compared to the group with PE. Our analyses indicate the CCR5 Δ 32 as a protective factor against pre-eclampsia, showing that carriers of the Δ 32 allele have a lower chance of developing this condition. When we investigate the role of this variant in the occurrence of the RSA, we found no statistical difference in allele and genotype frequencies between groups. Our data are consistent with those related to ethnic influences that demonstrate a low frequency of CCR5 Δ 32 in African descent individuals. We believe that studies of the CCR5 receptor functionality may be useful for the correct understanding of the pathophysiology of the AER.

Keywords: preeclampsia, recurrent miscarriage, polymorphism, CCR5.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Aborto Espontâneo Recorrente (AER)	
1.2 Pré-eclâmpsia (PE)	
1.3 Moléculas de sinalização do sistema imune	
2. Capítulo 1: Artigo publicado no periódico Archives of Gynecology and Obstetrics	9
3. Capítulo 2: Artigo a ser submetido ao periódico American Journal of Reproductive Immunology	10
Abstract	1
Introduction	2
Material and Methods	5
Results	5
Discussion	6
Acknowledgements	6
References	6
Table	11
4. DISCUSSÃO GERAL	34
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aborto Espontâneo Recorrente (AER)

O desenvolvimento de uma gestação de sucesso depende de vários fatores genéticos, endócrinos e principalmente da interação entre os sistemas imunológicos maternos e fetais. Um desequilíbrio nas respostas imunológicas durante a gestação pode favorecer o desenvolvimento de complicações gestacionais e em último caso, perdas gestacionais. A perda gestacional ou aborto é considerada a complicação mais comum na gravidez e é definida como a interrupção espontânea da gestação. O aborto recorrente primário é caracterizado por perdas consecutivas na ausência de uma gestação prévia de sucesso. O aborto recorrente secundário se refere a abortos espontâneos que sucedem uma gestação de sucesso (Toth *et al.*, 2010). A perda de três ou mais gestações consecutivas clinicamente comprovadas em um período inferior a 20 semanas de gestação é tradicionalmente definida como aborto espontâneo recorrente (AER) (Toth *et al.*, 2010).

A ocorrência de AER tem consequências importantes, tanto em relação ao impacto psicológico em pacientes afetados, quanto ao custo para o sistema de saúde (Lalioi, 2008). Esta aflitiva condição ocorre principalmente no primeiro trimestre e afeta aproximadamente 3% das mulheres em idade reprodutiva (Carrington *et al.*, 2005). Estima-se que aproximadamente 15% dos casais vivenciam uma perda gestacional clinicamente reconhecida sendo que, 2% vivenciam duas perdas gestacionais. Porém o risco teórico para três ou mais perdas é de apenas 0,34% (Kiwi, 2006). Além disso, é demonstrado que mulheres que possuem um histórico clínico de aborto apresentam o aumento das perdas gestacionais, sendo de até 24% após duas perdas, 30% após três e 40% depois de quatro sucessivas perdas gestacionais (Regan *et al.*, 1989). Na maioria dos casos, dois abortos consecutivos são o suficiente para avaliar o paciente, particularmente aquelas com a idade superior a 35 anos ou que possuem histórico de infertilidade (Regan *et al.*, 1989).

A correta etiologia do AER é desconhecida. Trata-se de uma condição multifatorial, da qual diversas hipóteses têm sido propostas como potenciais mecanismos. Atualmente diversos fatores etiológicos são aceitos e podem ser divididos nos seguintes grupos: fatores anatômicos ou uterinos, infecciosos, endócrinos, hematológicos, imunológicos e genéticos (Kiwi, 2006; Von Steinburg e Schneider, 2009; Ford *et al.*, 2009). É descrito também que a idade materna, fatores psicológicos e fatores ambientais, tais como consumo de álcool, cafeína, cocaína e tabagismo, contribuem para a ocorrência do AER, embora dados precisos de doses tóxicas de exposição sejam difíceis de obter (Rai e Regan, 2006). De fato, depois da avaliação das possíveis causas, aproximadamente metade dos casos de AER não podem ser classificados (Kiwi, 2006; Toth *et al.*, 2010).

Os fatores genéticos são a causa mais comum para a ocorrência de abortos, sendo responsáveis por 50-70% dos casos de abortos espontâneos. Porém, em mulheres com AER, as taxas de anomalias cromossômicas são muito menores, alcançando 2,5 a 8%. De 3-5% dos casais que sofreram AER, um dos parceiros apresenta um rearranjo cromossômico, mais comumente a mãe (Kiwi, 2006; The ESHRE Capri Workshop Group, 2008; Von Steinburg e Schneider, 2009). A expressão diferencial de uma série de genes tem sido sugerida como requisito para a manutenção de uma gestação saudável. Recentemente, estudos têm investigado possíveis genes e seus transcritos associando-os com a patogênese do AER, o que pode ocorrer diante de uma aberrante expressão de diversos tipos de genes e proteínas. Análises transcriptômicas do viló coriônico de pacientes com AER revelaram um aumento na expressão de distintos grupos de genes, principalmente aqueles relacionados à imunossupressão, acoplamento embrionário, angiogênese e em especial genes relacionados a apoptose (Baek *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003).

Com relação aos fatores endócrinos, muitos distúrbios têm sido associados à ocorrência de AER: metabolismo da glicose, hormônios da tireóide e os hormônios sexuais são os principais alvos de estudos. Estima-se que 20-40% das pacientes com AER apresentam síndrome do ovário policístico quando comparadas com 10-20% das mulheres que não tiveram perda gestacional. O tratamento com metformina nessas mulheres parece reduzir os riscos de AER (Kiwi, 2006).

Dentre as alterações imunológicas que ocorrem durante a gravidez, diferentes moléculas, tipos celulares e eventos imunomodulatórios estão envolvidos, regulando a extensa rede de interações imunológicas. A gestação é uma condição fisiológica que pode resultar na sobrevivência de um embrião semi-alogênico que possui 50% de material genético materno e outros 50% de material genético paterno. Desta forma, mecanismos específicos devem agir para modular o sistema imune materno, impedindo que mulheres grávidas rejeitem seus fetos. Adicionalmente, alterações nestes mecanismos podem levar a complicações durante a gravidez (Hviid *et al.*, 2006). Mulheres diagnosticadas com doenças auto-imunes conhecidas, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico, podem apresentar mais dificuldade em manter uma gestação. Abortos recorrentes acontecem em 10-40% das mulheres com essa patologia. Além disso, a ocorrência de AER está associada com vasculopatia da camada decidual. O risco de sofrer uma perda gestacional é maior quando a paciente está com a doença ativa, hipertensão, nefrite ou inadequada ativação do sistema complemento (Kiwi, 2006). Atualmente, gestantes diagnosticadas com doenças auto-imunes são medicadas com aspirina, heparina de baixo peso molecular e corticóides, no intuito de aumentar o sucesso gestacional (Toth *et al.*, 2010). A avaliação imunopatológica do local de implantação da placenta após um aborto espontâneo recorrente muitas vezes revela inflamação decidual, deposição de fibrina e tromboembolismo em vasos deciduais (Kwak *et al.*, 1999). Além disso, existem muitos relatos de que os processos trombóticos e a inflamação desempenham um papel importante no aborto espontâneo (Kwak-Kim *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 1998).

1.2 Pré-eclâmpsia (PE)

A pré-eclâmpsia é uma das complicações mais comuns da gestação e, juntamente com outras desordens hipertensivas gestacionais, é um dos principais contribuintes para a mortalidade materna e fetal em todo o mundo (Steeegers *et al.*, 2010). Sua etiologia não está totalmente elucidada, e afeta 5-10% de todas as gestações no mundo. No Brasil, esta doença é responsável por mais de 7% da mortalidade materno-fetal e a compreensão de tal fenômeno é de grande

importância para o entendimento dos mecanismos imunológicos envolvidos no período gestacional (Kanasaki & Kalluri, 2009).

A PE é caracterizada, dentre outros sintomas, pela ocorrência de hipertensão (pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg), edema e proteinúria significativa (≥ 300 mg em 24 horas) (Steeegers *et al.*, 2010; Vianna P *et al.*, 2011). Além da pressão arterial elevada, outros critérios são utilizados para classificar a gravidade da PE, tais como: perda progressiva da função renal [oligúria (< 400 mL/24h) aumento da creatinina sérica ($> 1,2$ mg/dl)], disfunção hepática, sinais de hemólise microangiopática e plaquetopenia (< 100.000 células/mm³) (Freitas *et al.*, 2006). A PE tipicamente se desenvolve na segunda metade da gestação e é caracterizada por eventos de disfunção endotelial e inflamação. Há evidência do aumento da inflamação sistêmica no primeiro trimestre de gestação em mulheres com pré-eclâmpsia. Mulheres com histórico de pré-eclâmpsia apresentam maior chance de reincidência no futuro, especialmente se a doença desenvolveu-se prematuramente no período de gestação (Young *et al.*, 2010). Por razões desconhecidas, também ocorre um aumento da incidência em mulheres primíparas (Trogstad *et al.*, 2011). Gestantes afrodescendentes apresentam o dobro da incidência da doença relacionada a mulheres com ascendência européia (Sibai *et al.*, 2005).

Um dos mecanismos fisiopatológicos da PE é a dificuldade em fornecer um suprimento sanguíneo adequado para a placenta, levando ao estresse oxidativo placentário e à liberação excessiva de fatores placentários na circulação materna. Esses eventos desencadeiam uma resposta inflamatória e levam à disfunção endotelial. A invasão trofoblástica inadequada leva à remodelação incompleta das artérias uterinas espiraladas, e esta é a principal causa de isquemia placentária, que é considerado um dos caminhos para o desenvolvimento da PE (LaMarca *et al.*, 2007; Gilbert *et al.*, 2008). Apesar de os fatores etiológicos desta doença ainda não estejam completamente esclarecidos, acredita-se no envolvimento de fatores genéticos, imunológicos e angiogênicos (Bdolah *et al.*, 2005). Uma pesquisa realizada no ano de 2004 com o objetivo de relatar a incidência de morte materna nas principais capitais brasileiras apontou que, somente as doenças hipertensivas específicas da gestação (eclâmpsia e pré-eclâmpsia) foram responsáveis por 37%

de todas as mortes obstétricas diretas (Gotlieb *et al.*, 2004). No estado do Rio Grande do Sul um estudo retrospectivo de 20 anos realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, correlacionou 18,5% das mortes obstétricas diretas com doenças hipertensivas (Freitas *et al.*, 2006). A demonstração da produção alterada de citocinas e a ativação exacerbada de neutrófilos em mulheres com pré-eclâmpsia apoia a hipótese de que a pré-eclâmpsia surge a partir de uma resposta inflamatória generalizada materna (Steegers *et al.*, 2010), apontando a importância do sistema imunológico no desenvolvimento da PE.

Estudos observacionais em humanos e estudos experimentais em animais fornecem fortes evidências de que anormalidades em fatores angiogênicos circulantes desempenham um papel patogênico na pré-eclâmpsia. Dentre os fatores mais estudados, está a proteína anti-angiogênica tirosinoquinase 1 semelhante ao fms solúvel sFlt1. A sFlt-1 é uma proteína antiangiogênica circulante, que atua por meio da aderência aos domínios de ligação dos receptores do fator de crescimento placentário (FCP) e do fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV), impedindo desta forma a interação com os receptores da superfície da célula endotelial e gerando disfunção no endotélio. Durante a gestação normal, os níveis da sFlt-1 permanecem baixos até o final do segundo semestre, enquanto as concentrações do FCP são elevadas, gerando consequentemente um estado pró-angiogênico. À medida que a gestação avança, os níveis da sFlt-1 aumentam gradativamente e o equilíbrio é desviado no sentido da atenuação do crescimento placentário (Pré-eclâmpsia: Etiologia e Prática Clínica, por Fiona Lyall, Michael Belfort).

Alguns autores sugerem que o FCEV desempenha um importante papel na patogênica da pré-eclâmpsia. Os primeiros estudos sugeriram que os níveis séricos do FCEV estavam elevados na pré-eclâmpsia e indicaram sua participação na ativação das células endoteliais (Baker *et al.*, 1995). Mais recentemente, estudos mostraram que a expressão tanto do FCEV quanto do FCEVR estava hiporregulada na pré-eclâmpsia grave (Lyall *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2002). Isso sugere um distúrbio do desenvolvimento vascular da placenta e reforça a hipótese de que o

sistema FCEV desempenha uma importante função reguladora no processo de invasão trofoblástica (Karumanchi *et al.*, 2014).

Os níveis de sFlt-1 aumentam no soro das mulheres em pré-eclâmpsia (Koga *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2003; Tsatsaris *et al.*, 2003) à medida que as concentrações do FCP e FCEV livres circulantes diminuem, mesmo antes do início da síndrome clínica (Polliotti *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003). Com a administração da sFlt-1 exógena em ratas prenhes, produz-se um estado semelhante à pré-eclâmpsia, com hipertensão, proteinúria e endoteliose glomerular (Maynard *et al.*, 2003). Desse modo, o excesso de sFlt-1 pode realmente desempenhar um importante papel na patogenia da pré-eclâmpsia.

Em um estudo de corte transversal, os autores demonstraram que os níveis da sFlt-1 aumentavam cerca de 5 semanas antes da pré-eclâmpsia (Levine *et al.*, 2004). Nas mulheres que depois desenvolveram pré-eclâmpsia de início precoce, havia variações mais amplas dos níveis da sFlt-1 e do FCP, reforçando a participação da angiogênese placentária anormal na etiologia da PE.

Durante a gestação, uma outra proteína antiangiogênica, endoglina solúvel (um co-receptor dos fatores $\beta 1$ e $\beta 2$, transformadores do crescimento), é liberada pela placenta na circulação materna. Os níveis circulantes da endoglina solúvel aumentam 2 a 3 meses antes do início da PE (Levine *et al.*, 2006). Essa elevação da concentração da endoglina solúvel geralmente é acompanhada de um aumento da relação entre sFlt-1:FCP. Considerados em conjunto, os níveis crescentes desses dois indicadores são muito sugestivos do desenvolvimento subsequente da PE (Levine *et al.*, 2006; Karumanchi *et al.*, 2014).

1.3 Moléculas de sinalização do sistema imune

Os componentes do sistema imunológico participam ativamente da regulação da gestação. Dentre estes componentes, as citocinas são um grupo diverso de proteínas que atuam como mediadoras entre células. As citocinas estão envolvidas em diversos processos celulares, tais como os relacionados com a imunidade e inflamação, incluindo a imunidade inata, o recrutamento celular e ativação e expressão de moléculas de adesão (Steinke *et al.*, 2006). Além disso, elas estão

envolvidas no controle de respostas imunológicas relacionadas com a tolerância do feto semi-alógeno durante a gestação (Agachan *et al.*, 2010).

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são um grupo específico de citocinas que estão envolvidas no direcionamento celular. As quimiocinas são consideradas os principais determinantes da resposta inflamatória e sua ação se dá através da ligação aos receptores de quimiocinas (CCR). Os CCR são moléculas que apresentam sete domínios transmembrana, que se ligam à proteína G para transdução de sinal e são considerados como os principais determinantes da resposta inflamatória precoce (Steinke *et al.*, 2006) (**Figura 1**). As regiões dos receptores localizadas no exterior da célula se ligam às quimiocinas e as regiões localizadas no interior celular acoplam toda a maquinaria sinalizadora necessária para induzir a resposta celular.

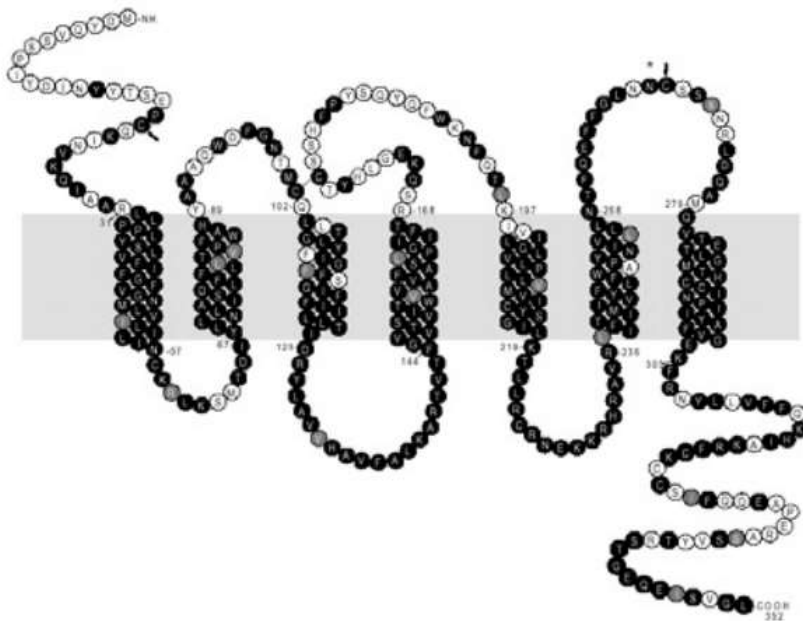


Figura 1 - estrutura e sequência de aminoácidos da molécula CCR5, com os sete domínios transmembrana, três alças intracelulares e três alças extracelulares (McNicholl *et al.*, 1997).

O CCR5 é um membro da classe de receptores de quimiocina CC, presente principalmente nas células do sistema imunológico, tais como os macrófagos e linfócitos T. Este receptor desempenha um papel importante na migração dessas células para os locais de inflamação. Tem sido mostrado que as quimiocinas

desempenham um papel chave na regulação de respostas imunes importantes na patogênese das doenças autoimunes e hipersensibilidade (Steinke *et al.*, 2006). O gene que codifica o CCR5 (CKR5) está localizado na região p21.3 do cromossomo humano 3 , formando um conjunto com outros genes dos receptores de quimiocinas (Vargas *et al.*, 2006). O CCR5 Δ 32 (rs333) é uma variante alélica cuja deleção de 32 pares de base na região codificadora do gene resulta em uma proteína truncada que não vai para a superfície celular (Liu *et al.*, 1996). A deleção pode ser identificada facilmente através de PCR convencional e visualização em gel de agarose (**Figura 2**). Inicialmente descrito como um co-receptor para a infecção do vírus HIV-1, esta variante já foi associada a várias condições inflamatórias (ver Vargas *et al.*, para uma revisão).

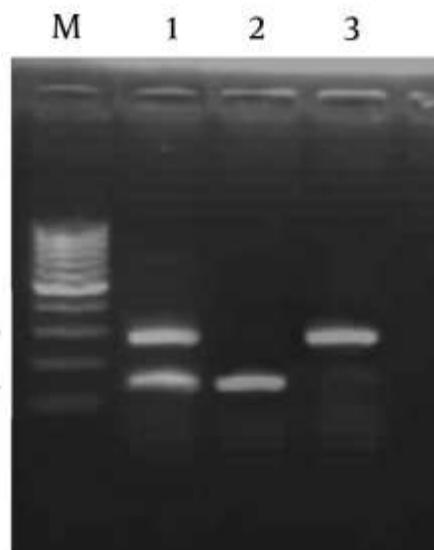


Figura 2 - eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados de CCR5. Os produtos do PCR foram revelados em gel de agarose 3%. Linha 1 representa o fragmento heterozigoto CCR5/ Δ 32; linha 2, o homozigoto mutante Δ 32/ Δ 32 com a deleção de 32 pares de bases e na linha 3, o homozigoto CCR5/CCR5. O M indica o marcador molecular de 100 pares de bases.

Indivíduos homozigotos para o alelo CCR5 Δ 32 não conseguem expressar uma proteína funcional e, como resultado, ela não é expressa na membrana celular.

Heterozigotos para este alelo expressam menos moléculas receptoras funcionais que o homozigoto do tipo selvagem (Wegmann et al., 1993).

Cerca de 20% dos europeus ocidentais carregam esta mutação, o que é raro ou ausente em outros grupos étnicos (Stephens, *et al.*, 1998; Majumder and Dey, 2001). Isto sugere que a mutação CCR5 Δ 32 foi fortemente selecionada durante a história da Europa. Alguns pesquisadores propuseram que as epidemias de peste negra que varreram a Europa durante a Idade Média foram as responsáveis. No entanto, experiências recentes em ratos sugerem que a *Yersinia pestis*, a causadora da praga, pode infectar as células de mamíferos através de outros meios (Elvin, *et al.*, 2004; Mecsas, *et al.*, 2004; Galvani, A. P. and Slatkin, M., 2003). Desta forma, alguns cientistas propuseram que a varíola, que é causada pelo vírus da varíola, teria sido o agente de seleção que historicamente levou à proliferação de portadores da mutação CCR5 Δ 32 na Europa (Galvani, A. P. and Slatkin, M., 2003). Esta mutação genética mostra traços geográficos fortes: enquanto supostamente ausente entre africanos, ameríndios e asiáticos do leste, encontra-se em até 18% em certas populações do norte da Eurásia (Novembre J *et al.*, 2005).

Nosso estudo propõe a caracterização imunogenética de mulheres com AER e PE através da análise de uma variante do receptor de quimiocina CCR5 que está potencialmente envolvido nas respostas imunológicas durante a gestação.

**Capítulo 1: Artigo publicado no periódico Archives of Gynecology and
Obstetrics**

**The CCR5 Δ 32 polymorphism as a pre-eclampsia susceptibility marker: an
evaluation in Brazilian women**

Bianca Telini, Tiago Degani Veit, José Artur B. Chies, Priscila Vianna

The CCR5 Δ 32 polymorphism as a pre-eclampsia susceptibility marker: an evaluation in Brazilian women

Bianca Telini · Tiago Degani Veit · José Artur B. Chies · Priscila Vianna

Received: 26 February 2014 / Accepted: 1 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Dear Sir,

We read with interest the manuscript by Gurdol et al. [1] that suggested a protective effect of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant of the CCR5 gene in inflammation associated to pre-eclampsia (PE) in Turkish women. The CCR5 Δ 32 allelic variant was observed in a lower frequency among pre-eclamptic women as compared to controls, and therefore the authors suggested that its presence conferred protection against this disease. As it is well-established, chemokines are chemotactic cytokines involved in several cellular processes including innate immunity, cellular recruitment, cell activation, induction of adhesion molecules expression and inflammation [2]. Chemokine receptors (CCR) are members of the G protein-coupled receptors and present seven transmembrane domains, being considered as important determinants of early inflammatory responses [2]. Different works already evaluated the association of CCR genes polymorphisms as well as cytokine levels and the inflammatory state and pathogenesis of pre-eclampsia [3, 4]. CCR5 is a member of the CC chemokine receptors mainly expressed in immune system cells, such as macrophages and T lymphocytes. CCR5 plays an important role in migration of immune cells to inflammatory sites. It has been shown that chemokines are essential for the regulation of immune responses, being crucial in pathogenesis of both autoimmune and hypersensitivity-based diseases [2]. The gene encoding CCR5 (*CCR5*) is located on the p21.3 region of the human chromosome 3, forming

a cluster with other chemokine receptor genes [5]. The CCR5 Δ 32 (rs333) is an allelic variant of which 32 bp were deleted in the coding region resulting in a nonfunctional receptor. First described as a co-receptor for HIV-1 virus infection, this variant was also associated to several inflammatory conditions (see Vargas et al. for a review). Homozygous individuals for CCR5 Δ 32 do not express a functional protein, while heterozygous may express low amounts of the functional receptor when compared to the wild-type homozygous individuals.

Pre-eclampsia, for instance, is one of the most common pregnancy complications and along with other hypertensive disorders, is a major contributor to maternal mortality worldwide [6]. Despite its severity, the etiology of PE is not fully elucidated, affecting 5–10 % of all pregnancies globally. In Brazil, this disease accounts for more than 7 % of maternal–fetal mortality. Thus, the understanding of such phenomenon is of great importance to elucidate the immunological mechanisms involved during the gestational period. PE is characterized, among others symptoms, by the occurrence of hypertension (diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg), edema and substantial proteinuria (≥ 300 mg in 24 h) at or after 20 weeks of gestation [6, 7]. Furthermore, PE is characterized by events of endothelial dysfunction and excessive inflammation, mainly in the first trimester of pregnancy [6]. One of the pathophysiological mechanisms of PE is a failure to develop an adequate blood supply to the placenta, leading to placental oxidative stress and excessive release of placental factors in maternal circulation. In addition, an inadequate trophoblast invasion results in an incomplete remodeling of uterine spiral arteries, being the main cause of placental ischemia in PE [8, 9]. It is known that genetic factors play a role in pre-eclampsia. Also, an immune unbalance in pre-eclampsia has been reported. Altered cytokine production and marked

B. Telini · T. D. Veit · J. A. B. Chies · P. 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
e-mail: privianna@gmail.com

Table 1 CCR5 genotype frequencies in pre-eclamptic and control groups, considering CCR5 Δ 32 carriers

Genotypes	Pre-eclampsia (n) (freq)	Control (n) (freq)	P value
CCR5/CCR5	144 (0.93)	124 (0.86)	0.047
CCR5/ Δ 32 and Δ 32/ Δ 32	11 (0.07) ^a	20 (0.14) ^a	
Number of individuals	155	144	

Chi-square test was used to compare the CCR5 genotype frequencies between pre-eclamptic and control groups

^a Pearson $\chi^2 = 3.76$; $df = 1$

neutrophil activation in pre-eclamptic women supports the hypothesis that pre-eclampsia arises from an exacerbated maternal inflammatory response [6].

In the present work, we assessed the frequency of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant in Brazilian women who developed, or not, PE. We genotyped a total of 299 pregnant women, of which 155 developed PE. The presence of the mutant delta 32 allele was evaluated by PCR amplification. Concerning the Brazilian population, one of the most interesting characteristics of this group is its heterogeneity and high levels of miscegenation. Emigration of individuals from different countries and continents with diverse ethnic backgrounds has contributed to the establishment of the genetic pool presented in the contemporary Brazilian population [5]. We observed that the control group presented a higher frequency of carriers of the Δ 32 allele when compared to pre-eclamptic women (0.14 versus 0.07, $P = 0.047$) (Table 1). Multiple binary logistic regression analysis was used to calculate the effects of the investigated polymorphism, ethnicity, age, hypertension and weight on PE development. Our analysis identified CCR Δ 32 as a factor of protection against PE. Carriers of the Δ 32 allele presented a lower chance of developing pre-eclampsia (OR 0.342, 95 % CI 0.119–0.984, $P = 0.047$). We also observed that Brazilian women who developed hypertension presented a high risk of developing PE (OR 8.696, 95 % CI 3.330–22.706, $P < 0.001$) (Table 2).

As previously stated, the studies of Gurdol et al. also approached the role of the CCR5 Δ 32 polymorphism in the pathogenesis of pre-eclampsia. The authors compared 74 pre-eclamptic subjects and 128 healthy controls to evaluate the frequency of the Δ 32 allele. As a result, they observed that the polymorphic variant CCR5 Δ 32 was less common in pre-eclamptic women as compared to controls, and its presence appeared to confer protection against this disease. Our findings are in accordance to the data obtained by Gurdol et al., reinforcing the suggestion that there is a possible protective effect of the polymorphic variant CCR5 Δ 32 against pre-eclampsia, even despite the ethnic differences among the studied groups. We hypothesized that immune cells expressing the truncated CCR5 receptor

Table 2 Multiple binary logistic regression for the effect of the presence of the CCR5 Δ 32 allele and demographic characteristics in the development of pre-eclampsia

Variables	B (SE) ^c	Odds ratio (CI 95 %)
Carrier of CCR5 Δ 32	−1.073 (0.539)	0.342 (0.119–0.984) ^a
Ethnicity	0.486 (0.318)	1.626 (0.873–3.031)
Age	0.007 (0.020)	1.007 (0.968–1.047)
Systemic venous hypertension	2.163 (0.490)	8.696 (3.330–22.706) ^b
Weight	0.430 (0.324)	1.537 (0.815–2.90)

The preeclampsia sample was coded as 1 and the control sample as 0 (reference category)

PE group $n = 155$; control group $n = 144$

Statistical significant values: ^a $P = 0.047$ and ^b $P < 0.001$

^c B = Beta coefficient shows which of the independent variables (CCR5 Δ 32 carriage, ethnicity, age, hypertension and weight) have an effect on pre-eclampsia development (dependent variable)

cannot properly migrate to the maternal–fetal interface, therefore do not favoring an exacerbated inflammatory response. It is important to point out that exacerbated inflammatory responses were already associated to failure in embryo implantation and even to fetus rejection. In this way, the immune modulation of pregnancy could be regulated through to a more tolerant state, impairing the establishment of the pathological inflammatory profile characteristic of pre-eclampsia. In conclusion, our data reinforce the important role of CCR5 gene polymorphisms in the development of pre-eclampsia, and suggest that this effect occurs independently of the ethnic background. Moreover, the evaluation of genetic variants involved in the development of inflammatory responses, in distinct human populations, could help in the understanding of the factors associated to pre-eclampsia.

Acknowledgments The present work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Conflict of interest All authors state no conflict of interest.

References

- Gurdol F, Yurdum LM, Ozturk U, Isbilen E, Cakmakoglu B (2012) Association of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphisms with preeclampsia in Turkish women. Arch Gynecol Obstet 286(1):51–54
- Steinke JW, Borish L (2006) Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol 117(2 Suppl Mini-Primer):S441–S445
- Agachan B, Attar R, Isbilen E, Aydogan HY, Sozen S, Gurdol F, Isbir T (2010) Association of monocyte chemoattractant protein-1 and CC chemokine receptor 2 gene variants with preeclampsia. J Interferon Cytokine Res 30(9):673–676
- Ghorban K, Dadmanesh M, Hassanshahi G, Momeni M, Zare-Bidaki M, Arababadi MK, Kennedy D (2013) Is the CCR5 Δ

- 32 mutation associated with immune system-related diseases? *Inflammation* 36(3):633–642
5. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA (2006) Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39(3):321–325
 6. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. *Lancet* 376(9741):631–644
 7. Vianna P, Bauer ME, Dornfeld D, Chies JA (2011) Distress conditions during pregnancy may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Med Hypotheses* 77(2):188–191
 8. LaMarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS, Murphy SR, Granger JP (2007) Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 9(6):480–485
 9. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedek M, Murphy SR, Granger JP (2008) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(2):H541–H550

**Capítulo 2: Artigo a ser submetido ao periódico American Journal of
Reproductive Immunology**

**Chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism in recurrent spontaneous
abortion**

Bianca Telini, José Artur B. Chies, Priscila Vianna

1 Title: **Chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphism in recurrent spontaneous**
2 **abortion**

3 Authors: Bianca Telini^a, José Artur Bogo Chies^a, Priscila Vianna^a

4 Affiliations:

5 ^aDepartament of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio
6 Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

7 Corresponding author:

8 Priscila Vianna, PhD

9 Immunogenetics laboratory. Biosciences Institute, Department of Genetics.

10 Bento Gonçalves avenue - 9500, Campus do Vale. CEP 91501970, postcode:
11 15053.

12 Fone: +55 51 3316 6740; Fax: +55 51 3316 7311. Porto Alegre, RS – Brazil.

13 Email address: privianna@gmail.com_(Vianna, P)

14
15 **Abstract**

16 An imbalance in the immunological network during pregnancy could lead to
17 complications or even pregnancy loss. Recurrent Spontaneous Abortion (RSA) is
18 defined as the loss of three or more pregnancies (before the 20th week of pregnancy)
19 without the occurrence of a successful gestation in the same period. Pregnancy loss
20 occurs mainly in the first quarter of pregnancy, affecting approximately 3% of women
21 at reproductive age. Different immune modulators are engaged in the maintenance of
22 the semi-allogeneic fetus during pregnancy Among them is the cell recruitment to
23 inflammation sites by chemokines and its receptors. An exacerbated inflammatory
24 profile during pregnancy could be dangerous. In the present work, we evaluated the
25 frequency of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant and its potential relationship with
26 RSA. We assessed the frequency of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant in 284
27 Brazilian pregnant women, of which 126 developed recurrent spontaneous abortion
28 (RSA). The genotypic and allelic frequencies did not deviate from Hardy-Weinberg
29 expectations. Regarding genotypic frequencies, no statistical difference was
30 observed between control and RSA groups (genotypic frequencies of 0.90, 0.08 and

31 0.007 for women with RSA and 0.85, 0.13 and 0.01 for women without RSA,
32 respectively for CCR5/CCR5, CCR5/ Δ 32 and Δ 32/ Δ 32 genotypes. Evaluating the
33 allelic frequency of the CCR5 Δ 32 allele, no statistical difference was observed
34 between the studied groups (0.05 in RSA patients versus 0.07 in control subjects).
35 Homozygous for the Δ 32 allele were found only among euro-descendants
36 individuals. We suggest that the CCR5 Δ 32 polymorphic variant does not influence
37 the occurrence of pregnancy loss. However, considering the multifactorial causes of
38 RSA, we do not rule out the importance of CCR5 Δ 32 polymorphic variant in the
39 occurrence of recurrent abortion. We believe that studies of the CCR5 receptor
40 functionality may be useful for understanding the development of this pathology.
41 Further investigations of this variant in a larger population sample would be of great
42 value.

43 **Introduction**

44 The development of a successful pregnancy depends on several factors related to
45 the interaction between the maternal/fetal immune systems. An imbalance in the
46 immunological network during pregnancy can lead to complications or even
47 pregnancy loss. Pregnancy loss is considered the most common complication of
48 pregnancy and is defined as the spontaneous termination of pregnancy. Primary
49 recurrent miscarriage is characterized by consecutive losses without previous
50 pregnancy successfully completed. Secondary recurrent miscarriage refers to
51 miscarriages that occur after a successful pregnancy (Toth *et al.*, 2010). The loss of
52 three or more continuous pregnancies (before the 20th week of pregnancy) is defined
53 as Recurrent Spontaneous Abortion (RSA). This condition occurs mainly in the first
54 quarter of pregnancy, affecting approximately 3% of women at reproductive age
55 (Carrington *et al.*, 2005). It is estimated that almost 15% of couples experience a
56 clinically recognized pregnancy loss, while 2% experience two pregnancy losses,
57 being the theoretical risk for three or more losses of only 0.34% (Kiwi, 2006).
58 Furthermore, it is demonstrated that women with a history of clinical abortion present
59 increased indexes of pregnancy loss, reaching up to 24% after two losses, 30% after
60 three and 40% after four successive pregnancy losses (Regan *et al.*, 1989).
61 Nowadays, two consecutive abortions are sufficient to classify the patient in a RSA

62 group, particularly those with more than 35 years old and who have a history of
63 infertility.

64 RSA is a multifactorial condition although its etiology is unknown. Several
65 mechanisms are proposed as potential causes of RSA. Currently some etiologic
66 factors are described as being involved in RSA: anatomical or uterine factors,
67 infectious factors, endocrine, haematological, immunological and genetic variants
68 (Kiwi, 2006; von Steinburg and Schneider, 2009; Ford *et al.*, 2009.). Despite the
69 above cited factors, maternal age, psychological state, alcohol and/or caffeine
70 consumption, the use of cocaine and smoking habits contribute to the occurrence of
71 the RSA. However, precise data on doses of toxic exposure are difficult to obtain (Rai
72 and Regan, 2006). In fact, after assessing the possible causes of RSA,
73 approximately half of the cases remain still unclassified (Kiwi, 2006; Toth *et al.*,
74 2010). With the advancement of genomic medicine, several genes whose expression
75 is required for the maintenance of a healthy pregnancy have been identified. In
76 addition, recent studies have highlighted the role of certain genes, as well as the role
77 of its transcripts, in the pathogenesis of RSA (Giannubilo *et al.*, 2012; Toth *et al.*,
78 2010; Rai *et al.*, 2006). Transcriptomic analysis of chorionic villi from patients with
79 RSA demonstrated an increased expression of distinct sets of genes related to
80 immunosuppression, embryonic engagement, angiogenesis and apoptosis (Baek *et*
81 *al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003).

82 Different immune modulators are engaged in the maintenance of the semi-
83 allogeneic fetus during pregnancy (Agachan *et al.*, 2010). Among them, cytokines act
84 in diverse cellular processes and play a role in inflammation control during innate
85 immunity, cell recruitment, activation, and expression of adhesion molecules
86 (Wegmann *et al.*, 1993, Steinke *et al.*, 2006). Specific groups of chemotactic
87 cytokines, called chemokines, are involved in cell recruitment to inflammation sites.
88 Chemokines are considered major determinants of the inflammatory responses by
89 binding to “chemokine receptors” (CCR). These receptors are molecules with seven
90 transmembrane domains, considered the main determinants of the early
91 inflammatory response (Steinke *et al.*, 2006). The chemokine receptor five (CCR5) is
92 a member of the CC chemokine receptors and is present in immune cells such as
93 macrophages and T lymphocytes. CCR5 coordinates the migration of these cells to

94 inflammatory sites. Chemokines also play a role in the regulation of immune
95 responses, in the pathogenesis of autoimmune diseases and hypersensitivity
96 (Steinke *et al.*, 2006). The gene encoding the CCR5 (*CCR5*) is located in the p21.3
97 region of the human chromosome 3. The CCR5 Δ 32 (rs333) is an allelic variant
98 presenting a 32 base pair deletion in the coding region of the CCR5 gene. This 32
99 base pair deletion results in a truncated protein unable to perform the role of a
100 chemokine receptor. Initially described as a natural genetic protection factor against
101 HIV-1 infection, this polymorphic variant has been associated with several
102 inflammatory conditions (see Vargas *et al.*, for a review). A previous study from our
103 group suggested that this allelic variant plays an important role in the development of
104 preeclampsia (Telini *et al.*, 2014). It is important to point out that although CCR5 Δ 32
105 homozygous individuals do not express a functional protein at the cell surface,
106 consequently leading to a lack of this receptor, heterozygous individuals maintain
107 gene expression, but present lower levels of the molecule at the cell surface as
108 compared to wild-type homozygous individuals.

109 Women with a history of RSA exhibit high levels of psychological stress, fear and
110 anxiety related to pregnancy. These distress conditions during pregnancy seem to
111 favor the occurrence of complications at birth. Our group have previously alerted for
112 the risk of distress conditions and pregnancy complications (Vianna *et al.*, 2011).
113 Furthermore, depression was strictly associated with high indexes of spontaneous
114 abortions (Sugiura- Ogasawara *et al.*, 2002; Fertl *et al.*, 2009). To date, despite
115 therapeutic interventions currently offered, the RSA rate does not lower from 2% (von
116 Steinburg and Schneider, 2009). Immunological unbalance is one of the most
117 accepted causes of RSA, although most of the theories involving the immunological
118 system have not fulfilled the criteria for causality. Existing data regarding the impact
119 of immunological compounds in RSA development are still limited and controversial.
120 Some studies highlight the exacerbation of inflammation in the last stages of
121 pregnancy. A persistent and uncontrolled inflammatory response during pregnancy
122 can impair the development of the placenta, also affecting maternal health (Kwak-
123 Kim *et al.*, 2009). Theories developed so far do not provide us enough information to
124 explain the complex network of immune interactions around the placenta. Thus, it is
125 of great importance to understand the immunological features of RSA. In the present

126 work, we evaluated the frequency of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant and its
127 potential relationship with RSA.

128

129 **Materials and Methods**

130 We assessed the frequency of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant in 284
131 Brazilian pregnant women, 126 of which who developed recurrent spontaneous
132 abortion (RSA). CCR5 genotyping was performed by PCR using specific primers
133 (CCR5a 5'-GGTCTTCATTACACCTGC-3' and CCR5b 5'-
134 AGGATTCCCGAGTAGCAGATG-3') under the following conditions: 1 μ l of DNA (0.2-
135 0.5 μ g), 2.5 μ l of 10X buffer containing 30 mM MgCl₂, 0.2 μ l Taq DNA polymerase
136 (CENBIOT 5 U/ μ l), and 10 mM dNTP and 10 pmol of each primer (total reaction
137 volume 25 μ l). Each sample was subjected to 40 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at
138 60°C and 1 min at 72°C. The PCR product was subjected to electrophoresis on a 3%
139 agarose gel containing ethidium bromide and was visualized by UV irradiation
140 (described in Chies & Hutz, 2003). Amplification of the wild type allele generates a
141 137-bp fragment while the CCR5 Δ 32 allele generates a 105-bp fragment.

142

143 **Results**

144

145 The genotypic and allelic frequencies did not deviate from Hardy-Weinberg
146 expectations. Regarding genotypic frequencies, no statistical difference was
147 observed between control and RSA groups (genotypic frequencies of 0.90, 0.08 and
148 0.007 for women with RSA and 0.85, 0.13 and 0.01 for women without RSA,
149 respectively for CCR5/CCR5, CCR5/ Δ 32 and Δ 32/ Δ 32 genotypes – Table 1).
150 Evaluating the allelic frequency of CCR5 Δ 32, no statistical difference was observed
151 between the studied groups (0.05 in RSA patients versus 0.07 in control subjects).
152 Homozygous for the Δ 32 allele were found only among euro-descendants
153 individuals. Our data are in accordance with those reported in literature that
154 demonstrated a low frequency of the Δ 32 allele in afro-derived subjects.

155

156 Discussion

157 Here we evaluated the frequency of the CCR5 Δ 32 polymorphic variant and its
158 potential relationship with RSA in Brazilian women. Considering the lack of difference
159 between the studied groups, our data do not support a role for the CCR5 Δ 32
160 polymorphic variant in the occurrence of pregnancy loss.

161 Our group and others have already demonstrated the importance of the
162 CCR5 Δ 32 on pregnancy complications such as preeclampsia. The polymorphic
163 variant CCR5 Δ 32 was less common in preeclamptic women as compared to controls
164 and its presence appeared to confer protection against this disease (Telini *et al.*,
165 2014; Gurdol *et al.*, 2013). In this sense, the evaluation of genetic variants involved in
166 the regulation of inflammatory responses in different human populations can help in
167 the understanding of pregnancy complications, such as RSA. Giannubilo *et al.*,
168 (2012) by analyzing the expression of inflammatory cytokines in women with
169 recurrent spontaneous abortion, identified an abnormal pattern of inflammatory
170 cytokines in the maternal-fetal interface of these patients. There is a continuing
171 interest in elucidating the modulatory role of cytokines during pregnancy as well as its
172 receptors action. For this, it is of great importance the understanding of the genetic
173 alterations that regulate these inflammatory compounds. In addition, many
174 autoimmune conditions seem to be associated with RSA. The presence of maternal
175 systemic inflammatory conditions, such as active subclinical or autoimmune diseases
176 and metabolic disorders can interfere with the cytokine balance during the early
177 pregnancy. Consequently, a chronic inflammatory state could be induced at the site
178 of implantation, resulting in pregnancy loss or implantation failure (Kwak-Kim *et al.*,
179 2009). RSA has multiple etiologies and more than half of identified cases remain
180 unexplained. Women with RSA often demonstrate common exacerbated
181 inflammatory immune responses involving both innate and adaptive systems.

182 Considering the multifactorial causes of RSA, we do not rule out the importance
183 of CCR5 Δ 32 polymorphic variant in the occurrence of recurrent abortion. We believe
184 that studies of the CCR5 receptor functionality may be useful for understanding the
185 development of this pathology. One of the most interesting characteristics of our
186 study group is the heterogeneity and high degree of miscegenation of the Brazilian

187 population. The immigration of individuals from different countries and continents with
188 different ethnic backgrounds contributed to the establishment of the genetic pool
189 present in the Brazilian population (Vargas *et al.*, 2006). Therefore, further
190 investigations of this variant in a larger sample and in individuals from different
191 human groups, with distinct ethnic backgrounds, would be of great value.

192

193 **Acknowledgements**

194 The present work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
195 Científico e tecnológico).

196 **Conflict of interest**

197 All authors state no conflict of interest.

198 **References**

- 199 Baek KH, Choi BC, Lee JH, Choi HK, Lee SH, Kim JW, Hill JA, Chung HM, Ko JJ,
200 Cha KY: Comparison of gene expression at the feto-maternal interface
201 between normal and recurrent pregnancy loss patients. *Reprod Fertil*
202 *Dev* 2002;**14**:235-240.
- 203 Carrington B, Sacks G, Regan L: Recurrent miscarriage: pathophysiology and
204 outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*2005;**17**:591-597.
- 205 Chies JA, Hutz MH: High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals
206 from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol*
207 *Res* 2003;**36**:71-75.
- 208 Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH: Expression of
209 angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from
210 recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 2003;**66**:24-31.
- 211 Elvin SJ, Williamson ED: Stat 4 but not Stat 6 mediated immune mechanisms are
212 essential in protection against plague. *Microb Pathog* 2004;**37**:177-184.

- 213 Elvin SJ, Williamson ED, Scott JC, Smith JN, Pérez De Lema G, Chilla S, Clapham
214 P, Pfeffer K, Schlöndorff D, Luckow B: Evolutionary genetics: Ambiguous role
215 of CCR5 in *Y. pestis* infection. *Nature* 2004;**430**:417.
- 216 Fertl KI, Bergner A, Beyer R, Klapp BF, Rauchfuss M: Levels and effects of different
217 forms of anxiety during pregnancy after a prior miscarriage. *Eur J Obstet*
218 *Gynecol Reprod Biol* 2009;**142**:23-29.
- 219 Ford HB, Schust DJ: Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and
220 therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009;**2**:76-83.
- 221 Galvani AP, Novembre J: The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-
222 resistance mutation. *Microbes Infect* 2005;**7**:302-309.
- 223 Ghorban K, Dadmanesh M, Hassanshahi G, Momeni M, Zare-Bidaki M, Arababadi
224 MK, Kennedy D: Is the CCR5 Δ 32 mutation associated with immune system-
225 related diseases? *Inflammation* 2013;**36**:633-642.
- 226 Giannubilo SR, Landi B, Pozzi V, Sartini D, Cecati M, Stortoni P, Corradetti A,
227 Saccucci F, Tranquilli AL, Emanuelli M: The involvement of inflammatory
228 cytokines in the pathogenesis of recurrent miscarriage. *Cytokine* 2012;**58**:50-
229 56.
- 230 Hviid TV: HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and
231 pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:209-232.
- 232 Kiwi R: Recurrent pregnancy loss: evaluation and discussion of the causes and their
233 management. *Cleve Clin J Med* 2006;**73**:913-921.
- 234 Kwak-Kim J, Park JC, Ahn HK, Kim JW, Gilman-Sachs A: Immunological modes of
235 pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 2010;**63**:611-623.
- 236 Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME,
237 Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor
238 accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1
239 infection. *Cell* 1996;**86**:367-377.

- 240 Majumder PP, Dey B: Absence of the HIV-1 protective Delta ccr5 allele in most
241 ethnic populations of India. *Eur J Hum Genet* 2001;**9**:794-796.
- 242 McNicholl JM, Smith DK, Qari SH, Hodge T: Host genes and HIV: the role of the
243 chemokine receptor gene CCR5 and its allele. *Emerg Infect Dis* 1997;**3**:261-
244 271.
- 245 Mecsas J, Franklin G, Kuziel WA, Brubaker RR, Falkow S, Mosier DE: Evolutionary
246 genetics: CCR5 mutation and plague protection. *Nature* 2004;**427**:606.
- 247 Novembre J, Galvani AP, Slatkin M: The geographic spread of the CCR5 Delta32
248 HIV-resistance allele. *PLoS Bio*2005;**3**:e339.
- 249 Rai R, Regan L: Recurrent miscarriage. *Lancet* 2006;**368**:601-611.
- 250 Regan L, Braude PR, Trembath PL: Influence of past reproductive performance on
251 risk of spontaneous abortion. *BMJ* 1989;**299**:541-545.
- 252 Slatkin M: Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates
253 estimated for sampled populations. *Mol Ecol* 2005;**14**:67-73.
- 254 Steinke JW, Borish L: 3. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin*
255 *Immunol* 2006;**117**:S441-445.
- 256 Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler
257 C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD,
258 Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D,
259 Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E,
260 Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A,
261 Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M:
262 Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the
263 coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 1998;**62**:1507-1515.
- 264 Sugiura-Ogasawara M, Furukawa TA, Nakano Y, Hori S, Aoki K, Kitamura T:
265 Depression as a potential causal factor in subsequent miscarriage in
266 recurrent spontaneous aborters. *Hum Reprod* 2002;**17**:2580-2584.

267 Telini B, Veit TD, Chies JA, Vianna P: The CCR5 Δ 32 polymorphism as a pre-
268 eclampsia susceptibility marker: an evaluation in Brazilian women *Arch*
269 *Gynecol Obstet.* 2014 Jul;290(1):1-3. doi: 10.1007/s00404-014-3246-0. Epub
270 2014 Apr 27.

271 Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ, Makrigiannakis
272 A: Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J*
273 *Reprod Immunol* 2010;**85**:25-32.

274 Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA: Frequency of
275 CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 2006;**39**:321-325.

276 Vianna P, Bauer ME, Dornfeld D, Chies JA: Distress conditions during pregnancy
277 may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering
278 lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Med Hypotheses* 2011;**77**:188-191.

279 von Steinburg SP, Krüger A, Fischer T, Mario Schneider KT, Schmitt M: Placental
280 expression of proteases and their inhibitors in patients with HELLP
281 syndrome. *Biol Chem* 2009;**390**:1199-1204.

282 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR: Bidirectional cytokine interactions in
283 the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2
284 phenomenon? *Immunol Today* 1993;**14**:353-356.

285 Zambra FM, Biolchi V, Brum IS, Chies JA: CCR2 and CCR5 genes polymorphisms
286 in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum*
287 *Immunol* 2013;**74**:1003-1008.

288

289

290

291

292

293 **Table****Table 1.** CCR5 genotype frequencies in pre-eclamptic and control groups, considering CCR Δ 32 carriers.

Genotypes	AER (n) (freq)	Control (n) (freq)	P value 0.439
CCR5/CCR5	114 (0.90)	135 (0.85)	
CCR5/ Δ 32	11 (0.08)	21 (0.13)	
Δ 32/ Δ 32	1 (0.007)	2 (0.01)	
Number of individuals	126	158	

Chi-square test was used to compare the CCR5 genotype frequencies between AER and control groups.

294

4. DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, avaliamos a frequência da variante polimórfica CCR5 Δ 32 em mulheres brasileiras que desenvolveram ou não duas complicações gestacionais: a pré-eclâmpsia e o aborto espontâneo recorrente. O sucesso gestacional depende de vários fatores relacionados principalmente com a interação dos sistemas imunes materno e fetal. A perda gestacional é considerada a complicação mais comum na gravidez e é definida como a interrupção espontânea da gestação. Com relação à pré-eclâmpsia, ela é uma das complicações mais comuns da gravidez e, juntamente com outras desordens hipertensivas gestacionais, é um dos principais contribuintes para a mortalidade materna em todo o mundo (Stegers *et al.*, 2010).

Tratando-se da população brasileira, uma das características mais interessantes do nosso grupo de estudo é a sua heterogeneidade e o alto nível de miscigenação. A imigração de indivíduos de diferentes países e continentes com diferentes fundos étnicos contribuiu para o estabelecimento do pool genético presente na população brasileira (Vargas *et al.*, 2006). Neste estudo foram genotipadas 299 mulheres grávidas, das quais 155 desenvolveram pré-eclâmpsia e 284 mulheres, das quais 126 sofreram abortos de repetição.

Nas análises realizadas com a pré-eclâmpsia, nós observamos uma frequência maior de portadores do alelo mutante Δ 32 no grupo controle em relação ao grupo de mulheres com PE. Nossas análises identificaram o CCR5 Δ 32 como um fator de proteção contra a pré-eclâmpsia. As portadoras do alelo Δ 32 apresentaram uma menor chance de desenvolver a doença. Também identificamos que as brasileiras hipertensivas apresentaram um risco elevado de desenvolver a pré-eclâmpsia. Nossos dados estão de acordo com estudos anteriores. Nossa hipótese é de que as células do sistema imune que expressam o receptor CCR5 não funcional são incapazes de migrar apropriadamente à interface materno-fetal, desta forma desfavorecendo uma resposta inflamatória exacerbada. É importante ressaltar que a resposta inflamatória exacerbada já foi anteriormente associada à falha de implantação do embrião e a rejeição do feto. Nossos dados reforçam a importância do papel do polimorfismo no gene do CCR5 no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, e sugere que esse efeito ocorre independente do fundo étnico. Como visto na

literatura, a produção alterada de citocinas e a ativação exacerbada de neutrófilos em mulheres com pré-eclâmpsia apoia a hipótese de que a pré-eclâmpsia surge a partir de uma resposta inflamatória generalizada materna (Stegers *et al.*, 2010).

Na avaliação do aborto espontâneo recorrente, não observamos diferença estatística significativa nas frequências alélicas e genótípicas entre as pacientes com AER e o grupo controle. A frequência do alelo $\Delta 32$ entre as pacientes com AER foi de 0.05 enquanto que nos controles foi de 0.07. Homozigotos para o alelo $\Delta 32$ foram encontrados apenas entre indivíduos eurodescendentes em nossa amostra, reforçando a questão étnica relacionada à presença do alelo $\Delta 32$. Nosso dados sugerem que, no caso do aborto recorrente, o CCR5 $\Delta 32$ parece não influenciar a ocorrência das perdas gestacionais, mesmo que esteja relacionado a outras complicações, como a pré-eclâmpsia.

Giannubilo *et al.*, (2012) através da análise da expressão de citocinas inflamatórias em mulheres com aborto espontâneo recorrente, identificou um padrão anormal de citocinas inflamatórias na interface materno-fetal das pacientes. Muitas condições auto-imunes parecem estar associadas com AER. A presença de condições inflamatórias sistêmicas maternas, como doenças auto-imunes ativas ou subclínicas e doenças metabólicas podem interferir com o balanço de citocinas durante o início da gravidez. Conseqüentemente, um estado inflamatório crônico é induzido no local de implantação, o que resulta em perdas gestacionais ou falhas de implantação (Kwak-Kim *et al.*, 2009). O AER tem múltiplas etiologias; no entanto, mais da metade dos casos identificados permanecem sem explicação. As mulheres com AER frequentemente desenvolvem respostas imunológicas inflamatórias comuns que envolvem ambos os sistemas imune, inato e adaptativo.

Considerando as causas multifatoriais do AER, não descartamos a importância da variante polimórfica CCR5 $\Delta 32$ na ocorrência do aborto recorrente e acreditamos que estudos de funcionalidade do receptor CCR5 podem ser úteis para o entendimento do desenvolvimento dessa patologia. Sugerimos que a investigação dessa variante em uma amostra populacional maior seria de grande valia.

Diversos estudos anteriores suportam nossa hipótese de que ambas as complicações gestacionais, pré-eclâmpsia e aborto espontâneo recorrente surgem a

partir de uma série de fatores, mas principalmente a partir de uma resposta inflamatória materna. Desta forma, há um interesse contínuo em elucidar os papéis imunorregulatórios das citocinas durante a gestação. Estudos relacionados aos receptores de citocinas tem sido de grande importância para a elucidação de tais mecanismos. Além disso, a avaliação de variantes genéticas envolvidas no desenvolvimento de respostas inflamatórias em populações humanas com diferentes backgrounds genéticos pode auxiliar no entendimento dos fatores que estão associados a estas complicações gestacionais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agachan, B., R. Attar, E. Isbilen, H. Y. Aydogan, S. Sozen, F. Gurdol and T. Isbir (2010). "Association of monocyte chemotactic protein-1 and CC chemokine receptor 2 gene variants with preeclampsia." J Interferon Cytokine Res **30**(9): 673-676.

Baek, K. H., B. C. Choi, J. H. Lee, H. K. Choi, S. H. Lee, J. W. Kim, J. A. Hill, H. M. Chung, J. J. Ko and K. Y. Cha (2002). "Comparison of gene expression at the fetomaternal interface between normal and recurrent pregnancy loss patients." Reprod Fertil Dev **14**(3-4): 235-240.

Baker, P. N., J. Krasnow, J. M. Roberts and K. T. Yeo (1995). "Elevated serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with preeclampsia." Obstet Gynecol **86**(5): 815-821.

Bdolah, Y., U. Elchalal, S. Natanson-Yaron, H. Yechiam, T. Bdolah-Abram, C. Greenfield, D. Goldman-Wohl, A. Milwidsky, S. Rana, S. A. Karumanchi, S. Yagel and D. Hochner-Celnikier (2014). "Relationship between nulliparity and preeclampsia may be explained by altered circulating soluble fms-like tyrosine kinase 1." Hypertens Pregnancy **33**(2): 250-259.

Bdolah, Y., S. A. Karumanchi and B. P. Sachs (2005). "Recent advances in understanding of preeclampsia." Croat Med J **46**(5): 728-736.

Borzychowski, A. M., I. L. Sargent and C. W. Redman (2006). "Inflammation and preeclampsia." Semin Fetal Neonatal Med **11**(5): 309-316.

Carrington, B., G. Sacks and L. Regan (2005). "Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome." Curr Opin Obstet Gynecol **17**(6): 591-597.

Chies, J. A. and M. H. Hutz (2003). "High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia." Braz J Med Biol Res **36**(1): 71-75.

Choi, H. K., B. C. Choi, S. H. Lee, J. W. Kim, K. Y. Cha and K. H. Baek (2003). "Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients." Mol Reprod Dev **66**(1): 24-31.

Clark, D. A., G. Chaouat, P. C. Arck, H. W. Mittrucker and G. A. Levy (1998). "Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]." J Immunol **160**(2): 545-549.

Elvin, S. J. and E. D. Williamson (2004). "Stat 4 but not Stat 6 mediated immune mechanisms are essential in protection against plague." Microb Pathog **37**(4): 177-184.

Elvin, S. J., E. D. Williamson, J. C. Scott, J. N. Smith, G. Pérez De Lema, S. Chilla, P. Clapham, K. Pfeffer, D. Schlöndorff and B. Luckow (2004). "Evolutionary genetics: Ambiguous role of CCR5 in *Y. pestis* infection." Nature **430**(6998): 417.

Fertl, K. I., A. Bergner, R. Beyer, B. F. Klapp and M. Rauchfuss (2009). "Levels and effects of different forms of anxiety during pregnancy after a prior miscarriage." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **142**(1): 23-29.

Ford, H. B. and D. J. Schust (2009). "Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy." Rev Obstet Gynecol **2**(2): 76-83.

Galvani, A. P. and J. Novembre (2005). "The evolutionary history of the CCR5-Delta32 HIV-resistance mutation." Microbes Infect **7**(2): 302-309.

Ghorban, K., M. Dadmanesh, G. Hassanshahi, M. Momeni, M. Zare-Bidaki, M. K. Arababadi and D. Kennedy (2013). "Is the CCR5 Δ 32 mutation associated with immune system-related diseases?" Inflammation **36**(3): 633-642.

Giannubilo, S. R., B. Landi, V. Pozzi, D. Sartini, M. Cecati, P. Stortoni, A. Corradetti, F. Saccucci, A. L. Tranquilli and M. Emanuelli (2012). "The involvement of inflammatory cytokines in the pathogenesis of recurrent miscarriage." Cytokine **58**(1):

50-56.

Gilbert, J. S., M. J. Ryan, B. B. LaMarca, M. Sedeek, S. R. Murphy and J. P. Granger (2008). "Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(2): H541-550.

Gurdol, F., L. M. Yurdum, U. Ozturk, E. Isbilen and B. Cakmakoglu (2012). "Association of the CC chemokine receptor 5 (CCR5) polymorphisms with preeclampsia in Turkish women." Arch Gynecol Obstet **286**(1): 51-54.

Hviid, T. V. (2006). "HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications." Hum Reprod Update **12**(3): 209-232.

Kanasaki, K. and R. Kalluri (2009). "The biology of preeclampsia." Kidney Int **76**(8): 831-837.

Kim, Y. J., H. S. Park, H. Y. Lee, E. H. Ha, S. H. Suh, S. K. Oh and H. S. Yoo (2006). "Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia." Placenta **27**(4-5): 438-444.

Kiwi, R. (2006). "Recurrent pregnancy loss: evaluation and discussion of the causes and their management." Cleve Clin J Med **73**(10): 913-921.

Koga, K., Y. Osuga, O. Yoshino, Y. Hirota, X. Ruimeng, T. Hirata, S. Takeda, T. Yano, O. Tsutsumi and Y. Taketani (2003). "Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2348-2351

Kwak-Kim, J., J. C. Park, H. K. Ahn, J. W. Kim and A. Gilman-Sachs (2010). "Immunological modes of pregnancy loss." Am J Reprod Immunol **63**(6): 611-623.

Laloti, M. D. (2008). "Can preimplantation genetic diagnosis overcome recurrent

pregnancy failure?" Curr Opin Obstet Gynecol **20**(3): 199-204.

LaMarca, B. D., M. J. Ryan, J. S. Gilbert, S. R. Murphy and J. P. Granger (2007). "Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia." Curr Hypertens Rep **9**(6): 480-485.

Levine, R. J., S. E. Maynard, C. Qian, K. H. Lim, L. J. England, K. F. Yu, E. F. Schisterman, R. Thadhani, B. P. Sachs, F. H. Epstein, B. M. Sibai, V. P. Sukhatme and S. A. Karumanchi (2004). "Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia." N Engl J Med **350**(7): 672-683.

Levine, R. J., C. Qian, E. S. Leshane, K. F. Yu, L. J. England, E. F. Schisterman, T. Wataganara, R. Romero and D. W. Bianchi (2004). "Two-stage elevation of cell-free fetal DNA in maternal sera before onset of preeclampsia." Am J Obstet Gynecol **190**(3): 707-713.

Levine, R. J., C. Qian, S. E. Maynard, K. F. Yu, F. H. Epstein and S. A. Karumanchi (2006). "Serum sFlt1 concentration during preeclampsia and mid trimester blood pressure in healthy nulliparous women." Am J Obstet Gynecol **194**(4): 1034-1041.

Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup and N. R. Landau (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." Cell **86**(3): 367-377.

Lyall, F., A. Young, F. Boswell, J. C. Kingdom and I. A. Greer (1997). "Placental expression of vascular endothelial growth factor in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction does not support placental hypoxia at delivery." Placenta **18**(4): 269-276.

Majumder, P. P. and B. Dey (2001). "Absence of the HIV-1 protective Delta ccr5 allele in most ethnic populations of India." Eur J Hum Genet **9**(10): 794-796.

Maynard, S. E., J. Y. Min, J. Merchan, K. H. Lim, J. Li, S. Mondal, T. A. Libermann, J. P. Morgan, F. W. Sellke, I. E. Stillman, F. H. Epstein, V. P. Sukhatme and S. A. Karumanchi (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest **111**(5): 649-658.

McMahon, K., S. A. Karumanchi, I. E. Stillman, P. Cummings, D. Patton and T. Easterling (2014). "Does soluble fms-like tyrosine kinase-1 regulate placental invasion? Insight from the invasive placenta." Am J Obstet Gynecol **210**(1): 68.e61-64.

McNicholl, J. M., D. K. Smith, S. H. Qari and T. Hodge (1997). "Host genes and HIV: the role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele." Emerg Infect Dis **3**(3): 261-271.

Mecenas, J., G. Franklin, W. A. Kuziel, R. R. Brubaker, S. Falkow and D. E. Mosier (2004). "Evolutionary genetics: CCR5 mutation and plague protection." Nature **427**(6975): 606.

Novembre, J., A. P. Galvani and M. Slatkin (2005). "The geographic spread of the CCR5 Delta32 HIV-resistance allele." PLoS Biol **3**(11): e339.

Polliotti, B. M., A. G. Fry, D. N. Saller, R. A. Mooney, C. Cox and R. K. Miller (2003). "Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia." Obstet Gynecol **101**(6): 1266-1274.

Rai, R. and L. Regan (2006). "Recurrent miscarriage." Lancet **368**(9535): 601-611.

Raijmakers, M. T., R. Dechend and L. Poston (2004). "Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials." Hypertension **44**(4): 374-380.

Regan, L., P. R. Braude and P. L. Trembath (1989). "Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion." BMJ **299**(6698): 541-545.

Sibai, B., G. Dekker and M. Kupferminc (2005). "Pre-eclampsia." Lancet **365**(9461): 785-799.

Slatkin, M. (2005). "Seeing ghosts: the effect of unsampled populations on migration rates estimated for sampled populations." Mol Ecol **14**(1): 67-73.

Steeegers, E. A., P. von Dadelszen, J. J. Duvekot and R. Pijnenborg (2010). "Pre-eclampsia." Lancet **376**(9741): 631-644.

Steinke, J. W. and L. Borish (2006). "3. Cytokines and chemokines." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S441-445.

Stephens, J. C., D. E. Reich, D. B. Goldstein, H. D. Shin, M. W. Smith, M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, R. Allikmets, L. Schriml, B. Gerrard, M. Malasky, M. D. Ramos, S. Morlot, M. Tzetis, C. Oddoux, F. S. di Giovine, G. Nasioulas, D. Chandler, M. Aseev, M. Hanson, L. Kalaydjieva, D. Glavac, P. Gasparini, E. Kanavakis, M. Claustres, M. Kambouris, H. Ostrer, G. Duff, V. Baranov, H. Sibul, A. Metspalu, D. Goldman, N. Martin, D. Duffy, J. Schmidtke, X. Estivill, S. J. O'Brien and M. Dean (1998). "Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes." Am J Hum Genet **62**(6): 1507-1515.

Sugiura-Ogasawara, M., T. A. Furukawa, Y. Nakano, S. Hori, K. Aoki and T. Kitamura (2002). "Depression as a potential causal factor in subsequent miscarriage in recurrent spontaneous aborters." Hum Reprod **17**(10): 2580-2584.

Taylor, R. N., J. Grimwood, R. S. Taylor, M. T. McMaster, S. J. Fisher and R. A. North (2003). "Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies." Am J Obstet Gynecol **188**(1): 177-182.

The ESHRE Capri Workshop Group (2008) Genetic aspects of female reproduction. Hum Reprod Update **4**:293-307.

Telini, B., T. D. Veit, J. A. Chies and P. Vianna (2014). "The CCR5 Δ 32 polymorphism as a pre-eclampsia susceptibility marker: an evaluation in Brazilian women." Arch Gynecol Obstet **290**(1): 1-3.

Toth, B., U. Jeschke, N. Rogenhofer, C. Scholz, W. Würfel, C. J. Thaler and A. Makrigiannakis (2010). "Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment." J Reprod Immunol **85**(1): 25-32.

Trogstad, L., P. Magnus and C. Stoltenberg (2011). "Pre-eclampsia: Risk factors and causal models." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **25**(3): 329-342.

Tsatsaris, V., F. Goffin, C. Munaut, J. F. Brichant, M. R. Pignon, A. Noel, J. P. Schaaps, D. Cabrol, F. Frankenne and J. M. Foidart (2003). "Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5555-5563.

Vargas, A. E., A. R. Marrero, F. M. Salzano, M. C. Bortolini and J. A. Chies (2006). "Frequency of CCR5 Δ 32 in Brazilian populations." Braz J Med Biol Res **39**(3): 321-325.

Vianna, P., M. E. Bauer, D. Dornfeld and J. A. Chies (2011). "Distress conditions during pregnancy may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering lymphocyte sensitivity to glucocorticoids." Med Hypotheses **77**(2): 188-191.

Vianna, P., G. K. Da Silva, B. P. Dos Santos, M. E. Bauer, C. A. Dalmáz, E. Bandinelli and J. A. Chies (2010). "Association between mannose-binding lectin gene polymorphisms and pre-eclampsia in Brazilian women." Am J Reprod Immunol **64**(5): 359-374.

Von Steinburg, S. P., A. Krüger, T. Fischer, K. T. Mario Schneider and M. Schmitt (2009). "Placental expression of proteases and their inhibitors in patients with HELLP syndrome." Biol Chem **390**(11): 1199-1204.

Wang, Y., D. F. Lewis, J. S. Alexander and D. N. Granger (2007). "Endothelial barrier function in preeclampsia." Front Biosci **12**: 2412-2424.

Wegmann, T. G., H. Lin, L. Guilbert and T. R. Mosmann (1993). "Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?" Immunol Today **14**(7): 353-356.

Zambra, F. M., V. Biolchi, I. S. Brum and J. A. Chies (2013). "CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer." Hum Immunol **74**(8): 1003-1008.

Zhou, Y., M. McMaster, K. Woo, M. Janatpour, J. Perry, T. Karpanen, K. Alitalo, C. Damsky and S. J. Fisher (2002). "Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome." Am J Pathol **160**(4): 1405-1423.