

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

**VARIANTES GÊNICAS NA VIA DE SINALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS P53 E P73
E SUA RELAÇÃO COM PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES**

Lucas Rosa Fraga

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.

Orientadora: Prof^ª. Dra Lavínia Schüler-Faccini

Co-orientadora: Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino

**Porto Alegre
Março de 2013**

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

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

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

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pela CAPES, vinculada ao PPGBM/UFRGS.

Cestas de pescaria são utilizadas para pescar; quando o peixe é pego, os homens esquecem as cestas; as armadilhas são utilizadas para caçar lebres; uma vez que essas são pegas, os homens esquecem as armadilhas. As palavras são utilizadas para expressar ideias; mas quando se apoderam das ideias, os homens esquecem as palavras.

Chuang Tsé

A todas as mulheres que jamais perderam as esperanças.

AGRADECIMENTOS

Inicio agradecendo às quatro pessoas mais importantes da minha vida: mãe, nana e minhas duas irmãs. Mesmo que este trabalho tenha necessitado da colaboração de inúmeras pessoas, sem essas, eu não teria estrutura ou capacidade de executá-lo. Essas fazem com que eu tenha um sentido para acordar todos os dias e fazer o que faço.

Amplio para o restante da família, que, de um jeito bem diferente me apóia, sente orgulho de mim e fica do meu lado apesar de todos os pesares. Especialmente, o Tiaguinho, que me fez ter mais vontade de olhar para a genética com vontade de entendê-la e pesquisá-la.

Agradeço muito às minhas orientadoras. À Lavínia por ter me dado todas as oportunidades que me deu e tem me dado, me permitindo entrar na UFRGS como IC e depois por ter aceitado me orientar, me assessorando sempre. Muito obrigado Lavínia!

À Teresa, pelo grande apoio na parte na elaboração do projeto e execução do trabalho. Além das inúmeras conversas e disponibilidade. Também por ser uma ótima pessoa e super acessível. Obrigado Teresa!

À CAPES, CNPq e todas as demais instituições de fomento que auxiliaram neste trabalho.

Aos professores do PPGBM com seus ensinamentos, conversas e orientações. Admiro a todos!

Ao Elmo, com toda sua ajuda e disponibilidade e disposição de sempre.

A todas as mulheres que aceitaram participar deste estudo, mesmo que em alguns momentos tristes e frustradas, possuíam muita esperança.

A Carol, Bárbara e a Camila, que ajudaram nas coletas das amostras e nos questionários durante os mutirões.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório. A Bibi e a Fêfa pelas conversas e risadas. Ao Juliano, pela grande parceria, principalmente nos momentos em que eu estava mais afastado do laboratório. A Dana, pessoa que muito admiro, pelos enormes ensinamentos e conselhos. Alice pelas conversas angustiantes e engraçadas. E a todos os demais, Mari, Marcelo e Flávia, pelas conversas filosóficas, polêmicas, engraçadas e muito descontraídas com personalidades da internet.

Ao pessoal do HCPA e do SIAT, em especial ao André.

Aos meus queridos e saudosos colegas da PUCRS, que sempre conversavam muito sobre genética.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Humana Molecular da PUCRS, pelos ensinamentos e orientações no início dos meus aprendizados em genética. Principalmente ao Francis, que muito me apoiou, e a Clarice, que me fez gostar mais ainda de genética e é uma das grandes responsáveis pela minha formação como pessoa e estudante de genética. Muito obrigado Clarice!

Aos meus amigos, principalmente a Renata e Kuka, pelos momentos fora da universidade, com muitas risadas, conversas que me deixavam mais relaxado e calmo.

A Bibi e ao Lucas, pela ajuda na revisão da dissertação.

O mais importante, a Deus, sem o qual nada disso seria possível.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	2
Resumo	4
Abstract.....	6
1. Introdução.....	8
1.1. Perdas Gestacionais	9
1.1.1. Classificação das Perdas Gestacionais.....	10
1.1.2. Perdas Gestacionais Recorrentes	10
1.2. A família p53	16
1.2.1. p53.....	17
1.2.2. p63.....	19
1.2.3. p73.....	20
1.2.4. Regulação da família p53	21
1.3. O Fator Inibitório da Leucemia e a Implantação	25
2. Justificativa e Objetivos	27
3. p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss	29
4. Polymorphisms in <i>TP63</i> , <i>TP73</i> and <i>MDM2</i> genes are associated with recurrent pregnancy loss	52
5. Análises dos Subgrupos de Mulheres com Perdas Gestacionais Recorrentes.....	68
6. Discussão	74
Referências	81
Apêndices	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG: Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia

eNOS: sintase endotelial do óxido nítrico

ESHRE: Sociedade Européia de Reprodução Humana e Embriologia

IC: Intervalo de Confiança

Lif: Fator inibitório da leucemia

LIF: gene *fator inibitório da leucemia*

MDM2: gene *proteína homóloga (camundongo) E3 ubiquitina ligase Mdm2*

Mdm2: proteína E3 ubiquitina ligase Mdm2

MDM4: gene *proteína homóloga (camundongo) de ligação ao p53 Mdm4*

Mdm4: proteína Mdm4

MTHFR: gene *metileno tetrahidrofolato redutase*

NOS3: gene *óxido nítrico sintase 3*

OR: Razão de chance

p53: proteína supressora de tumor p53

p63: proteína tumoral p63

p73: proteína tumoral p73

PGR: Perdas Gestacionais Recorrentes

SNP: polimorfismo de único nucleotídeo

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

TP53: gene *proteína tumoral 53*

TP63: gene *proteína tumoral 63*

TP73: gene *proteína tumoral 73*

USP7: gene *peptidase ubiquitina-específica 7 (herpes vírus asociado)*

Usp7: proteína protease de processamento ubiquitina-específica 7 (Usp7)

VEGF: gene *fator de crescimento vascular endotelial*

RESUMO

As Perdas Gestacionais Recorrentes (PGR) são definidas como duas ou mais perdas gestacionais consecutivas antes das 24 semanas de gestação. Essa condição, de etiologia complexa, ocorre em cerca de 5% de todos os casais que tentam ter filhos, podendo ser considerada uma condição reprodutiva que merece ser alvo de investigação, principalmente pelo fato de que, em aproximadamente 50% dos casos, sua etiologia permanece desconhecida.

A família de proteínas p53 é composta por fatores de transcrição cujos membros, p53, p63 e p73 compartilham uma estrutura geral e funções primárias no controle do ciclo celular, sendo capazes de induzir parada do ciclo celular e morte celular em respostas a danos no DNA. Na reprodução, atuam: p53, na regulação de diversos genes envolvidos na apoptose e angiogênese, mecanismos fundamentais para uma adequada gestação, além de regular o gene *LIF*, cujo produto prepara o útero para a implantação do blastocisto; p63, como a maior reguladora do processo que controla a qualidade e sobrevivência da linhagem germinativa feminina através da eliminação por apoptose; e p73, na manutenção da qualidade dos oócitos através do controle do fuso mitótico. Essas proteínas são reguladas, principalmente, por proteínas envolvidas no processo de ubiquitinação, sendo elas: Mdm2, principal reguladora da rota, reduzindo os níveis de p53, p63 e p73; Mdm4, homóloga a Mdm2, atuando da mesma forma sobre a família; e Usp7, que atua apenas sobre Mdm2, Mdm4 e p53, deubiquitinando-as e, assim, estabilizando essa rota.

Nesse trabalho foi investigado o efeito das variantes polimórficas nos genes da família p53 e seus principais reguladores, sendo essas c.215G>C - Pro72Arg de *TP53* (rs1042522), c.325-4742T>G de *TP63* (rs17506395), 4c.-30G>A e 14c.-20C>T de *TP73* (rs2273953, rs1801173), c.14+309T>G de *MDM2* (rs2279744), c.753+572C>T de *MDM4* (rs1563828), c.2719-234G>A de *USP7* (rs1529916) e c.1414T>G de *LIF* (rs929271), como fator de risco para perdas gestacionais recorrentes.

Foram avaliadas 153 mulheres com perdas gestacionais recorrentes e 143 mulheres com pelo menos dois filhos vivos e sem histórico de perdas gestacionais ou infertilidade. A

distribuição das frequências alélicas e genóticas não se mostrou diferente entre os dois grupos, entretanto, análises de interação entre os genótipos de risco de *TP53* (Arg/Arg) e *MDM2* (TT) e, *TP63* (TT) e *MDM2* (TT) foram associadas ao aumento do risco para PGR (OR = 2,58; 95% IC: 1,31 – 5,07; p = 0,006; e OR = 2,13; IC: 1,18 – 3,82; p = 0,011, respectivamente).

Com base nestas observações e em dados de literatura, sugere-se que a presença concomitante de genótipos Arg/Arg de *TP53* e TT de *MDM2* levam a um aumento dos níveis de p53, o que propicia indução da apoptose mais eficiente podendo estar correlacionada a uma maior suscetibilidade a PGR.

Em relação à interação de *MDM2* e *TP63*, mesmo sem a compreensão do efeito deste polimorfismo sobre a função de p63, sabe-se que o genótipo *MDM2* TT resulta em menores níveis da proteína. Como consequência, maiores níveis de p63 nos oócitos, ovário e útero seriam esperados, o que também levaria a maior chance de PGR.

Os achados deste trabalho reforçam a hipótese do envolvimento da família p53 no controle da reprodução materna. Através dos mecanismos pró-apoptóticos e de controle de ciclo celular semelhantes, porém independentes, as atividades dessas proteínas na fisiologia da reprodução materna influenciam no desfecho gestacional, incluindo a fisiopatologia das PGR.

ABSTRACT

Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined as two or more consecutive pregnancy losses before 24 weeks of gestation. This condition of complex etiology, occurs in about 5% of all couples trying to conceive and may be considered a reproductive disorder that deserves to be investigated, mainly due the fact that, in approximately 50% of cases, the etiology remains unknown.

The p53 family proteins is a family of transcription factors whose members p53, p63 and p73 share a general structure and primary functions in cell cycle control, being able of induce cell cycle arrest and cell death in response to DNA damage. In reproduction, act: p53, in the regulation of several genes involved in apoptosis and angiogenesis, fundamental mechanisms for an appropriate pregnancy, also regulates *LIF* gene expression, whose product prepares the uterus for implantation of the blastocyst; p63, as the main regulator of process that control the quality and survival of female germ line through elimination by apoptosis; and p73, in maintaining the quality of the oocytes by controlling the mitotic spindle. These proteins are regulated mainly by proteins involved in the ubiquitination process, namely: Mdm2, main regulator of the route, reducing p53, p63 and p73 levels; Mdm4, homologous to Mdm2, acting the similarly on family; and Usp7, which acts only on Mdm2, Mdm4 and p53, deubiquitinating them and thus stabilizing this route.

In this study was investigated the effect of polymorphic variants in genes of the p53 family and its main regulators, these being c.215G>C - Pro72Arg of *TP53* (rs1042522), c.325-4742T>G of *TP63* (rs17506395), 4c.-30G>A e 14c.-20C>T of *TP73* (rs2273953, rs1801173), c.14+309T>G of *MDM2* (rs2279744), c.753+572C>T of *MDM4* (rs1563828), c.2719-234G>A of *USP7* (rs1529916) and c.1414T>G of *LIF* (rs929271), as risk factor to recurrent pregnancy loss.

Were evaluated 153 women with recurrent pregnancy loss and 143 women with at least two live births and no history of pregnancy loss or infertility. The distribution of allelic and genotypic frequencies did not differ between the two groups, however, analysis

of the interaction between the risk genotypes of *TP53* (Arg/Arg) and *MDM2* (TT), and *TP63* (TT) and *MDM2* (TT) were associated to increased risk for PGR (OR = 2.58, 95% CI: 1.31 - 5.07, p = 0.006; and OR = 2.13; OR = 2.13; IC: 1.18 - 3.82; p = 0.011, respectively).

Based on these observations and on literature data, suggests that the simultaneous presence of genotypes Arg/Arg of *TP53* and TT of *MDM2* leads to an increase in p53 levels, which provides more effective induction of apoptosis and can be correlated with an increased susceptibility to RPL.

Regarding the interaction of *MDM2* and *TP63*, even without understanding the effect of this polymorphism on the function of p63, it is known that *MDM2* TT genotype results in lower levels of the protein. As a consequence, higher levels of p63 in oocytes, ovary and uterus would be expected, which would also lead to a increased risk of RPL.

The hypothesis of this study is that the mechanism which p53 and p63 is acting on women with recurrent pregnancy is through an post-implantation event. The findings of this study support the hypothesis of the involvement of p53 family on maternal reproduction control. Through the pro-apoptotic mechanisms and cell cycle control similar nevertheless independents, activities of these proteins in the maternal reproduction physiology influence on the pregnancy outcome, including the pathophysiology of RPL.

CAPÍTULO 1
Introdução

1.1. Perdas Gestacionais

As perdas gestacionais são as mais frequentes complicações gestacionais e, por definição, incluem qualquer tipo de perda que ocorra desde a fertilização até o período neonatal (ACOG, 2002). Na prática, considera-se abortamento quando tais perdas ocorrem nas primeiras 24 semanas de gestação, sendo que, após esse período a perda gestacional é considerada como morte fetal (ACOG, 1996; Michels & Tiu, 2007).

A maioria das gestações é perdida espontaneamente antes da mulher reconhecer que está grávida e, os sinais clínicos da perda gestacional são confundidos com uma menstruação mais densa e atrasada (Griebel *et al.*, 2005). Estima-se que 78% das concepções não resultem em um bebê nascido vivo e que 80% das perdas gestacionais ocorram no primeiro trimestre (Firth & Hurst, 2005). Quanto às gestações clinicamente reconhecidas, aproximadamente 15% terminam em perdas, sendo a maioria precoce, a que ocorre antes das 12 primeiras semanas de gestação (Rai & Regan, 2006). A taxa de abortamento muito precoce, com menos de oito semanas de gestação, pode ser maior, uma vez que algumas mulheres não reconhecem que estão grávidas e abortam presumindo que estão no período pré-menstrual (Harper, 2004; Firth & Hurst, 2005). Cerca de um quarto das mulheres experimentam pelo menos uma perda gestacional durante sua vida (Stephenson & Kutteh, 2007). As taxas de perda gestacional diminuem com o progresso da gestação sendo que, menos de 5% das perdas ocorrem entre a 13^a e 19^a semanas e, 0,3% ocorrem após a 20^a semana (Wang *et al.*, 2003; Michels & Tiu, 2007).

A etiologia para as perdas gestacionais permanece desconhecida em cerca de metade dos casos (Goldenberg *et al.*, 2004). Nos casos em que as causas são conhecidas, as anomalias cromossômicas estão entre as mais comuns, sendo responsáveis por cerca de 50% das perdas de primeiro trimestre. Incluem-se, entre as outras causas, os fatores anatômicos, imunológicos infecciosos e trombofilias. No segundo e terceiro trimestres, além dessas, problemas na placenta, idade materna avançada complicações do cordão umbilical e problemas com crescimento fetal estão relacionadas às perdas gestacionais (Michels & Tiu, 2007).

1.1.1. Classificação das Perdas Gestacionais

Para a classificação das perdas gestacionais são levadas em consideração a idade gestacional, características embrionárias do aborto e a ocorrência dessas perdas. De acordo com Firth & Hurst (2005), as perdas gestacionais podem ser classificadas em:

- a) **Abortamento espontâneo:** perda gestacional espontânea com menos de 20 semanas de gestação ou com peso fetal inferior a 500g. Não existe estimativa de incidência exata em relação ao abortamento espontâneo devido à dificuldade em reconhecer concepções e perdas no início da gravidez. Classifica-se o abortamento conforme sua apresentação clínica: ameaça de abortamento, abortamento inevitável, abortamento completo, abortamento incompleto, abortamento retido e abortamento infectado.
- b) **Perda gestacional precoce:** consiste na perda gestacional que tenha ocorrido com menos de 12 semanas de gestação.
- c) **Gestação anembrionada:** ocorrência da visualização ultra-sonográfica do saco gestacional sem a presença de embrião com idade gestacional superior a 7,5 semanas.
- d) **Abortamento retido:** identificação de partes fetais no saco gestacional, mas sem atividade cardíaca na gestação com menos de 24 semanas de gravidez.
- e) **Morte fetal intra-uterina:** morte fetal com mais de 24 semanas, mas antes do início do trabalho de parto.
- f) **Perda gestacional recorrente ou abortamento de repetição:** ocorrência de duas ou mais perdas gestacionais, antes das 24 semanas de gestação.

1.1.2. Perdas Gestacionais Recorrentes

Atualmente, o conceito mais utilizado para as perdas gestacionais recorrentes (PGR) é a ocorrência de duas ou mais perdas consecutivas antes das 24 semanas de gestação (ACOG, 2002). A maioria das mulheres com PGR possuem perdas pré-embrionárias ou embrionárias, sendo menos comuns, as perdas fetais recorrentes (ACOG,

2002; Rai & Regan, 2006). Ainda, há divergências quanto ao tempo limite de ocorrência das perdas para que essas sejam consideradas como PGR, variando entre 20 e 28 semanas (Pandey *et al.*, 2005). Além disso, algumas diretrizes internacionais mostram-se conflitantes quanto ao número de perdas gestacionais mínimas para que se considere tal condição, sendo que algumas consideram PGR como a ocorrência duas ou mais perdas e outras, a partir de três perdas consecutivas (ACOG, 2002; Jauniaux *et al.* (ESHRE), 2006).

Apesar de não existirem dados que demonstrem diferenças na probabilidade de se encontrar a etiologia para as PGR em mulheres com duas perdas gestacionais contra mulheres com três ou mais perdas, alguns dados sugerem que o risco de perdas gestacionais em gestações subsequentes é de 30% após duas perdas em comparação com 33% depois de três perdas (ACOG, 2002; Ford & Schust, 2009).

Mesmo fazendo parte de uma série de distúrbios reprodutivos que parecem possuir uma causa subjacente comum, as PGR possuem características que as colocam como uma condição reprodutiva particular. O risco de PGR está diretamente relacionado aos desfechos das gestações prévias (Nybo Andersen *et al.*, 2000). Além disso, a prevalência observada das PGR é muito mais alta que a esperada pelo acaso (0,34%) (Quenby *et al.*, 2002; Branch *et al.*, 2010). Também, diferentemente das perdas gestacionais esporádicas, as PGR tendem a ocorrer mesmo que o feto não possua anormalidades cromossômicas (Sullivan *et al.*, 2004). Finalmente, as PGR tendem a ocorrer em mulheres com características reprodutivas comuns (Jivraj *et al.*, 2001). Essas particularidades apontam que, mesmo tratando-se de duas perdas gestacionais, as PGR constituem uma condição clínica única e distinta (Rai & Regan, 2006).

Estima-se que as PGR ocorrem em cerca de 5% de todos os casais que tentam ter filhos (Hogge *et al.*, 2003; Rai R, 2006) e, 1% dos casais apresentam três ou mais perdas (Hogge *et al.*, 2003). Mais ainda, com as mudanças do comportamento reprodutivo da sociedade atual, em que as mulheres tendem a adiar suas gestações, tem aumentado o número de mulheres em período gestacional em idade superior a 35 anos. Embora não existam estudos que correlacionem essa tendência social e o aumento da incidência de PGR, é lógico concluir que a taxa de perdas gestacionais também aumentou, uma vez que a idade materna no período da concepção é um forte e independente fator de risco para as perdas gestacionais (Nybo Andersen *et al.*, 2000; Rai & Regan, 2006). Estudos

epidemiológicos sugerem também que o risco da perda gestacional subsequente é aproximadamente 24% depois de duas perdas, 30% depois de três e 40% após quatro perdas consecutivas (Regan *et al.*, 1989; Pandey *et al.*, 2005).

Quanto à sua classificação, as PGR podem ser divididas em primárias e secundárias. As PGR primárias são aquelas em que houve a perda de todas as gestações anteriores, não havendo, assim, filhos vivos. Já nas PGR secundárias há, no mínimo, uma gestação de sucesso, independente do número de abortamentos (Pandey *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2010). As informações da literatura atual sobre as diferenças no prognóstico, etiologia e complicações da gravidez da próxima perda, entre PGR primárias e PGR secundárias são limitadas e inconclusivas (Nielsen *et al.*, 2010; Van den Boogaard *et al.*, 2010). No entanto, sabe-se que mulheres com histórico de uma gestação de sucesso possuem características epidemiológicas diferentes daquelas mulheres sem gravidez bem sucedida, sendo que o risco de perda gestacional depois de uma perda prévia é mais alto em mulheres com PGR primárias quando comparado com mulheres com PGR secundárias. Além disso, mulheres com PGR primárias parecem ser mais susceptíveis a desfechos obstétricos e neonatais adversos (Alberman, 1988; Shapira *et al.*, 2012).

1.1.2.1. Etiologia das Perdas Gestacionais Recorrentes: fatores não genéticos

A etiologia das PGR vem sendo amplamente estudada e inclui principalmente fatores morfológicos, hormonais, infecciosos, ambientais, imunológicos, trombofílicos, genéticos. Apesar disto, em cerca de 50% dos casos a etiologia das PGR permanece desconhecida (Laurino *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2010).

Entre os fatores morfológicos mais implicados nas PGR, estão incluídas as malformações uterinas que são responsáveis por cerca de 10 a 15% do total das PGR (Laurino *et al.*, 2005; Ford & Schust, 2009). As perdas decorrentes das malformações uterinas ocorrem geralmente devido à interrupção da vasculatura do endométrio, que leva a uma anormal e inadequada placentação e ocorrem mais freqüentemente no segundo trimestre. O útero septado é a anomalia uterina mais frequentemente relacionada às PGR, ocasionando um risco de 76% de perda gestacional em mulheres com essa malformação

(Lin, 2004). Anomalias müllerianas, incluindo útero unicorno, bicorno e didelfo têm sido associadas com pequenos aumentos do risco para PGR (Toth *et al.*, 2010).

Dentre os fatores hormonais, a disfunção da tiróide, diabetes e defeitos na fase lútea estão intimamente ligados as PGR (Abalovich *et al.*, 2002; Ford & Schust, 2009). Além disso, níveis alterados de hormônios como o hormônio estimulante da tiróide (TSH) e prolactina são considerados fatores de risco para PGR. A Síndrome de Ovários Policísticos afeta cerca de 10% das mulheres durante sua vida reprodutiva e está ligada a um aumento do risco às PGR precoces (Rai *et al.*, 2000; Jakubowicz *et al.*, 2002). Os fatores hormonais são responsáveis por cerca de 17% das PGR e são geralmente investigados em casais com este tipo de problema (Ford & Schust, 2009).

A quebra do equilíbrio da flora vaginal pode levar ao surgimento de infecções, liberação de prostaglandina, insuficiência cervical, e consequente perda gestacional tardia (Toth *et al.*, 2010). A perda gestacional séptica é aquela desencadeada por uma infecção (Griebel *et al.*, 2005) e, entre as infecções mais importantes estão as causadas por: citomegalovírus, toxoplasmose, herpes e rubéola. Tais complicações estão associadas a perdas gestacionais isoladas, não havendo dados convincentes que infecções causem PGR (ASRM, 2012). No entanto, especula-se que algumas infecções, tais como mycoplasma, ureaplasma, *Chlamydia trachomatis* e herpes (Summers, 1994), sejam responsáveis por 0,5% a 5% dos casos de PGR (Stephenson, 1996; Fox-Lee & Schust, 2007). Ainda assim, não são claras as indicações para realização de exames para determinados agentes infecciosos durante a investigação da etiologia das PGR na prática clínica (ASRM, 2012).

A avaliação dos fatores ambientais que podem causar as PGR é complicada já que há uma dificuldade na documentação e avaliação do tipo e tempo de exposição, dose com potencial tóxico, entre outros. No entanto determinadas substâncias já estão bem estabelecidas como fatores de risco para as perdas gestacionais. O fumo parece ter um efeito adverso na função trofoblástica e tem sido associado a um risco aumentado dose-dependente de perdas gestacionais (Lindbohm *et al.*, 2002). O álcool possui efeitos adversos na fertilidade e no desenvolvimento e, mesmo em um consumo relativamente moderado (três a cinco doses por semana), conferindo risco para as perdas gestacionais (Kesmodel *et al.*, 2002). O consumo de cafeína também está associado com um risco dose-dependente de perda gestacional, o qual aumenta quando este consumo excede 300mg por

dia (Rasch, 2003). Além desses fatores, o consumo de drogas ilícitas, como a cocaína também está associado com PGR, sendo apontado como fator de risco independente (Ness *et al.*, 1999). Quanto ao estilo de vida, dados recentes apontam que a obesidade afeta cerca de 20% da reprodução feminina, estando associada com infertilidade, complicações tardias na gestação e PGR (Sebire *et al.*, 2001; Lashen *et al.*, 2004; Boots & Stephenson, 2011).

Uma vez que o feto não é geneticamente idêntico à sua mãe, fica evidente que durante todo o processo gestacional ocorram processos imunológicos que regulem e permitam que a mãe carregue o feto sem rejeição (Ford & Schust, 2009). Um desbalanço imunológico neste processo levaria a perdas gestacionais. Além disso, os mecanismos imunológicos estão diretamente envolvidos no sucesso da implantação e a adaptação das respostas imunológicas maternas para o embrião implantado é um processo chave para o estabelecimento de uma unidade feto-placenta. Um dos fatores de risco imunológico bem estabelecidos é a Síndrome Antifosfolípídea, uma doença autoimune presente em cerca de 15% dos casos de PGR (Miyakis *et al.*, 2006). Estudos que avaliam células *natural killer* e anticorpos circulantes tem se mostrado contraditórios quanto ao seu real envolvimento na etiologia das RPL (Pandey *et al.*, 2005; Van Den Heuvel *et al.*, 2007). Além disso, alguns estudos têm trabalhado na investigação da relação entre a produção aumentada de citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e de interleucinas, e as PGR (Brogin Moreli *et al.*, 2012).

O sucesso implantacional requer um equilíbrio balanceado entre a coagulação e remodelamento vascular através da angiogênese (Buchholz & Thaler, 2003). No entanto os problemas trombofílicos são grandes causas de desfechos adversos na gestação, incluindo as PGR (Arias *et al.*, 1998), decorrentes dos danos aos vasos coriônicos, redução dos vasos do trofoblasto ou apoptose. Os problemas na circulação uteroplacentária devido à trombose no lado materno da placenta podem explicar a perda fetal tardia (Lockwood, 2002; Laurino *et al.*, 2005). Entre as mutações trombofílicas mais comuns estão: a mutação do fator V de Leiden, mutação no gene da protrombina, e mutações do gene *metileno tetraidrofolato redutase* (*MTHFR*). Já em relação às trombofilias adquiridas associadas às PGR estão a hiperhomocisteinemia e a resistência à proteína C ativada (Ford & Schust, 2009).

1.1.2.2. Fatores Genéticos em Perdas Gestacionais Recorrentes

Em aproximadamente 4% dos casais com perdas gestacionais recorrentes é encontrado um rearranjo cromossômico balanceado em um dos parceiros. Tais rearranjos podem causar as perdas devido à segregação durante a meiose, resultando em gametas com duplicações ou deficiências em segmentos cromossômicos. Também são encontrados em casais com PGR, pequenas inversões cromossômicas (Franssen *et al.*, 2005). Entretanto, mesmo em casais cromossomicamente normais, erros durante a meiose podem causar desbalanço cromossômico nos gametas, levando a formação um zigoto cromossomicamente anormal, tais como trissomias, poliploidias, monossomias e outras (Rai & Regan, 2006).

Análises em abortos de mulheres com PGR encontraram aneuploidias em aproximadamente 70% dos casos em que houve perdas gestacionais precoces e, 20% nos casos de perdas gestacionais que ocorreram após as 12 semanas de gestação (Hogge *et al.*, 2003). Avaliações dos cariótipos do segundo aborto sucessivo mostraram-se anormais em aproximadamente 70% dos casos quando a aneuploidia foi detectada no primeiro aborto, e apenas 20% dos casos apresentaram alguma anormalidade quando o primeiro aborto era cromossomicamente normal (Hassold *et al.*, 1980; Carp *et al.*, 2001). Dados recentes, baseados em técnicas de avaliação mais avançadas apontam que a taxa de alterações cromossômicas deva ser ainda maior em abortos de casais com PGR (Caramins *et al.*, 2011). As aneuploidias recorrentes podem indicar predisposição genética para erros gaméticos nos progenitores.

Em casais cromossomicamente normais, polimorfismos em determinados genes têm sido alvo de estudos como fatores de suscetibilidade para a ocorrência de PGR em mulheres saudáveis (Daher *et al.*, 2012). Entre os genes codificantes de citocinas, o *TNF- α* recentemente foi associado às PGR (Finan *et al.*, 2010). Genes codificantes de interleucinas também são alvos de muitos estudos (Bombell & McGuire, 2008). Poucos estudos avaliaram polimorfismos em genes que codificam hormônios, alguns deles sugerem uma variante no gene do receptor da progesterona como possível fator de risco para mulheres com PGR, (Aruna *et al.*, 2010), enquanto outros não confirmam tal associação (Su *et al.*, 2011). Diversos genes relacionados à angiogênese tem sido alvo de estudos, sendo eles o *fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)* (Traina *et al.*,

2011), *óxido nítrico sintase 3 (NOS3)* (Tempfer *et al.*, 2001), codificante da proteína sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS). O gene que codifica para a proteína supressora de tumor p53, envolvido na adequada implantação do blastocisto e no controle celular também tem sido apontado como fator genético de risco para PGR (Pietrowski *et al.*, 2005; Firouzabadi *et al.*, 2009).

A falta de replicação de muitos desses estudos bem como seus resultados conflitantes tornam difícil a inclusão de avaliações de variantes genéticas na prática clínica.

1.2. A família p53

A família de proteínas p53 é uma família de fatores de transcrição cujos membros são: proteína supressora de tumor p53 (p53), proteína tumoral p63 (p63) e proteína tumoral p73 (p73). Essas proteínas compartilham uma estrutura geral e apresentam certo grau de homologia, apresentando algumas funções que se sobrepõem e outras distintas. (Allocati *et al.*, 2012). Através de diferentes mecanismos, p53, p63 e p73 possuem funções primárias no controle do ciclo celular, sendo capazes de induzir parada do ciclo celular e morte celular em respostas a danos no DNA (Flores *et al.*, 2002; Riley *et al.*, 2008). Primeiramente, acreditava-se que as três estavam envolvidas no desenvolvimento tumoral e por isso receberam esses nomes, no entanto, atualmente sabe-se que possuem papel contrário, sendo extremamente importantes na prevenção da formação de tumores (Melino, 2010).

Em geral, todos os membros da família possuem três domínios estruturais que são essenciais para suas funções: um domínio de ligação ao DNA, um domínio de oligomerização e um domínio de transativação (Figura 1). Os genes que codificam os membros dessa família, *tumor protein 53 (TP53)*, *tumor protein 63 (TP63)* e *tumor protein 73 (TP73)*, são transcritos com diferentes isoformas a partir de dois promotores alternativos. Para os genes *TP63* e *TP73* esta estrutura gênica gera isoformas com o domínio de trans-ativação ou com versões aminoterminais truncadas ($\Delta Np63$ and $\Delta Np73$) em que não há o domínio de transativação. Em *TP53*, a transcrição a partir do segundo promotor gera a isoforma $\Delta 133p53$.

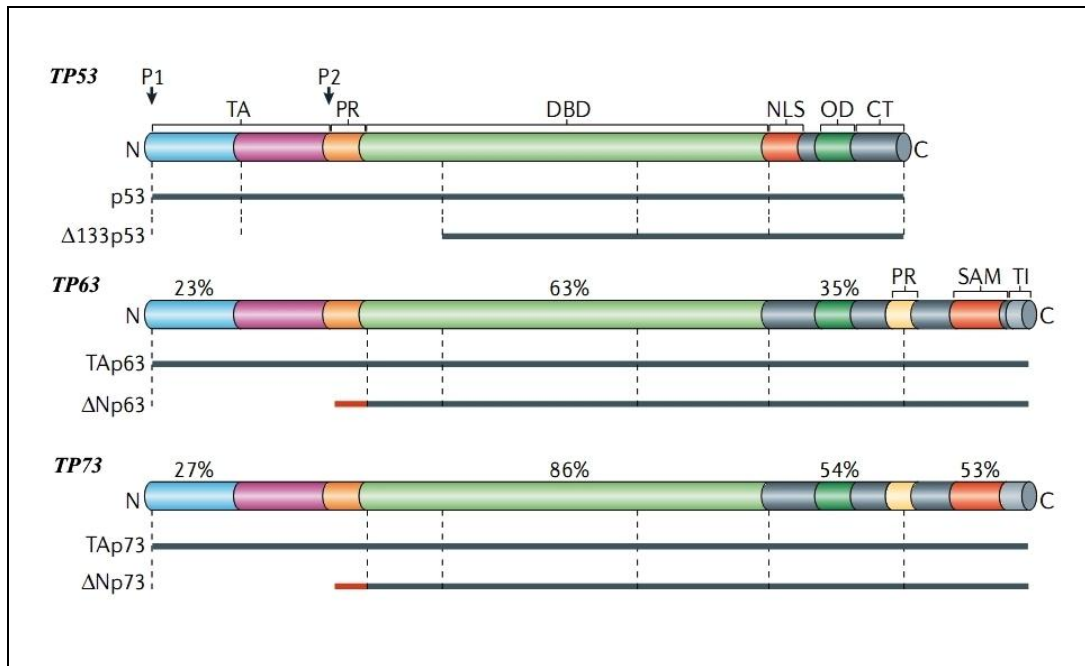


Figura 1. A família p53. Identidade dos domínios e principais isoformas dos genes *TP53*, *TP63* e *TP73*. Porcentagens representam a identidade dos domínios individuais, comparando p53 com p63 e p63 com p73. Sendo 23% e 27% a identidade do domínio de transativação de p53 com p63 e p63 com p73, respectivamente. P1, promotor 1; P2, promotor 2; SAM, domínio motivo estéril α ; CT, Domínio carboxi-terminal; NLS, sinal de localização nuclear; OD, domínio de oligomerização; PR, domínio Pro; TI, domínio inibitório de transcrição. (Adaptado de Levine *et al.*, 2011)

1.2.1. p53

A proteína p53 executa uma função essencial na manutenção da estabilidade genômica nas células somáticas e na prevenção da formação de tumores (Levine *et al.*, 2006). Descoberta em 1979, a p53 atua como um fator de transcrição multifuncional e regula uma resposta celular apropriada para diversos sinais de estresse. Em resposta ao estresse, a p53 ativada transcreve seletivamente um conjunto de genes alvo que iniciam várias respostas celulares incluindo a interrupção do ciclo celular, o reparo do DNA, apoptose e o controle da angiogênese (Hu, 2009). Em células expostas a potentes sinais de estresse decorrentes da formação de tumores como danos ao DNA, hipóxia, expressão de oncogenes, disfunção ribossômica entre outros, p53 promove programas irreversíveis de apoptose ou senescência, através da ativação seletiva de determinados genes controlados pela por essa proteína. Alternativamente, sobre condições de baixo nível de estresse, a p53

protege a célula com controle do ciclo celular, reparo do DNA e produção de proteínas antioxidantes (Brady & Attardi, 2010).

Diversas outras funções de p53 têm sido investigadas em pesquisas recentes. A indicação inicial de que esta proteína atuaria na supressão de tumores tem sido ampliada a partir observações em camundongos *knockout* para seu gene (Tyner *et al.*, 2002). Entre os numerosos processos fisiológicos na qual atua, está seu envolvimento na longevidade e envelhecimento, proteção do embrião a agentes teratogênicos, desenvolvimento inicial, além de seu envolvimento nos transtornos neurológicos e infarto do miocárdio (Tyner *et al.*, 2002; Vousden & Prives, 2009).

Quanto ao papel na reprodução, estudos sugerem que a regulação da reprodução feminina seria uma função primária do gene *TP53* (Hu *et al.*, 2007b; Hu, 2009). Um dos principais mecanismos pelos quais essa proteína atua é através do controle da expressão do gene *fator inibitório da leucemia (LIF)*, que codifica para o Fator inibitório da leucemia (Lif), uma citocina multifuncional que tem uma importante atuação na implantação (Hu *et al.*, 2007b). Estudos em ratos também demonstraram uma importante função dessa proteína na espermatogênese (Rotter *et al.*, 1993).

Outros mecanismos controlados por p53 que estão envolvidos na reprodução são a apoptose e angiogênese que, em situações normais, possuem papel importante no sucesso da gestação (Firouzabadi *et al.*, 2009). A angiogênese executa uma função essencial durante o período da implantação e no desenvolvimento embrionário, sendo que, o desenvolvimento durante uma gestação normal requer uma extensiva angiogênese nos tecidos fetais e maternos, os quais levam a um marcado aumento no fluxo sanguíneo do útero e do cordão umbilical (Reynolds *et al.*, 1992; Reynolds & Redmer, 2001). Quanto a apoptose, sabe-se que desenvolvimento da placenta é um processo dinâmico de proliferação e degradação celular. Em uma placenta com desenvolvimento normal existe pouca ocorrência de apoptose no primeiro trimestre, com aumento da atividade apoptótica com o progresso da gestação. Uma taxa de apoptose anormal pode causar a perda gestacional (Smith *et al.*, 1997).

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17p13.1, sendo o menor gene da família, com 19.198 nucleotídeos e 11 éxons. Recentes estudos em

variantes nesse gene têm encontrado associações positivas entre tais polimorfismos e seus efeitos em doenças humanas. Um importante polimorfismo em *TP53* consiste na alteração c.215G>C, que resulta em uma substituição de uma prolina (Pro) por uma arginina (Arg) no códon 72 da proteína (rs1042522). O alelo Arg é mais funcional que Pro na indução de apoptose e supressão de transformação celular (Dumont *et al.*, 2003), no entanto parece ser menos eficiente na senescência e interrupção do ciclo celular (Salvioti *et al.*, 2005). Além disso, o alelo Pro está relacionado com baixos níveis de Lif levando à infertilidade decorrente de falhas na implantação em animais (Hu *et al.*, 2007b). Diversos estudos associam este polimorfismo com a ocorrência de câncer e outras doenças (Ricks-Santi *et al.*, 2010; Neves Filho *et al.*, 2012). Estudos recentes em mulheres com PGR (Pietrowski *et al.*, 2005; Firouzabadi *et al.*, 2009) apontam esse polimorfismo como um fator de risco importante na ocorrência desse evento.

1.2.2. p63

O envolvimento de p63 no controle do ciclo celular se dá, principalmente, pela sobrevivência das células a qual está envolvida, sendo capaz de promover a morte celular por diferentes vias de regulação gênica. Até o momento, p63 é a única proteína conhecida como essencial para a sobrevivência das células tronco epiteliais. Tais achados se devem a experimentos conduzidos com mutantes para *TP63*, que resultou em um número de síndromes humanas envolvendo o desenvolvimento de membros e displasias ectodérmicas (Celli *et al.*, 1999; van Bokhoven *et al.*, 2001). A deficiência total de p63 em camundongos mostrou também alterações profundas na pele e outros tecidos derivados no ectoderma e apêndices epiteliais incluindo glândulas mamárias e salivares, dentes e folículos pilosos. Tais animais apresentaram anomalias de membros e crânios-faciais (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999).

Em relação à reprodução, experimentos com camundongos demonstraram que a deficiência de p63 causa infertilidade em fêmeas (Suh *et al.*, 2006). Essa proteína é a maior reguladora do processo que controla a qualidade e sobrevivência da linhagem germinativa feminina através da eliminação por apoptose, sendo constitutivamente expressa nas células germinativas femininas durante a parada do ciclo celular meiótico. Experimentos *in vitro*

mostram que p63 é fosforilada quando há danos no DNA, monitorando o reparo desse e induzindo uma apoptose independente de p53 (Kurita *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2006; Gonfloni *et al.*, 2009).

TP63 está localizado no cromossomo 3q27-29, com 265.822 nucleotídeos e dividido em 14 éxons. Um recente estudo conduzido por Feng e colaboradores (2011) encontrou associação entre a alteração c.325-4742T>G no íntron 4 (rs17506395) com infertilidade em mulheres, acentuando a relação de p63 com a reprodução humana e indicando essa variante como um promissor alvo de estudos. Entretanto, até o momento não há estudos que relacionem este polimorfismo com outra patologia nem estudos funcionais deste na proteína.

1.2.3. p73

A proteína p73, assim como as demais de sua família, consiste em um poderoso fator de transcrição (Yang *et al.*, 2002). Sob condições normais, a p73 se mantém em níveis baixos, mas em resposta a danos no DNA, é acumulada na célula e, em decorrência disso exerce sua função pró-apoptótica. Além disso, p73 possui uma importante função no desenvolvimento do sistema nervoso. Estudos com camundongos com ausência de expressão deste gene mostraram um aumento da apoptose nos neurônios simpáticos do gânglio cervical superior, bem como espessura cortical reduzida. Observou-se nesses camundongos redução nas funções motoras e cognitivas, além de atrofia e degeneração neuronal (Meyer *et al.*, 2004; Killick *et al.*, 2011). Outro fenótipo importante para camundongos com ausência de *TP73* são os defeitos de tubo neural, demonstrando seu efeito no desenvolvimento (Collavin *et al.*, 2010). Além disso, outros estudos observaram que a ausência de p73 causa instabilidade cromossômica e desenvolvimento tumoral (Tomasini *et al.*, 2008b; Wilhelm *et al.*, 2010).

No que se refere à reprodução, p73 atua na manutenção da qualidade dos oócitos através do controle do fuso mitótico. A ausência de p73 em camundongos apresentou uma aumentada taxa de anormalidades no fuso mitótico ocasionando diferentes graus de desalinhamento cromossômico (Talos *et al.*, 2007; Tomasini *et al.*, 2008a). Além disso, a p73 garante que a divisão do blastocisto seja normal a nível de alinhamento cromossômico

(Tomasini *et al.*, 2008a, Levine *et al.*, 2011). Outro efeito da deficiência da p73 é a queda na taxa de ovulação, produzindo oócitos incompletos que não apresentam uma progressão normal pelas tubas uterinas (Tomasini *et al.*, 2008b). Sendo assim, pode-se concluir que *TP73* mantém a estabilidade genômica a nível cromossômico e alterações nesse gene podem aumentar a susceptibilidade a aneuploidias nas células germinativas.

O gene *TP73* situa-se no cromossomo 1p36.31, possui 80.728 nucleotídeos e 14 éxons. Possui duas variantes polimórficas importante citadas na literatura: 4 c.-30G>A e 14 c.-20C>T (rs2273953, rs1801173), completamente ligados, sendo considerados, assim, como um mesmo alelo (Hamajima *et al.*, 2002 ; Scacchi *et al.*, 2009). Esses polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) estão localizados anteriormente ao códon de iniciação AUG no éxon 2, uma região que pode formar uma estrutura em forma de grampo, com potencial de interferir na expressão gênica (Kaghad *et al.* 1997). Estudos nesses polimorfismos têm encontrado associações entre tais variantes e o risco aumentado para Doença de Alzheimer, leucoplasia (Hamajima *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2009; Scacchi *et al.*, 2009). Uma recente meta-análise demonstrou que o genótipo AT/AT está significativamente associado com diversos tipos de câncer em diversas populações (Liu *et al.*, 2011). Tais achados demonstram a importância desse polimorfismo na estrutura e expressão da p73. Apesar de um grande número de estudos desses polimorfismos em câncer, há poucos estudos relacionados a problemas de reprodução humana, além de não haver estudos dessas variantes em mulheres com PGR.

1.2.4. Regulação da família p53

Considerando a importância das proteínas da família p53, a atividade inapropriada dessas pode ser prejudicial à viabilidade da célula e do organismo. Para que ocorra uma atividade adequada, é necessário um controle dos níveis dessas proteínas na célula, sendo este feito por uma via de sinalização que os regula (Figura 2). Diversas proteínas estão envolvidas nessa rota, sendo a mais importante a proteína E3 ubiquitina ligase Mdm2 (Mdm2), que faz a regulação negativa, mantendo-as em níveis baixos quando estas não são requeridas pela célula (Brooks & Gu, 2006). Outras duas importantes proteínas são: a

proteína Mdm4 (Mdm4) e a protease de processamento ubiquitina-específica 7 (Usp7). São esses os principais reguladores da família p53 (Collavin *et al.*, 2010; Zdzalik *et al.*, 2010).

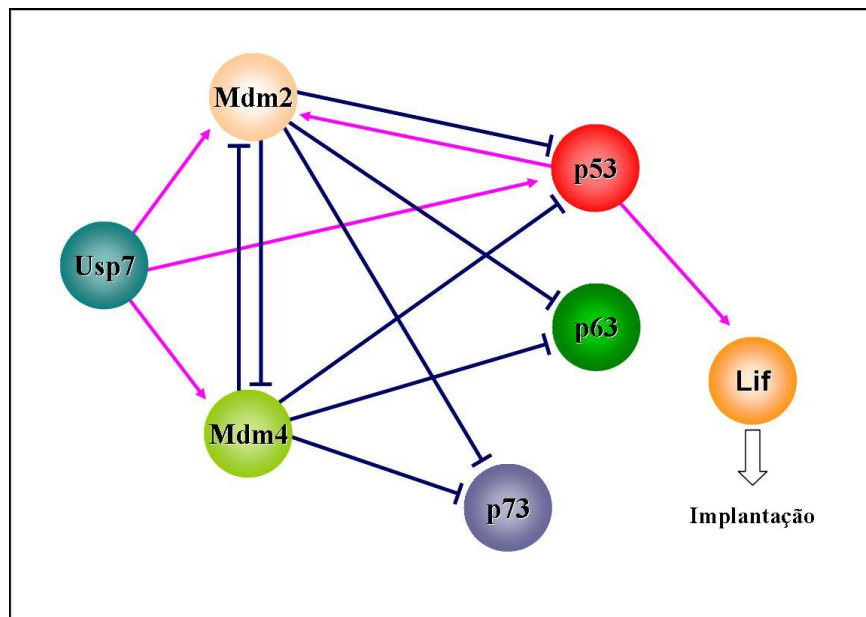


Figura 2. Regulação da família p53. Linhas azuis representam regulação negativa; Linhas rosa representam regulação positiva. (Adaptado de Kang *et al.*, 2009)

1.2.4.1. Mdm2

Mdm2 é um regulador negativo crucial de p53, o qual forma um ponto central na rota. Mdm2 liga-se à p53 e causa sua degradação através da sua atividade de E3-ubiquitina ligase (Momand *et al.*, 1992), fazendo a poliubiquitinação (adição de moléculas de ubiquitina) da p53, enviando-a para o proteossomo onde é degradada, e assim, bloqueando sua habilidade de funcionamento como um fator de transcrição (Brooks *et al.*, 2007). A p53 também controla o gene de Mdm2 através da ativação da transcrição, promovendo um *feedback* negativo para atenuar a sinalização dessa proteína em determinados momentos (Brady & Attardi, 2010). O controle de Mdm2 sobre p63 e p73 tem sido estudado recentemente, não estando completamente esclarecido. Zdzalik e colaboradores (2010) mostraram que Mdm2 interage com p63 e regula sua atividade através da ligação ao seu domínio de trans-ativação. A regulação de Mdm2 sobre p73 se dá através de forma diferente da efetuada sobre p53. Mdm2 não degrada p73, apenas impede sua interação com

acetiltransferases e fatores associados a RNA polimerase, reprimindo assim sua atividade transcricional (Dobbelstein *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 1999).

O gene *proteína homóloga (camundongo) E3 ubiquitina ligase Mdm2 (MDM2)* está localizado no cromossomo 12q14.3-15 e possui um importante polimorfismo em uma região intrônica-promotora no íntron 1, c.14+309T>G, conhecido como SNP309 (rs2279744). Este SNP afeta o nível de expressão gênica, na qual o alelo G aumenta a afinidade de ligação do fator de transcrição do *MDM2*, resultando em um maior nível transcricional e, conseqüente atenuação das proteínas as quais Mdm2 se liga (Bond *et al.*, 2004). Ainda, o SNP309 situa-se em uma região diretamente regulada pela sinalização do estrogênio, que estimula preferencialmente o alelo G (Hu *et al.*, 2007a). Por ser capaz de diminuir os níveis de p53, esse polimorfismo tem sido amplamente estudado em diversos casos de tumores. O alelo G tem sido encontrado em uma maior freqüência em pacientes com carcinoma hepático (Acun *et al.*, 2010), câncer de mama precoce (Lang *et al.*, 2009), leucemia mielóide aguda (Xiong *et al.*, 2009) entre outros tipos de câncer.

1.2.4.2. Mdm4

A proteína Mdm4, codificada pelo gene *proteína homóloga (camundongo) de ligação ao p53 Mdm4 (MDM4)*, é uma proteína homóloga à Mdm2 que também tem a capacidade de regular a atividade da p53, p63 e p73. Mdm4 interage com Mdm2 formando um heterodímero com uma alta capacidade de ubiquitinação, levando, assim, à degradação da p53 (Marine *et al.*, 2007; Wade *et al.*, 2010). Outra forma pela qual Mdm4 pode controlar a p53 é na regulação da expressão do seu gene. Essa forma de regulação ainda é pouco compreendida, mas sabe-se que Mdm4 está envolvida na via de acetilação de *TP53*, afetando sua transcrição (Sabbatini & McCormick, 2002; Danovi *et al.*, 2004). Ainda, Mdm4 controla os níveis de Mdm2 inibindo sua auto-ubiquitinação. Mdm4 pode, também, ser controlado por Mdm2 através da ubiquitinação (Marine *et al.*, 2007). Os meios pelos quais Mdm4 regula p63 e p73 são pouco compreendidos, no entanto, sabe-se que essa proteína se liga aos domínios de trans-ativação destas de maneira semelhante à que se liga a p53, porém com uma ligação mais fraca (Zdzalik *et al.*, 2010).

O gene *MDM4*, localizado no cromossomo 1q32, possui um polimorfismo no íntron 9 no qual há uma substituição c.753+572C>T (rs1563828). Tal polimorfismo vem sendo estudado como fator de risco para câncer, no qual o genótipo TT foi associado com câncer de mama precoce (Reincke *et al.*, 2008) e em recente estudo, com infertilidade, tanto o genótipo TT quanto o alelo T foram encontrados em maior frequência nas mulheres com problemas de infertilidade (Kang *et al.*, 2009). Mesmo com a importante função dessa proteína na regulação da p53, o efeito dessa variante sobre o *MDM4* e conseqüente efeito sobre a rota ainda não é bem compreendido.

1.2.4.3. Usp7

O controle de p53 não é feito apenas por ubiquitina ligases. A estabilização dos níveis e da atividade dessa proteína conta também com uma enzima Usp7, que deubiquitina a p53, protegendo-a da degradação (Shan *et al.*, 2008). Além da p53, Usp7 pode estabilizar também Mdm2 e Mdm4, deubiquitinando essas proteínas. Dessa forma, Usp7 funciona como uma importante reguladora da rota como um todo (Meulmeester *et al.*, 2005; Brooks *et al.*, 2007). O gene *peptidase ubiquitina-específica 7 (herpes vírus associado) (USP7)* foi inicialmente identificado como um fator celular associado ao herpesvírus e, recentemente foi identificada sua forte associação com p53 e seu efeito sobre Mdm2 e Mdm4. A inter-relação entre p53, Mdm2, Mdm4 e Usp7 forma um sistema celular responsável por mudanças na função de Usp7. Em determinadas condições, como, por exemplo, danos ao DNA, em que a atividade de p53 é exigida, Usp7 pode exclusivamente deubiquitiná-la; em outras condições, sua função fica apenas sobre Mdm2 (Brooks & Gu, 2004). Uma importante variante do gene *USP7*, situado no cromossomo 16p13.3, consiste na alteração c.2719-234G>A no íntron 25 (rs1529916). Em um estudo recente, Kang e colaboradores (2010) associaram o alelo A com infertilidade. Além disso, demonstram haver pressões seletivas sobre este polimorfismo, decorrente de sua alteração na reprodução através de seu efeito sobre p53. Diferentemente de Mdm2 e Mdm4, até o momento não há dados que indiquem algum efeito de Usp7 sobre p63 e p73 (Collavin *et al.*, 2010)

1.3. O Fator Inibitório da Leucemia e a Implantação

O Fator Inibitório da Leucemia é de uma citocina pleiotrópica expressa em diversos tecidos e tipos celulares. Ainda que originalmente identificada como um fator de diferenciação das células hematopoiéticas (Stahl *et al.*, 1990), outras funções fisiológicas têm sido encontradas para essa proteína, entre elas a diferenciação de células tronco-embrionárias, estímulo de diferenciação e sobrevivência de células neuronais e o envolvimento na reação do complexo de defesa como a participação na defesa de hepatócitos (Gearing *et al.*, 1992; Metcalf D, 1992; Escary *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1994). Além disso, é considerada uma importante mediadora do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse, sendo marcadora de doenças e respostas inflamatórias agudas (Akita *et al.*, 2006).

Uma importante função fisiológica dessa proteína está no seu efeito sobre a reprodução através da implantação, sendo Lif um fator essencial nesse processo (Stewart *et al.*, 1992). Durante o período de implantação do blastocisto, o gene *LIF* possui sua transcrição aumentada nas glândulas endometriais, com isso Lif é secretada no lúmen do útero e liga-se aos receptores na superfície das células epiteliais, tornando o útero receptivo ao blastocisto, tal processo é chamado de decidualização (Cullinan *et al.*, 1996). Experimentos com camundongos que não expressavam *LIF* demonstraram defeitos na reprodução decorrente da completa falta de decidualização e assim, falha na implantação, a qual pôde ser resgatada por injeções de Lif durante esse período (Chen *et al.*, 2000). O mesmo ocorreu com camundongos *knockout* para *TP53* devido à significativa queda dos níveis uterinos de Lif. Tal efeito é explicado pelo fato de Lif ser regulada por p53 (Figura 2) e estrogênio (Hu *et al.*, 2007b).

O gene *LIF*, localizado no cromossomo 22q12.2, tem sido alvo de diversos estudos que avaliam sua expressão e alterações gênicas em relação a diferentes desfechos clínicos. Giess *et al.* (1999) em um estudo com mutações nesse gene, encontrou associação positiva entre o efeito dessas na diminuição da expressão ou liberação de Lif e infertilidade.

Um polimorfismo que tem sido alvo de recentes estudos é o c.1414T>G situado na região 3'UTR (rs929271), que reduz a estabilidade do mRNA podendo potencialmente causar a redução da expressão gênica. Como Lif é uma proteína com diversas funções,

entre elas a diferenciação de células neuronais, esse polimorfismo foi estudado em pacientes com esquizofrenia e associado positivamente com essa condição (Okahisa *et al.*, 2010). Recentemente, a variante G foi relacionada com casos de infertilidade ocasionada por falhas de implantação (Kang *et al.*, 2009), porém, tal variação, aqui considerada importante devido a seu efeito sobre a expressão do gene, ainda não foi estudada em mulheres com perdas gestacionais.

CAPITULO 2
Justificativa e Objetivos

Mesmo com a intensa busca por explicações que ajudem no entendimento da etiologia das PGR através de estudos em mulheres com este problema, atualmente, consegue-se explicar apenas a causa de metade dos casos, podendo-se considerar as PGR como um grave problema reprodutivo.

Ainda, conhecendo-se o envolvimento da família proteica p53 e de seus reguladores na reprodução, sendo no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, controle do fuso mitótico ou implantação, cuja profundidade e qualidade são essenciais para uma gestação adequada, o estudo de variantes nesses genes pode ajudar na elucidação dos mecanismos genéticos envolvidos nas PGR podendo contribuir no diagnóstico e prognóstico, além de beneficiar o aconselhamento genético desses casos.

2.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito das variantes polimórficas nos genes da família p53 e seus principais reguladores, como fator de risco para perdas gestacionais recorrentes.

2.2. Objetivos Específicos

a) Analisar e comparar a frequência dos polimorfismos c.215G>C - Pro72Arg de *TP53* (rs1042522), c.325-4742T>G de *TP63* (rs17506395), 4c.-30G>A e 14c.-20C>T de *TP73* (rs2273953, rs1801173), c.14+309T>G de *MDM2* (rs2279744), c.753+572C>T de *MDM4* (rs1563828), c.2719-234G>A de *USP7* (rs1529916) e c.1414T>G de *LIF* (rs929271), entre mulheres com duas ou mais perdas gestacionais repetidas e em mulheres com pelo menos dois filhos e sem história prévia de abortos ou de infertilidade.

b) Comparar a frequência dessas variantes entre subgrupos de mulheres com perdas gestacionais, a saber: (i) mulheres com perdas gestacionais recorrentes primárias e mulheres com perdas gestacionais recorrentes secundárias; (ii) mulheres com apenas duas perdas gestacionais recorrentes e mulheres com três ou mais perdas gestacionais.

c) Analisar a interação desses polimorfismos entre si e sua relação com outros fatores ambientais de risco para perdas gestacionais.

CAPÍTULO 3

p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss

Manuscrito submetido ao periódico *Molecular Human Reproduction*

p53 and recurrent pregnancy loss

p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss

L.R. Fraga¹; C.G. Dutra¹; J.A. Boquett¹; F.S.L. Vianna^{1,2}; R.O. Gonçalves³; D.D. Paskulin¹; O.L. Costa³; P. Ashton-Prolla^{1,2,4}; M.T.V. Sanseverino^{2,4}; L. Schuler-Faccini^{1,2,4}

¹Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 91501-970, Brazil.

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

³Post-Graduation Program in Biotechnology in Health and Investigative Medicine and Department of Obstetrics, Gynecology and Human Reproduction, Medical School, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, 40.110-100, Brazil.

⁴Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

*Corresponding author:

Lavinia Schuler-Faccini, MD, PhD

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Caixa Postal 15031 – Agencia Campus UFRGS

CEP 91501-970 / Porto Alegre – RS – Brasil

Phone: (51) 33598008 Fax: (51) 33598011

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Abstract

The p53 protein is known for performing essential functions in the maintenance of genomic stability in somatic cells and prevention of tumor formation. Studies of the p53 signaling pathway have suggested associations between some polymorphisms and infertility, post-*in vitro* fertilization implantation failure and recurrent abortions. The *TP53* Pro72Arg polymorphism has been implicated as a risk factor for recurrent pregnancy loss (RPL); however, the association is controversial. In this study, our objective was to evaluate five polymorphisms in genes of the p53 signalling pathway [*TP53* c.215G>C (Pro72Arg), *MDM2* c.14+309T>G (SNP309), *MDM4* c.753+572C>T in intron 9, *USP7* c.2719-234G>A in intron 25, and *LIF* c.1414T>G in the region 3' UTR] as risk factors for RPL. Through a case-control study, we investigated 120 women with two or more pregnancy losses and 143 fertile control women reporting at least two live births and no history of pregnancy loss. When analyzed separately, the allele and genotype distributions of the 5 polymorphisms in the two groups were not different. However, the simultaneous presence of *TP53* genotypes Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) was more frequent among women with RPL. In a multivariate analysis adjusted for alcohol consumption, smoking, ethnicity, and number of pregnancies, this interaction increased the risk for RPL (OR = 2.58, 95% CI: 1.31 – 5.07, p = 0.006). In conclusion, our study indicates that the combination of *TP53* Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) genotypes may be a risk factor for RPL.

Key words: *MDM2*/p53/polymorphism/recurrent pregnancy loss/reproduction

Introduction

Recurrent pregnancy loss (RPL) is defined as the occurrence of two or more consecutive pregnancy losses before 24 weeks of gestation (ACOG, 2000; Rai and Regan, 2006). This condition affects about 5% of couples in the reproductive period of their lives (Branch *et al.*, 2010) and can be classified as: (a) primary RPL, in which all pregnancies are lost or (b) secondary RPL, when at least one successful pregnancy to term with a liveborn child is reported, regardless of the number of miscarriages (Pandey *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2010).

The etiology of RPL has been widely studied. Among the most common causes are genetic, morphological, hormonal, metabolic, infectious, environmental, and immunologic alterations, as well as thrombophilias and advanced maternal age (Laurino *et al.*, 2005). A specific cause for RPL is clearly identified in only about 50% of cases (Toth *et al.*, 2010).

The p53 protein, known for performing essential functions in the maintenance of genomic stability in somatic cells and prevention of tumor formation (Levine *et al.*, 2006), also plays an essential role in human reproduction (Hu, 2009). p53 is involved in the protection of female germinative cells and embryos against teratogenic agents, and induces the expression of the leukemia inhibitor factor (Lif) protein, which is an important mediator of embryo implantation (Brady and Attardi, 2010; Hu, 2009; Hu *et al.*, 2007).

The signaling pathway that regulates the levels of p53 protein is negatively controlled by ubiquitin ligases including the proteins E3 ubiquitin ligase Mdm2 (Mdm2) and Mdm4 (Mdm4), and is positively controlled through the deubiquinase Ubiquitin Specific Peptidase 7 (Usp7) (Brooks and Gu, 2006). Mdm2 acts in a central regulatory point, binding to p53 and causing its degradation through polyubiquitination and consequent degradation and attenuation of its activity (Bond *et al.*, 2004; Brooks *et al.*,

2007). Mdm4 interacts with Mdm2 to form a heterodimer with a high capacity for ubiquitination, leading also to p53 degradation (Marine *et al.*, 2007, Wade *et al.*, 2010). Mdm4 can also control p53 expression through its involvement in the acetylation pathway of the gene (Danovi *et al.*, 2004; Sabbatini and McCormick, 2002). Finally, Usp7 deubiquitinates p53, Mdm2, and Mdm4, protecting all proteins from degradation. Thus, Usp7 acts as an important stabilizer of this signaling pathway (Brooks *et al.*, 2007; Meulmeester *et al.*, 2005).

Some polymorphisms in this pathway have been implicated with adverse pregnancy outcomes like infertility (Kang *et al.*, 2009), recurrent implantation failure (Firouzabadi *et al.*, 2009), twinning (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2012), and missed abortions (Fang *et al.*, 2011). The Pro72Arg polymorphism of *TP53* has been considered a risk factor for RPL. However, there is no consistent replication of the observed results (Coulam *et al.*, 2006; Firouzabadi *et al.*, 2009; Kaare *et al.*, 2009; Pietrowski *et al.*, 2005). The Pro72Arg polymorphism of the *TP53* gene results in the alteration c.215G> C in exon 4 of the gene and modifies the apoptosis induction (Buchman *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 2003). SNP309 (c.14+309T>G), located in the intronic promoter region of the *MDM2* gene affects the level of gene expression and consequently the levels of Mdm2 and p53 (Bond *et al.*, 2004). The polymorphism c.1414T>G, located in the 3' UTR region of the *LIF* gene (rs929271), reduces the stability of the mRNA (Giess *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2009). The substitutions c.753+572C>T in intron 9 of the *MDM4* gene (rs1563828) and c.2719-234G>A in intron 25 of the *USP7* gene (rs1529916), have not known effects until now (Kang *et al.*, 2009).

Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of the aforementioned polymorphisms and their effects on the risk of RPL in a Brazilian population sample.

Material and Methods

Subjects

This is a case-control study in which we assessed women diagnosed with primary RPL at the Prenatal Diagnosis Clinic of the Medical Genetics Service (DPN-SGM) of Hospital de Clinicas in Porto Alegre (HCPA), in Southern Brazil, between 2000 and 2011. All women reporting at least two pregnancy losses before 24 weeks of gestation with the same partner, and with no report of a full-term pregnancy were invited for the study, of which 130 were recruited. We performed a structured interview to obtain information about demographics, gynecological/obstetric history, medical history, current or past use of tobacco (yes-no), alcohol consumption (yes-no), consumption of other drugs or medications, family history of malformations, age at recruitment, weight, height, and occupation. All women were subjected to a preliminary standard diagnostic protocol including hysteroscopy, laparoscopy, ultrasound, and comprehensive determination of hormonal status (gonadotrophins, FSH, LH, prolactin, thyroid hormones, thyroperoxidase) in order to detect known causes for the pregnancy losses, before inclusion in the study. Karyotypic examination of peripheral lymphocytes was conducted to detect chromosomal abnormalities in all couples, and immunological risk factors were investigated through assessment of anticardiolipin, lupus anticoagulant and antinuclear antibodies. Presence of any maternal clinical condition that could prevent full-term pregnancies (e.g. uterine abnormality) was considered an exclusion criterion for this study.

The control group consisted of 143 healthy women who reported at least two live births and no history of pregnancy loss or infertility. These women were randomly selected

to participate in the study during a blood collection for routine laboratory analyses at HCPA and verbally answered a standardized questionnaire, which asked about demographics, consanguinity, family history, and information about the pregnancy.

This research study was approved by the Institutional Review Board (Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre) under protocol number #11-242. Patients were recruited after signature of informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Genotyping

Genomic DNA was obtained from saliva using the Oragene® DNA collection kit (DNA Genotek Inc., Canada) in accordance to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was quantified with PicoDrop 100 (Picodrop Limited, United Kingdom) equipment. Genotyping *TP53* Pro72Arg rs1042522, *MDM2* SNP309 rs2279744, *MDM4* rs1563828, *USP7* rs1529916 and *LIF* rs929271 was performed by allelic discrimination using the TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems, USA); assay numbers: C__2403545_10 (*TP53*), C__9493064_10 (*MDM4*), C__9688119_1_ (*USP7*), and C__7545904_10 (*LIF*). *MDM2* SNP309 was assessed with a customized (assay-by-design) assay using probes FAM-TCCCGCGCCGCAG and VIC-CTCCCGCGCCGAAG, forward primer 5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3'; and reverse primer 5'-ACAGGCACCTGCGATCATC-3'. PCR reactions were conducted in 96-well plates, with each reaction containing: 10ng of genomic DNA, 2 x TaqMan® Genotyping MasterMix (Applied Biosystems, USA), probes specific for each SNP (40x), and water in sufficient quantity for a final reaction volume of 8µl. The PCR conditions were as follows: 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 75 s each (95°C for 15 s and 63°C for 60 s). *MDM2*

SNP309 genotyping was also conducted in 96-well plates, with each reaction containing: 10ng of genomic DNA, 2 x TaqMan® Genotyping MasterMix (Applied Biosystems, USA), 1µM of each primer and probe, and water to reach a final volume of 25µM. *MDM2* PCR conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of 75 s (95°C for 15 s and 60°C for 60 s). All the reactions were performed in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) and the results were analyzed using StepOne v.2.2.2 Software (Applied Biosystems, USA).

Statistical Analyses

Sample characterization and comparisons between groups (cases and controls) were done using the Mann-Whitney *U*-test for continuous variables and the Pearson chi-square test for categorical variables. Cases and controls were compared for their genotypic and allelic frequencies, and Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the Pearson chi-square test. Multivariate binary logistic regression analysis was used to evaluate gene-gene interactions, and conduct multiple tests in which the interaction between the *TP53* Arg/Arg genotype (rs1042522) and other risk genotypes from other genes were present. To achieve this, manual replacement of these different interaction terms was performed along with the other known clinical risk factors (smoking, alcohol consumption, and number of pregnancies, as well as ethnicity – using only European ancestry as the reference category). Whenever p-value was <0.20, the variable was included as a covariate in a Multivariate Logistic Regression analysis. The odds ratios (OR) with respective confidence intervals (CI) of 95% were calculated to assess the relative risk conferred by each covariate. Sample size for this study was calculated using the EpiInfo software, version 6.0, with the parameters being an alpha value of 0.05 and 80% power. All other analyses cited above

were performed using the Statistical Package for Social Sciences software, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Alpha values less than 0.05 were considered significant. The Bonferroni correction was applied to five tests in the multivariate binary logistic regression ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0.01$).

Results

From the original, consecutive sample of 130 women with RPL, 120 were included after initial cytological, hormonal, morphological, immunological and karyotype exams identified no abnormalities. In ten (7.7%) women karyotypic alterations were identified.

In the RPL group, 41 women (34.2%), 41 (34.2%) and 38 (31.7%) reported two, three and four losses, respectively. The number of reported pregnancies was higher in the RPL group than in the control group (Table 1). Average age at recruitment was also higher in the RPL group: 45.2 (± 9.1) versus 33.2 (± 7.5) ($p < 0.001$). However, the average age at first pregnancy did not differ between groups. Women with RPL had higher alcohol consumption, and also a greater proportion of non-European ethnicity when compared to the control group.

There was no difference between the two groups for allelic and genotypic distributions of all SNPs, when analyzed separately (Table 2) and all genotypic and allelic frequencies were within the expected by the Hardy-Weinberg distribution.

The most appropriate model of multiple associations obtained in this analysis is presented in Table 3. The frequency of women carrying the *TP53* Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) genotypes was 32 (27.0%) in the RPL group and 24 (16.8%) in the control group (OR=2.58; 95% CI: 1.31-5.07; $p=0.006$). When the Bonferroni correction was applied for multiple comparisons this effect remained statistically

significant. Binary logistic regression analysis allowed estimating the probability of pregnancy loss for a carrier of these genotypes. The estimated probability was 71% for carriers and 48% for non-carriers, considering the overall average number of pregnancies of 3.16. When the subgroup of women reporting European ethnicity was evaluated independently, the effect of the interaction remained significant both in univariate (OR = 2.30, 95% CI: 1.16 to 4.55, $p = 0.017$) and multivariate (OR = 2.77, 95% CI: 1.31 to 5.85, $p = 0.008$) analyses.

Discussion

In this study, we focused on selected polymorphisms in the p53 signaling pathway and their interactions as possible risk factors for RPL. No associations were identified between RPL and the 5 SNPs studied when they were assessed separately. However, multivariate logistic regression analysis showed that the interaction between genotypes *TP53* Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) increased the risk of RPL 2.58 times, when corrected for smoking, alcohol consumption, ethnicity, and number of pregnancies.

Several studies have sought associations between SNPs and RPL. Genes such as *tumor necrosis factor alpha (TNF- α)* (Daher *et al.*, 2003; Finan *et al.*, 2010; Prigoshin *et al.*, 2004), *vascular endothelial growth factor (VEGF)* (Su *et al.*, May 2011) and *nitric oxide syntase 3 (NOS3)*, which encodes the eNOS protein, (Tempfer *et al.*, 2001) are considered to be relevant to the origin of RPL.

Regarding the *TP53* gene, to date only four studies have evaluated the Pro72Arg polymorphism in women with RPL (Table 4) (Coulam *et al.*, 2006; Firouzabadi *et al.*, 2009; Kaare *et al.*, 2009; Pietrowski *et al.*, 2005). In these studies only genotypic data were

considered, and neither environmental variables nor interactions between different SNPs were assessed. The allelic and genotypic frequencies of the *TP53* Pro72Arg SNP in our study were similar to those described by the International HapMap Project database, and to those observed in previously in the Southeastern Brazilian population (Marcel *et al.*, 2009; Thurow *et al.*, 2011).

TP53 Pro72Arg has been associated with an increased risk for developing several tumors and with adverse pregnancy outcomes (Hu, 2009). Functional studies indicate that the Arg allele is more effective in inducing apoptosis and suppression of cellular transformation (Dumont *et al.*, 2003) while seems to be less effective in inducing senescence and interruption of the cell cycle (Salvioli *et al.*, 2005). Arg is also more effective in inducing the expression of LIF, an essential step to ensure appropriate uterine conditions for blastocyst implantation (Cullinan *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 1992). Thus, the efficiency of p53 is directly reflected in implantation and fertility and a few studies have linked the Pro allele with infertility resulting from implantation failure (Feng *et al.*, 2011; Kay *et al.*, 2006).

MDM2 SNP309 is located in the promoter region (intron 1) of the gene and affects the level of gene expression. The G allele increases binding affinity of the transcription factor of *MDM2*, resulting in a higher transcriptional level when compared to the T allele and increased degradation of p53 (Bond *et al.*, 2004). The interaction between the *TP53* Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) genotypes observed here, which is associated with an increased risk for RPL, likely results from . reduced transcriptional levels of Mdm2 (and consequent degradation of p53) coupled to the increased effectiveness of the *TP53* Arg/Arg genotype in inducing apoptosis. Thus, these genotypes seem to synergistically increase the levels and functionality of p53 in relation to apoptosis,

an effect that has been shown to increase the rate of abortion in mice (Norimura *et al.* 1996).

p53-mediated apoptosis is involved in a number of mechanisms related to human reproduction, such as ovarian cell death for its homeostasis (Amsterdam *et al.*, 2003) and formation and development of the placenta (Halperin *et al.*, 2000b; Watson and Cross, 2005). p53 is expressed in the trophoblast at all stages of gestation, but with an increase in the first quarter - a critical period for embryo selection (Cohen *et al.* 2007; Marzusch *et al.*, 1995). In addition, p53 regulates genes in the trophoblast cell invasion process, which involves degradation and remodeling of the extracellular matrix of the uterus (Cohen *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2005). However, despite being an integral part of many reproductive functions, apoptosis may be pathological and damaging during reproduction in certain scenarios (Halperin *et al.*, 2000a). Increased apoptosis in the maternal-fetal interface has been associated with several reproductive disorders including preeclampsia and intrauterine growth restriction. Furthermore, studies in mice clearly suggest an interaction between increased p53 expression, excessive apoptosis and pregnancy loss (Minas *et al.*, 2007; Veljkovic Vujaklija *et al.*, 2012; Savion *et al.* 2002) Further investigations have shown that the p53 protein is highly expressed in human placentas of abnormal pregnancies (Hu *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2007).

Based on our results, we hypothesize that with a *TP53* Arg/Arg background there is an enhanced induction of apoptosis, contributing to post-implantation selection which is directly reflected in intra-uterine survival. This mechanism may be functioning as a post-zygotic selection step, since the majority of RPLs seem to be due to a high rate of embryo aneuploidies (Hodes-Wertz *et al.*, Jan, 2012; Quenby *et al.*, 2002). Additional support for this hypothesis is provided by the study of Norimura *et al.* (1996) which shows that p53^{+/+}

pregnant mice exposed to X-rays exhibited a higher rate of apoptosis, reduced survival of abnormal fetuses, and a higher rate of death and abortion of normal fetuses. In addition, a study in horses (*Thoroughbred mares*) identified a higher frequency of the *TP53* Arg/Arg genotype in animals with pregnancy loss (Leon *et al.*, 2012).

With respect to established environmental risk factors for RPL, only alcohol consumption was associated to RPL. The adverse effects of alcohol consumption, even in small doses, have been previously described and include fertility and development aspects (Kesmodel *et al.*, 2002; Kumar, 2011; Rai and Regan, 2006). Smoking was not associated with RPL, and although data in the literature are quite controversial, several studies implicate smoking as a dose-dependent risk factor for pregnancy loss, an information that we were not able to retrieve (Kumar, 2011; Lindbohm *et al.*, 2002; Rai and Regan, 2006). Although we were unable to identify published data on an association of ethnic origin with RPL, one of the SNPs implicated as a risk factor here (the *TP53* Arg allele) has suffered strong selective pressure in recent history and its frequency is distributed quite differently among European and African populations (Feng *et al.*, 2011). For this reason, this particular genotype was included in the multivariate regression model.

In conclusion, this is the first study implicating the combined inheritance of *TP53* Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) genotypes as a risk factor for RPL. We hypothesize that the mechanism by which this interaction is acting to contribute to RPL involves post-implantation p-53 mediated embryo selection through apoptosis induction. Although these findings do not currently have a significant clinical impact, they underscore that the investigation of genetic variants of smaller effect can still contribute to our understanding of the mechanisms underlying common complex conditions such as RPL.

Funding

This work was supported by Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Fundo de Apoio a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Sidia Maria Callegari Jacques for her assistance in the statistical analysis of the data.

Table 1: Demographic and Clinical Data of Women reporting RPL and Controls

Characteristic	RPL group N=120	Control group N=143	P
Number of pregnancies [mean (SD)]	3.4 (1.7)	2.9 (1.2)	<0.001 ^{MW}
Age at first pregnancy [mean (SD)]	24.4 (7.7)	22.0 (4.7)	0.123 ^{MW}
Smoking [N (%)]	17 (14.2)	33 (23.1)	0.067 ^{X2}
Alcohol consumption [N (%)]	54 (45.0)	25 (17.6)	<0.001 ^{X2}
Consanguinity [N (%)]	3 (2.5)	1 (0.7)	0.228 ^{X2}
Non-European ancestry ^a [N (%)]	52 (44.3)	22 (15.4)	<0.001 ^{X2}

N: number; SD: Standard Deviation; X2: Pearson chi-square test; MW: Mann-Whitney *U*-test; ^aNon-European ancestry was determined for subjects who: (i) reported familiar history of non-European ancestry or (ii) have characteristic traits Non-Europeans.

Table 2: Allelic and genotype frequencies of the polymorphisms from the p53 signaling pathway in women with RPL and controls

Gene	Genotype/Allele	RPL group	Control group	<i>P</i> ^a
		n (%)	n (%)	
<i>TP53</i> (rs1042522)	Arg/Arg	57 (47.5)	72 (50.3)	0.324
	Arg/Pro	47 (39.2)	60 (42)	
	Pro/pro	16 (13.3)	11 (7.7)	
	Arg	161 (67.1)	204 (71.3)	
	Pro	79 (32.9)	82 (28.7)	
<i>MDM2</i> (rs2279744)	TT	60 (50.0)	59 (41.3)	0.301
	TG	45 (37.5)	59 (41.3)	
	GG	15 (12.5)	25 (17.4)	
	T	165 (68.7)	177 (61.9)	
	G	75 (31.3)	109 (38.1)	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	38 (31.7)	47 (32.9)	0.966
	TC	59 (49.2)	68 (47.6)	
	TT	23 (19.2)	28 (19.6)	
	C	135 (56.2)	162 (56.3)	
	T	105 (43.8)	124 (43.4)	
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	61 (50.8)	79 (55.2)	0.749
	GA	49 (40.8)	52 (36.4)	
	AA	10 (8.3)	12 (8.4)	
	G	171 (71.2)	210 (73.4)	
	A	69 (28.8)	76 (26.6)	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	64 (53.3)	66 (46.2)	0.499
	TG	45 (37.5)	63 (44.1)	
	GG	11 (9.2)	14 (9.8)	
	T	173 (72.1)	195 (68.2)	
	G	67 (27.9)	91 (31.8)	

^a*P*-values obtained by chi-square test.

Table 3: Analysis of Univariate and Multivariate Logistic Regression for the effect of the interaction of the *TP53* Arg/Arg (rs1042522) and *MDM2* TT (rs2279744) genotypes in the risk of recurrent pregnancy losses, corrected for alcohol consumption, smoking, ethnicity, and number of pregnancies.

Variables	Univariate Analysis ^a			Multivariate Analysis ^{a, b}		
	Regression coefficient	OR (CI 95%)	<i>P</i>	Regression coefficient	OR (CI 95%)	<i>P</i> ^c
<i>TP53</i> Arg/Arg + <i>MDM2</i> TT	0.589	1.80 (0.99 to 3.27)	0.51	0.948	2.58 (1.31 to 5.07)	0.006
Alcohol Consumption	1.343	3.82 (2.18 to 6.71)	<0.001	1.467	4.33 (2.29 to 8.17)	<0.001
Smoking	-0.598	0.55 (0.28 to 1.05)	0.69	-0.935	0.39 (0.18 to 0.83)	0.015
Ethnicity	-1.436	0.23 (0.13 to 0.42)	<0.001	-1.457	0.23 (0.12 to 0.44)	<0.001
Number of Pregnancies	0.233	1.26 (1.05 to 1.51)	0.011	0.309	1.36 (1.11 to 1.66)	0.003

^a*P* and OR values obtained from the binary logistic regression model, in which RPL patients were coded as 1 and the control subjects as 0 (reference category). ^bHosmer and Lemeshow test: *p* = 0.720; Omnibus test: *P*<0.0001. ^cBonferroni-corrected *P*-value 0.01.

Table 4: Case-control studies with the Pro72Arg polymorphism in the *TP53* gene and RPL

Study	Country	Allele/Genotype	RPL	Control group	P
			n (%)	n (%)	
Pietrowski <i>et al.</i> , 2005	Austria	Arg	236 (67.4)	216 (75.5)	0.07
		Arg/Arg	83 (47.4)	83 (58.0)	0.03
Coulam <i>et al.</i> , 2006	USA	Arg	337 (82.2)	34 (81.0)	0.84
		Arg/Arg	141 (68.8)	13 (61.9)	0.38
Firouzabadi <i>et al.</i> , 2009	Iran	Arg	86 (44.3)	29 (45.4)	0.99
		Arg/Arg	23 (23.7)	4 (12.5)	0.06
Kaare <i>et al.</i> , 2009	Finland	Arg	64 (69.6)	289 (75.7)	0.29
		Arg/Arg	21 (45.7)	106 (55.5)	0.45
Present Study	Brazil	Arg	161 (67.1)	204 (71.3)	0.32
		Arg/Arg	57 (47.5)	72 (50.3)	0.33

References

- 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.* 2002;78:179-90.
- Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, Sasson R, Hirsh L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids.* 2003;68:861-7.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P *et al.* A single nucleotide polymorphism in the *MDM2* promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell, United States,* 2004, 591-602.
- Brady CA, Attardi LD. p53 at a glance. *J Cell Sci, England,* 2010, 2527-32.
- Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med.* 2010;363:1740-7.
- Brooks CL, Gu W. p53 ubiquitination: *MDM2* and beyond. *Mol Cell, United States,* 2006, 307-15.
- Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W. The p53--*MDM2*--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene, England,* 2007, 7262-6.
- Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP. A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene.* 1988;70:245-52.
- Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Irminger-Finger I, Bischof P. Status of p53 in first-trimester cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod.* 2007;13:111-6.
- Cohen M, Wullemmin C, Irion O, Bischof P. Regulation of MMP-9 by p53 in first trimester cytotrophoblastic cells. *Hum Reprod.* 2008;23:2273-81.
- Coulam CB, Kay C, Jeyendran RS. Role of p53 codon 72 polymorphism in recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online.* 2006;12:378-82.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:3115-20.
- Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, DeLima MG. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol.* 2003;58:69-77.
- Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Frenk R, de Graaf P, Francoz S, Gasparini P, Gobbi A *et al.* Amplification of *Mdmx* (or *MDM4*) directly contributes to

tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol*, United States, 2004, 5835-43.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, United States, 2003, 357-65.

Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D, Qu X. The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the. *Hum Reprod*. 2011;26:1252-8.

Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ *et al*. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *Faseb j*. 2011;25:2245-55.

Finan RR, Al-Irhayim Z, Mustafa FE, Al-Zaman I, Mohammed FA, Al-Khateeb GM, Madan S, Issa AA, Almawi WY. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in women with idiopathic recurrent. *J Reprod Immunol*. 2010;84:186-92.

Firouzabadi RD, Ghasemi N, Rozbahani MA, Tabibnejad N. Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009;49:216-9.

Giess R, Tanasescu I, Steck T, Sendtner M. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Mol Hum Reprod*. 1999;5:581-6.

Halperin R, Peller S, Rotschild M, Bukovsky I, Schneider D. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Gynecol Obstet Invest*. 2000a;50:84-7.

Halperin R, Peller S, Sandbank J, Bukovsky I, Schneider D. Expression of the p53 gene and apoptosis in gestational trophoblastic disease. *Placenta*. 2000b;21:58-62.

Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M, Munne S. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril*. 2012;98:675-80.

Hu C, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y, Nelson DM. Enhanced basal apoptosis in cultured term human cytotrophoblasts is associated. *Placenta*. 2006;27:978-83.

Hu W. The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1:a001073.

Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*. 2007;450:721-4.

Ishida R, Ezura Y, Iwasaki H, Nakazawa I, Kajita M, Kodaira M, Ito H, Emi M. Linkage disequilibrium and haplotype analysis among four novel single-nucleotide. *J Hum Genet*. 2001;46:557-9.

Kaare M, Butzow R, Ulander VM, Kaaja R, Aittomaki K, Painter JN. Study of p53 gene mutations and placental expression in recurrent miscarriage cases. *Reprod Biomed Online*. 2009;18:430-5.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9761-6.

Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB. p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation. *Reprod Biomed Online*. 2006;13:492-6.

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

Kumar S. Occupational, environmental and lifestyle factors associated with spontaneous. *Reprod Sci*. 2011;18:915-30.

Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, Baumeister L, Doyle DL, Leppig K, Pettersen B, Resta R, Shields L, Uhrich S *et al*. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns*. 2005;14:165-81.

Leon PM, Campos VF, Thurow HS, Hartwig FP, Selau LP, Dellagostin OA, Neto JB, Deschamps JC, Seixas FK, Collares T. Association between single nucleotide polymorphisms in p53 and abortion in. *Vet J*. 2012;193:573-5.

Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 2006;13:1027-36.

Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186:1056-61.

Lindbohm ML, Sallmen M, Taskinen H. Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health*. 2002;28 Suppl 2:84-96.

Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, Martel-Planche G, Ashton-Prolla P, Olivier M, Brentani RR, Hainaut P, Achatz MI. *TP53* *PIN3* and *MDM2* SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni. *J Med Genet*. 2009;46:766-72.

Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. MDMX: from bench to bedside. *J Cell Sci*. 2007;120:371-8.

Marzusch K, Ruck P, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E. Expression of the p53 tumour suppressor gene in human placenta: an. *Placenta*. 1995;16:101-4.

- Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, Teunisse AF, Ovaa H, Abraham TE, Dirks RW, Jochemsen AG. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2. *Mol Cell*. 2005;18:565-76.
- Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K, Makrigiannakis A. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes. *Mol Hum Reprod*. 2007;13:663-73.
- Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y, Kondo S. p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat Med*. 1996;2:577-80.
- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet*. 2005;272:95-108.
- Paskulin DD, Cunha-Filho JS, Souza CA, Bortolini MC, Hainaut P, Ashton-Prolla P. TP53 PIN3 and PEX4 polymorphisms and infertility associated with endometriosis or with post-in vitro fertilization implantation failure. *Cell Death Dis*. 2012; 27:e392.
- Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC, Tempfer C. Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumour suppressor gene. *Hum Reprod*. 2005;20:848-51.
- Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol*. 2004;52:36-41.
- Quenby S, Vince G, Farquharson R, Aplin J. Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod*. 2002;17:1959-63.
- Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet*. 2006;368:601-11.
- Sabbatini P, McCormick F. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA Cell Biol*. 2002;21:519-25.
- Salvioli S, Bonafe M, Barbi C, Storci G, Trapassi C, Tocco F, Gravina S, Rossi M, Tiberi L, Mondello C *et al*. p53 codon 72 alleles influence the response to anticancer drugs in cells from aged people by regulating the cell cycle inhibitor p21WAF1. *Cell Cycle*. 2005;4:1264-71.
- Savion S, Lepsky E, Orenstein H, Carp H, Shepshelovich J, Torchinsky A, Fein A, Toder V. Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2002;47:118-27.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 1992;359:76-9.
- Su MT, Lin SH, Lee IW, Chen YC, Kuo PL. Association of polymorphisms/haplotypes of the genes encoding vascular. *Hum Reprod*. 2011;26:758-64.

Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJ, Schuler-Faccini L *et al.* High twinning rate in Candido Godoi: a new role for p53 in human fertility. *Hum Reprod.* 2012;27:2866-71.

Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber JC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2001;16:1644-7.

Thurrow HS, Haack R, Hartwig FP, Oliveira IO, Dellagostin OA, Gigante DP, Horta BL, Collares T, Seixas FK. *TP53* gene polymorphism: importance to cancer, ethnicity and birth weight in a. *J Biosci.* 2011;36:823-31.

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

Veljkovic Vujaklija D, Sucic S, Gulic T, Dominovic M, Rukavina D. Cell death mechanisms at the maternal-fetal interface: insights into the role of. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:180272.

Wade M, Wang YV, Wahl GM. The p53 orchestra: *MDM2* and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol.* 2010;20:299-309.

Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology (Bethesda).* 2005;20:180-93.

Wei P, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Han CS, Liu YX. Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal-maternal interface of rhesus monkey. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:4.

Yamauchi H, Katayama K, Ueno M, He XJ, Mikami T, Uetsuka K, Doi K, Nakayama H. Essential role of p53 in trophoblastic apoptosis induced in the developing rodent. *Apoptosis.* 2007;12:1743-54.

CAPÍTULO 4

Polymorphisms in *TP63*, *TP73* and *MDM2* genes are associated with recurrent pregnancy loss

Manuscrito submetido ao periódico Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology

Polymorphisms in *TP63*, *TP73* and *MDM2* genes are associated with recurrent pregnancy loss

Lucas Rosa FRAGA*¹ - Post-graduation student - lucas_r_fraga@hotmail.com

Juliano André BOQUETT*¹ - Post-graduation student – julianob9@hotmail.com

Caroline Gross Dutra¹ - Post-graduation student - carolgssd@gmail.com

Camila Heck^{2,3} - Undergraduate - camila.heck@acad.pucrs.br

Rozana Oliveira Gonçalves⁴ - Post-graduation student – rozana26oliveira@hotmail.com

Diego D'Ávila PASKULIN¹ - Post-graduation student – diegopaskulin@gmail.com

Olívia Lúcia COSTA⁴ - Associate professor - olivialcosta@yahoo.com.br

Patrícia ASHTON-PROLLA^{1,3,5} - Associate professor - pprolla@portoweb.com.br

Maria Teresa Vieira SANSEVERINO^{3,5} - Medical Geneticist -
msanseverino@hcpa.ufrgs.br

Lavínia SCHULER-FACCINI^{1,3,5} - Associate professor - lavinia.faccini@ufrgs.br

¹Post-Graduation Program in Genetics and Molecular Biology, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 91501-970, Brazil.

²Faculdade de Psicologia, pontifícia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

⁴Post-Graduation Program in Biotechnology in Health and Investigative Medicine and Department of Obstetrics, Gynecology and Human Reproduction, Medical School, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, 40.110-100, Brazil.

⁵Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

* Both authors equally contributed to this work

Corresponding author:

Lavinia Schuler-Faccini, PhD

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Caixa Postal 15031 – Agencia Campus UFRGS

CEP 91501-970 / Porto Alegre – RS – Brasil

Phone: (51) 33166727 Fax: (51) 33167311

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Funding

This work was supported by the Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), the Fundo de Apoio a Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

Abstract

Background: Recent studies have investigated the role of the p53 gene family in reproduction indicating its involvement on female reproduction. Each member of the family acts through different mechanisms: p53 in genomic stability and regulation of blastocyst implantation; p63 as a regulator of the quality and maturation of the oocytes; while p73 control the meiotic spindle. Polymorphisms in the genes of the p53 family have been associated with female infertility. One polymorphism in MDM2, the main regulator of the p53 family, has also been associated with infertility. Although polymorphisms in the TP53 gene have been related with recurrent pregnancy loss (RPL), there have been no studies associating polymorphisms in p63 and p73 with this condition.

Objective: Evaluate the role of polymorphisms in the TP63 (rs17506395), TP73 (rs2273953, rs1801173), and MDM2 (SNP309, rs2279744) genes as risk factors for RPL. Were compared 153 women who have RPL with 143 fertile women who have at least two living births and no history of pregnancy loss. Molecular analysis was performed by Real-Time PCR.

Results: The allelic and genotypic frequencies did not differ between the groups when analyzed separately; however, the interaction between the TP63 TT and MDM2 TT genotypes was shown to increase the risk of RPL (OR = 2.19, CI 95%, P = 0.004), even when corrected for alcohol consumption, smoking and number of gestations (OR = 2.13, CI 95%, P = 0.011).

Conclusions: Our results suggest that TP63 and MDM2 genes have an influence on the risk of RPL.

Key-words: p53 family proteins, TP63, TP73, MDM2, recurrent pregnancy loss.

Introduction

Defined as the occurrence of two or more consecutive pregnancy losses, recurrent pregnancy loss (RPL) occurs before 24 weeks of pregnancy¹⁻² and affects approximately 5% of couples who are in the reproductive period.³ The most common risk factors for RPL include genetic, morphological, hormonal, metabolic, infectious, environmental, and immunological alterations, as well as thrombophilia and advanced maternal age.⁴ However, in around 50% of cases, the etiology remains unknown.⁵ Furthermore, in the investigation of idiopathic RPL, several studies have assessed polymorphic variants in different genes, which may represent a susceptibility factor for this condition.

Studies have investigated the role of the p53 gene family in reproduction, especially in the female germ line.⁶ The proteins of the p53 family, p63 and p73, are transcription factors that play a role in response to DNA damage, induction of cell cycle arrest and apoptosis, although by distinct mechanisms.⁷ p63 and p73 also act in female reproduction through protection of female germ cells.⁸⁻⁹ p63 acts as a regulator of the quality and oocyte maturation,¹⁰ whereas p73 plays a crucial role in maintaining the rate of ovulation and in controlling the meiotic spindle.^{11, 12}

Recently, polymorphisms in the genes of the p53 family were targets of a study related to human reproduction.⁶ The polymorphism c.325-4742T>G (rs17506395) of the TP63 gene was associated with infertility.⁶ In the TP73 gene, two closely linked polymorphisms at the positions 4c.-30G>A and 14 c.-20C>T (rs2273953, rs1801173), located before the start codon, may form a hairpin structure with the potential to alter the genetic expression.¹³ The MDM2 gene, which is the major negative regulator of the p53 family proteins, has an important polymorphism (c.14+309T>G, SNP309, rs2279744) which has been associated with infertility.¹⁴ Thus, in this study we investigated the role of

the polymorphisms c.325-4742T>G of the TP63 (rs17506395) gene; 4 c.-30G>A and 14 c.-20C>T (rs2273953, rs1801173) of the TP73 gene; and c.14+309T>G (SNP309, rs2279744) of the MDM2 gene as risk factors for RPL in a case-control study.

Materials and Methods

Sample

In the case group, were evaluated 153 women who had been diagnosed with idiopathic RPL and forwarded to the Prenatal Diagnosis Clinic of the Medical Genetics Service (DPN-SGM) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between 2000 and 2011. The control group consisted of 143 women with at least two living children and no history of pregnancy loss or infertility. The clinical and epidemiological data and risk factors for RPL were evaluated for both groups.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Studies Group at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-CEP-GPPG). All of the women who agreed to participate signed an informed consent form.

Polymorphism analysis

The collection and extraction of DNA were performed using the Oragene® kit for collection and extraction of salivary DNA (DNA Genotek Inc., Canada), in accordance with the manufacturer's instructions. The genotypic determination was performed using the following Taqman allelic discrimination probes: C__32460279_10 (TP63 gene) and C__16180357_10 (TP73 gene). The real time PCR reaction was conducted in accordance with manufacturer's instructions for the StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied

Biosystems) equipment. The genotyping of the c.14+309T>G polymorphism of the MDM2 gene was performed in accordance with the protocol previously described by Boquett et al. (2013).¹⁵ The products of the reactions were analyzed using the StepOne v2.2.2 software.

Statistical analyses

The statistical analyses were performed using the SPSS 20.0 software. The chi-square test, Student's t-test, and Mann-Whitney test were used to characterize the sample and compare the differences in clinical and demographic information of the case and control groups. The chi-square test was used to test the Hardy-Weinberg equilibrium and to compare the allelic and genotypic frequencies of the two groups.

The multiple binary logistic regression model was used to evaluate the effect of the interaction among the polymorphisms in the RPL outcome and to adjust this effect for confusion factors such as smoking, alcohol consumption and number of pregnancies. The odds ratio (OR) and confidence intervals (CI) of 95% were calculated to assess the relative risk conferred by each covariate. The sample size was calculated using EpiInfo version 6.0 software with an alpha value of 0.05 and 80% power. Alpha values less than 0.05 were considered significant. The Bonferroni correction was applied for four tests in the multivariate binary logistic regression ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0.0125$).

Results

A total of 153 women with RPL and 143 control subjects were included in this study. We observed that the number of pregnancies was higher in the RPL group than in the control group (Table 1). The analysis of the major risk factors pointed to a higher consumption of alcohol in the RPL group compared with the control group, something

which was not observed for smoking. Our analysis also showed a greater number of women of non-European ancestry in the RPL group than in the control group.

The allelic and genotypic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium and did not differ between groups when analyzed separately (Table 2), even when controlled for smoking, alcohol, and number of pregnancies (data not shown).

The number of women with the *TP63* TT (rs17506395) and *MDM2* TT (rs2279744) genotypes was 54 (35.3%) in the RPL group and 27 (18.9%) in the control group ($P < 0.01$), indicating a possible interaction between the *TP63* and *MDM2* genes in the outcome of RPL. The univariate binary logistic regression analysis (Table 3) showed that interaction between these genotypes is associated with RPL (OR = 2.19, 95% CI: 1.28 to 3.75; $p = 0.004$). The additive effect of this interaction remains significant even when controlled for alcohol consumption, smoking, and number of pregnancies (OR = 2.13, 95% CI: 1.18 - 3.82; $p = 0.011$). When the Bonferroni correction is applied for multiple comparisons, this effect remains statistically significant.

Discussion

Recent studies point to the involvement of the *TP63*, *TP73*, and *MDM2* genes in female reproduction.^{6,14} Our working hypothesis is that, through their pro-apoptotic functions and cell cycle control, the activity of p63 and p73 in maternal reproductive physiology has an influence on pregnancy outcomes and especially the pathophysiology of RPL. In this study, we investigated the influence of the polymorphisms in *TP63*, *TP73* and *MDM2* genes, their interactions, and other risk factors in the development of RPL.

The p63 and p73 proteins possess a tumor suppressing function similar to that of p53. Both have highly conserved sequences in the DNA binding domains and have more

than 60% of p53 identity.⁷ p63 and p73 activate reporter genes capable of mediating apoptosis, cell cycle arrest, mitotic spindle control, and maintenance of quality control of the oocytes.⁷ Besides this, they are active in controlling MDM2 expression. By mechanisms similar to the degradation of p53, Mdm2 acts in the negative control of p63 and p73, binding itself to the trans-activation domains and promoting its degradation by ubiquitination.^{16,17}

p63 acts as the principal regulator in the quality control of the female germ line through its apoptotic function.¹⁰ When there is damage in the DNA, p63 is activated and it monitors repair of the damage and induces p53-independent apoptosis for protection of the quality of the female germ line during meiotic arrest.⁶ The levels of p63 as well as its functioning are crucial for a proper gestation, such that small variations in its activation can have important effects in expression of the regulating genes and may modify the cellular destination and physiological effects of the protein.⁷ Thus, polymorphisms that influence its functioning and the functioning of Mdm2, its main regulator, may be involved in the etiology of adverse pregnancy events such as infertility⁶ and RPL.

The polymorphism c.325-4742T>G, located in intron 4 of *TP63*, has recently been associated with infertility.⁶ However, so far there are no studies that relate this polymorphism to functional alterations of the protein. It is possible that SNPs adjacent to this polymorphism are in linkage disequilibrium with other polymorphisms, resulting in a functional effect on regulatory and transcriptional annotations. Even without full understanding of the effect of the p63 polymorphism on its functioning, it is known that the TT genotype of *MDM2* (rs2279744) results in lower levels of the protein and consequently less control over p63, resulting in increased levels of this protein in the oocytes, ovary, and uterus. Since p63 is constitutive in these tissues, this physiological process is regulated by

p63 in distinct molecular events and at different stages, resulting in quality control of the oocytes in the ovaries, and, in the uterine tissue, post-zygotic embryo selection that is independent of p53.

To the best of our knowledge, this is the first study for women with RPL that has investigated the influence of polymorphisms on the TP63 and TP73 genes and their regulator MDM2, in which their interaction as well as the interaction with other risk factors was evaluated. This evaluation approach was shown to be more appropriate for the complex etiology of the RPL condition. With a multiple logistic regression model, it is possible to approximate the analysis of a biological model by considering more than one factor in the influence of the outcome. The results of our group's study involving the p53 pathway and RPL (data not published), as well as the results of this present study, suggest that MDM2 plays an important role in human reproduction (especially in the etiology of RPL) due to its function as the main regulator of this pathway.

In conclusion, our study suggests that the *TP63* and *MDM2* genes have an influence on the risk of RPL. This study helps to clarify the genetic risk factors involved in the etiology of RPL and the role of p63 in maternal reproduction. Studies in different populations, analysis of the paternal component involved in the condition, and functional studies of the polymorphism of p63 should help in understanding the pathophysiology of this condition.

Funding

This work was supported by the Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), the Fundo de Apoio a Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal

de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Table 1: Demographic and Clinical Data: RPL and the Control Groups

Characteristic	RPL	Control Group	P
Frequency [N (%)]	153 (100)	143 (100)	-
Age at first pregnancy [mean (SD)]	23.7 (7.6)	22.0 (4.7)	0.347 [†]
Pregnancies [mean (SD)]	3.7 (1.3)	2.9 (1.3)	<0.001 ^{†*}
Smoking [N (%)]	23 (15)	33 (23.1)	0.077 [‡]
Alcohol consumption [N (%)]	64 (41.8)	25 (17.6)	<0.001 ^{‡**}
Couple consanguinity [N (%)]	4 (2.7)	1 (0.7)	0.372 [‡]
Non-European Ancestry [N (%)]	58 (37.9)	22 (15.4)	<0.001 ^{‡***}
Primary Recurrent Pregnancy Loss [N (%)]	120 (78.4)	-	-

N: number; SD: Standard Deviation; †: Mann-Whitney *U*-teste; ‡: Chi-Square test.

Table 2: *TP63*, *TP73* and *MDM2* SNPs: allelic and genotypic frequencies in women with RPL and in the control group.

Gene	Genotype/Allele of SNP	RPL n (%)	Control Group n (%)	<i>P</i>[†]
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	98 (64.1)	80 (57.6)	0.479
	TG	47 (30.7)	52 (37.4)	
	GG	8 (5.2)	7 (5)	
	T	243 (79.4)	212 (76.3)	0.413
	G	63 (20.6)	66 (23.7)	
<i>TP73</i> (rs6695978)	GG	99 (64.7)	78 (54.5)	0.147
	GA	47 (30.7)	53 (37.1)	
	AA	7 (4.6)	12 (8.4)	
	G	245 (80.1)	209 (73.1)	0,055
	A	61 (19.9)	77 (26.9)	
<i>MDM2</i> (rs2279744)	TT	76 (49.7)	59 (41.3)	0.229
	TG	59 (38.6)	59 (41.3)	
	GG	18 (11.8)	25 (17.4)	
	T	211 (68.9)	177 (61.9)	0.085
	G	95 (31.1)	109 (38.1)	

[†] Chi-square test.

Table 3: Univariate and Multiple Binary Logistic Regression Models: interaction between *TP63* (rs17506395) and *MDM2* (rs2279744) polymorphisms in the risk of RPL, corrected for alcohol consumption, smoking and number of pregnancies

Variables	Univariate Analysis[†]		Multiple Analysis[†]	
	OR (CI 95%)	P	OR (CI 95%)	P
<i>TP63</i> TT + <i>MDM2</i> TT	2.19 (1.28 – 3.75)	0.004*	2.13 (1.18 – 3.82)	0.011*
Alcohol consumption	3.39 (1.98 – 5.81)	<0.001*	4.71 (2.57 – 8.62)	<0.001*
Smoking	0.59 (0.32 – 1.06)	0.79	0.48 (0.24 – 0.94)	0.034
Number os Pregnancies	1.42 (1.18 – 1.71)	<0.001*	1.56 (1.27 – 1.91)	<0.001*

[†]P and OR values obtained from the binary logistic regression model, in which RPL group was coded as 1 and the control group as 0 (reference category). Hosmer and Lemeshow test: p = 0.352; Omnibus test: P<0.0001.

References

- 1 ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss. Number 24. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002; 78: 179-90.
- 2 Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006; 368: 601-11.
- 3 Branch DW, Gibson M, Silver RM. Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med.* 2010; 363: 1740-7.
- 4 Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, et al. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage. *J Genet Couns.* 2005; 14: 165-81.
- 5 Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol.* 2010; 85: 25-32.
- 6 Feng Z, Zhang C, Kang HJ, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *Faseb j.* 2011; 25: 2245-55.
- 7 Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 259-65.
- 8 Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature.* 2007; 450: 721-4.
- 9 Brady CA, Attardi LD. p53 at a glance. *J Cell Sci.* 2010; 123: 2527-32.
- 10 Suh EK, Yang A, Kettenbach A, et al. p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature.* 2006; 444: 624-8.
- 11 Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor. *Genes Dev.* 2008; 22: 2677-91.
- 12 Tomasini R, Tsuchihara K, Tsuda C, et al. TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 797-802.
- 13 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently. *Cell.* 1997; 90: 809-19.
- 14 Kang HJ, Feng Z, Sun Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 9761-6.
- 15 Boquett JA, Brandalize AP, Fraga LR, Schuler-Faccini L. Maternal SNPs in the p53 pathway: Risk factors for trisomy 21? *Dis Markers.* 2013; 34:41-9.

- 16 Kadakia M, Slader C, Berberich SJ. Regulation of p63 function by Mdm2 and MdmX. *DNA Cell Biol.* 2001; 20: 321-30.
- 17 Zdzalik M, Pustelny K, Kedracka-Krok S, et al. Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and. *Cell Cycle.* 2010; 9: 4584-91.

CAPÍTULO 5

Análises dos Subgrupos de Mulheres com Perdas Gestacionais Recorrentes

Neste capítulo estão apresentadas a caracterização e as análises das distribuições dos polimorfismos avaliados neste trabalho entre os subgrupos de mulheres com PGR, sendo eles: mulheres com PGR primárias e PGR secundárias e, mulheres com duas PGR e mulheres com três ou mais perdas gestacionais. Estas análises não foram completamente incluídas nos manuscritos resultantes deste trabalho devido sua extensão e ausência de resultados significativos.

6.1. Mulheres com PGR Primárias e PGR Secundárias

O número de gestações é maior no subgrupo de mulheres com PGR secundárias do que no subgrupo de mulheres com PGR primárias (Tabela 1). No entanto, mesmo estes subgrupos tendo diferenças quanto ao sucesso de, pelo menos, uma gestação, o número de perdas gestacionais não está diferente entre os subgrupos. Observou-se também que, a idade no período de avaliação foi estatisticamente mais alta entre as mulheres com PGR secundárias. Não houve diferença também entre as demais características avaliadas, tais como: fumo, consumo de álcool, doença crônica e dificuldade de engravidar.

Tabela 1. Dados Clínicos dos subgrupos de RPL primário e secundário.

Característica	PGR-P	PGR-S	P
Frequência [N (%)]	120 (78.5)	33 (21.5)	-
Idade no Período de Avaliação [média (DP)]	32.2 (7.5)	35.8 (8.7)	0.045 ^{MW}
Idade na Primeira Gestação [média (DP)]	24.4 (7.7)	22 (6.8)	0.233 ^{MW}
Gestações [média (DP)]	3.4 (1.7)	4.4 (1.4)	<0.001 ^{MW}
Fumo [N (%)]	17 (14.2)	6 (18.2)	0.568 ^{X2}
Consumo de Álcool [N (%)]	54 (45)	10 (30.3)	0.130 ^{X2}
Consanguinidade [N (%)]	3 (2.5)	1 (3)	0.877 ^{X2}
História Familiar de Malformações [N (%)]	20 (23.0)	8 (24.2)	0.885 ^{X2}
Doença Crônica [N (%)]	29 (33.3)	13 (39.4)	0.534 ^{X2}
Perdas Gestacionais [média (DP)]	3,38 (1,7)	2,9 (1,1)	0.234 ^{MW}
Perdas Gestacionais			
Duas Perdas [N (%)]	41 (34.2)	12 (36.4)	-
Três Perdas [N (%)]	41 (34.2)	16 (48.5)	-
Acima de Três Perdas [N (%)]	38 (31.7)	5 (15.2)	0.137 ^{X2}
Dificuldade de Engravidar [N (%)]	31 (26.3)	13 (39.4)	0.143 ^{X2}

PGR-P: Perdas Gestacionais Recorrentes Primárias; PGR-S: Perdas Gestacionais Recorrentes Secundárias; N: Número; DP: Desvio Padrão da Média; X2: Teste de Qui-Quadrado; MW: Teste Mann-Whitney.

Em relação aos polimorfismos avaliados, não houve diferença entre as distribuições alélicas e genótípicas entre esses subgrupos (Tabela 2). Avaliou-se a frequência da herança conjunta dos genótipos *TP53* Arg/Arg e *MDM2* TT e, *TP63* TT e *MDM2* TT entre as mulheres com PGR primárias e PGR secundárias, não encontrando nenhuma diferença.

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da família p53 e seus reguladores entre mulheres com PGR primárias e com PGR secundárias.

Gene	Genótipo/Alelo do SNP	PGR-P n (%)	PGR-S N (%)	P [#]
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	57 (47,5)	16 (48,5)	0,491
	GC	47 (39,2)	15 (45,5)	
	CC	16 (13,3)	2 (6,1)	
	G	161 (67,0)	47 (71,2)	0,625
		C	79 (33,0)	
<i>TP63</i> (rs1706395)	TT	77 (64,2)	21 (63,6)	0,971
	TG	37 (30,8)	10 (30,3)	
	GG	6 (5,0)	2 (6,1)	
	T	191 (79,6)	52 (78,7)	0,975
	G	49 (20,4)	14 (21,3)	
<i>TP73</i> (rs6695978)	GG	77 (64,2)	22 (66,7)	0,823
	GA	38 (31,7)	9 (27,3)	
	AA	5 (4,2)	2 (6,1)	
	G	192 (80,0)	53 (80,3)	0,904
	A	48 (20,0)	13 (19,7)	
<i>MDM2</i> (rs2279744)	TT	60 (50,0)	16 (48,5)	0,806
	TG	45 (37,5)	14 (42,4)	
	GG	15 (12,5)	3 (9,1)	
	T	165 (69,0)	46 (69,6)	0,997
	G	75 (31,0)	20 (30,4)	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	CC	38 (31,7)	16 (48,5)	0,189
	TC	59 (49,2)	13 (39,4)	
	TT	23 (19,2)	4 (12,1)	
	C	135 (56,0)	45 (68,1)	0,108
	T	105 (44,0)	21 (31,9)	
<i>USP7</i> (rs1529916)	GG	61 (50,8)	20 (60,6)	0,541
	GA	49 (40,8)	10 (30,3)	
	AA	10 (8,3)	3 (9,1)	
	G	171 (71,0)	50 (75,7)	0,569
	A	69 (29,0)	16 (24,3)	
<i>LIF</i> (rs929271)	TT	64 (53,3)	15 (45,5)	0,499
	TG	45 (37,5)	16 (48,5)	
	GG	11 (9,2)	2 (6,1)	
	T	173 (72,0)	46 (69,6)	0,820
	G	67 (28,0)	20 (30,4)	

PGR-P: Perdas Gestacionais Recorrentes Primárias; PGR-S: Perdas Gestacionais Recorrentes Secundárias; # Teste de Qui-Quadrado.

6.2. Mulheres com Duas PGR e Mulheres com Três ou Mais Perdas Gestacionais

A idade no período de avaliação está maior no subgrupo de mulheres com três ou mais perdas (Tabela 3). Este achado se confirma com o número de gestações, que também está aumentado no grupo de mulheres com três ou mais perdas. Não houve diferença entre as demais características avaliadas, sendo elas: idade na primeira gestação, fumo, consumo de álcool, consanguinidade, história familiar de malformações, doença crônica e dificuldade de engravidar.

Tabela 3. Dados Clínicos dos subgrupos de mulheres com duas PGR e mulheres com três ou mais perdas gestacionais.

Característica	Duas Perdas	Três ou Mais Perdas	P
Frequencia [N (%)]	53 (34,6)	100 (65,4)	-
Idade no Período de Avaliação [média (DP)]	30,8 (6,8)	34,6 (7,3)	0,002 ^{MW}
Idade na Primeira Gestação [média (DP)]	24,4 (7,2)	23,3 (7,8)	0,559 ^{MW}
Gestações [média (DP)]	2,5 (0,9)	4,4 (1,8)	<0,001 ^{MW}
Fumo [N (%)]	9 (17)	14 (14)	0,394 ^{X2}
Consumo de Álcool [N (%)]	27 (50,9)	37 (37)	0,068 ^{X2}
Consanguinidade [N (%)]	1 (1,9)	3 (3)	0,573 ^{X2}
História Familiar de Malformações [N (%)]	10 (23,8)	18 (18)	0,549 ^{X2}
Doença Crônica [N (%)]	14 (33,3)	28 (28)	0,470 ^{X2}
Índice de Massa Corporal [média (DP)]	25,1 (4,1)	26,9 (4,4)	0,024 ^{MW}
Dificuldade de Engravidar [N (%)]	20 (37,7)	24 (24,5)	0,065 ^{X2}

N: Número; DP: Desvio Padrão da Média; MW: Teste Mann-Whitney; X2: Teste de Qui-Quadrado.

Ao se avaliar as frequências alélicas e genóticas dos SNPs estudados, notou-se que existe uma diferença na distribuição dos genótipos de *MDM2* entre estes subgrupos, havendo maior frequência do alelo T, considerado de risco, no subgrupo de mulheres com duas perdas. Porém, essa diferença perde sua significância estatística ao aplicarmos a correção de Bonferroni para múltiplas comparações, que para esta amostra, adquire um valor de $\alpha=0,0071$, menor que o encontrado (0,029). Além disso, foi avaliada uma possível diferença na frequência da herança conjunta dos genótipos *TP53* Arg/Arg e *MDM2* TT e, *TP63* TT e *MDM2* TT entre os subgrupos. Não se encontrou nenhuma diferença.

Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da família p53 e seus reguladores entre mulheres com duas PGR e três ou mais perdas gestacionais.

Gene	Genótipo/Alelo do SNP	Duas Perdas	Três Perdas ou Mais	P [#]
		n (%)	N (%)	
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	29 (54,7)	44 (44,0)	0,300
	GC	17 (32,1)	45 (45,0)	
	CC	7 (13,2)	11 (11,0)	
	G	75 (70,7)	133 (66,5)	
<i>TP63</i> (rs1706395)	C	31 (29,3)	67 (33,5)	0,528
	TT	32 (60,4)	66 (66,0)	
	TG	18 (34,0)	29 (29,0)	
	GG	3 (5,7)	5 (5,0)	
<i>TP73</i> (rs6695978)	T	82 (77,3)	161 (80,5)	0,788
	G	24 (22,7)	39 (19,5)	
	GG	36 (67,9)	63 (63,0)	
	GA	15 (28,3)	32 (32,0)	
<i>MDM2</i> (rs2279744)	AA	2 (3,8)	5 (5,0)	0,820
	G	87 (82,0)	158 (79,0)	
	A	19 (18,0)	42 (21,0)	
	TT	33 (62,3)	43 (43,0)	
<i>MDM4</i> (rs1563828)	TG	16 (30,2)	43 (43,0)	0,623
	GG	4 (7,5)	14 (14,0)	
	T	82 (77,3)	129 (64,5)	
	G	24 (22,7)	71 (35,5)	
<i>USP7</i> (rs1529916)	CC	17 (32,1)	37 (37,0)	0,029
	TC	26 (49,1)	46 (46,0)	
	TT	10 (18,9)	17 (17,0)	
	C	60 (56,6)	120 (60,0)	
<i>LIF</i> (rs929271)	T	46 (43,4)	80 (40,0)	0,829
	GG	30 (56,0)	51 (51,0)	
	GA	19 (35,8)	40 (40,0)	
	AA	4 (7,5)	9 (9,0)	
<i>USP7</i> (rs1529916)	G	79 (74,5)	142 (71,0)	0,601
	A	27 (25,5)	58 (29,0)	
	TT	29 (54,7)	50 (50,0)	
	TG	21 (39,6)	40 (40,0)	
<i>LIF</i> (rs929271)	GG	3 (5,7)	10 (10,0)	0,632
	T	79 (74,5)	140 (70,0)	
	G	27 (25,5)	60 (30,0)	
	G	27 (25,5)	60 (30,0)	

Teste de Qui-Quadrado.

CAPÍTULO 7
Discussão

As definições das PGR baseiam-se em estudos epidemiológicos, os quais demonstram que a taxa de PGR é maior do que a esperada pelo acaso quando baseadas nas avaliações das taxas de perdas gestacionais esporádicas (Alberman, 1988; Quenby *et al.*, 2002; Branch *et al.*, 2010). Isso coloca as PGR como uma condição clínica isolada, diferente das perdas gestacionais esporádicas. Esses dados sugerem uma predisposição para PGR em alguns casais, uma vez que estudos mostram que o risco de perda gestacional aumenta de acordo com o número prévio de perdas (Parazzini *et al.*, 1988; Regan *et al.*, 1989; Quenby & Farquharson, 1993). Tais resultados acentuam também a importância dos estudos que avaliam fatores genéticos de risco nas pessoas afetadas com essa condição.

Uma vez que não existem dados que apontem diferenças entre a etiologia das PGR em mulheres com duas perdas e mulheres com três perdas ou mais, é importante que se avalie e considere as PGR a partir de duas perdas. Por este motivo, foram avaliadas neste trabalho, mulheres com duas ou mais PGR. Essa avaliação se mostrou correta na amostra avaliada, pelo fato de não haver diferença quanto às características clínicas observadas (Tabela 3) entre estes subgrupos.

A não compreensão da causa das PGR em determinados casos é extremamente frustrante tanto para o médico quanto para a paciente, principalmente quando se esgotam todas as possibilidades de investigação. Assim, a comunidade científica tem se esforçado para encontrar as causas dos casos em que a etiologia ainda não é conhecida. Nessa linha, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos fatores genéticos e sua relação com determinados fatores ambientais na predisposição para PGR. Foram avaliadas variantes em genes do controle do ciclo celular, tolerância gestacional, implantação, bem como os reguladores envolvidos.

Foram analisados primeiramente, polimorfismos na via de sinalização da proteína p53 em 120 mulheres com PGR. Não foi encontrada associação entre os cinco SNPs avaliados quando analisados isoladamente, no entanto, uma análise da interação entre os genótipos de risco, *TP53* Arg/Arg e *MDM2* TT, mostrou-se associada com as PGR, aumentando o risco para esta condição em 2,58 vezes. Esta observação é muito interessante, pois de acordo com os dados da literatura, o polimorfismo Pro72Arg tem sido associado a desfechos adversos na gestação (Hu, 2009). Estudos demonstram diferenças entre tais alelos na indução da apoptose (Dumont *et al.*, 2003) e na indução da expressão

de *LIF* (Stewart *et al.*, 1992; Cullinan *et al.*, 1996). Assim, a eficiência de p53 reflete diretamente na implantação, fertilidade e controle gestacional mediante apoptose (Kay *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2011). Já o alelo T do SNP309 de *MDM2*, reduz a expressão desse gene, diminuindo a degradação de p53 (Bond *et al.*, 2004). A interação dos genótipos Arg/Arg de *TP53* e TT de *MDM2* levam a um aumento dos níveis de p53 bem como de sua funcionalidade na indução da apoptose, cujo efeito em demasia mostrou aumentar a taxa de abortamento em camundongos (Norimura *et al.*, 1996).

A hipótese para a escolha dos genótipos de risco que se reforçaram pelo nosso achado estatístico se baseia nos mecanismos os quais a apoptose mediada por p53 está envolvida na gestação. Dessa forma, o envolvimento de p53 nas PGR seria através de uma seleção pós-implantacional. Levando-se em consideração que a grande maioria das PGR sejam causadas devido às altas taxas de embriões aneuplóides (Quenby *et al.*, 2002; Hodes-Wertz *et al.*, 2012), p53 atuaria em uma seleção pós-zigótica, uma vez que p53 é expressa no trofoblasto em todos os estágios da gestação, com um aumento no primeiro trimestre, período crítico para a seleção embrionária (Cohen *et al.*, 2007).

A avaliação da expressão de p53 na interface materno-fetal e sua relação com a apoptose trofoblática mostrou que essa proteína controla a proliferação das células desses tecidos para uma normal implantação e placentação (Wei *et al.*, 2005; Cohen *et al.*, 2007). Este resultado reforça a atuação dessa proteína em mecanismos pós-implantacionais. Também, o excesso de apoptose na gestação já foi associado a desfechos gestacionais adversos em alguns estudos (Minas *et al.*, 2007; Vujaklija *et al.*, 2012). Savion e colaboradores (2002) encontraram um aumento do processo apoptótico no útero de camundongos com perdas gestacionais. Nesse processo, p53 apresentou expressão aumentada nessas células. Outras investigações têm mostrado que a proteína p53 é encontrada em maior quantidade em placentas humanas de gestações anormais (Levy *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007).

Outro estudo que reforça essa hipótese é o de Norimura e colaboradores (1996), que avaliou o abortamento em camundongos irradiados com Raios X e mostrou que camundongos p53+/+ apresentaram uma maior taxa de apoptose, menor sobrevivência de fetos anormais e uma maior taxa de morte e abortamento de fetos normais. Sendo assim, a medida que aumenta a dose de p53, aumentam também os abortamentos, mesmo em fetos

normais. Um estudo genético realizado em equinos (*Thoroughbred mares*) encontrou uma maior frequência do genótipo Arg/Arg nos animais com perdas gestacionais (Leon *et al.*, 2012), sugerindo que este mecanismo de seleção não se restringe apenas aos seres humanos.

A partir desses resultados envolvendo p53 e sua via de sinalização, foram analisados os demais genes da família p53. Avaliou-se, então, um polimorfismo no gene *TP63*, e outros dois polimorfismos completamente ligados, no gene *TP73*. Nesta análise incluiu-se o polimorfismo de *MDM2*, cuja proteína é a principal reguladora de p63 e p73. Ao avaliar a frequência dessas variantes em 153 mulheres com PGR, também não foi encontrada relação entre os SNPs e PGR, porém ao avaliar a interação entre as variantes polimórficas, os resultados apontaram que os genótipos *TP63* TT e *MDM2* TT quando herdados em conjunto aumentam o risco de PGR em 2,19 vezes.

Este segundo achado reforça a hipótese do envolvimento da família p53 no controle da reprodução materna. Através dos mecanismos pró-apoptóticos e de controle de ciclo celular semelhantes a p53, porém independentes, as atividades de p63 e p73 influenciam no desfecho gestacional bem como na fisiopatologia das PGR.

Os papéis de p63 e p73 na reprodução feminina já estão bem estabelecidos. Quando há danos no DNA, p63 é ativado, monitorando o reparo desses danos e induzindo a apoptose independente de p53 para proteção da qualidade da linhagem germinativa feminina durante a parada meiótica (Feng *et al.*, 2011). Os níveis e seu funcionamento ideal são cruciais para uma gestação adequada. Assim, polimorfismos que influenciam seu funcionamento podem, também, estar envolvidos na etiologia de eventos adversos da gestação.

Até o momento não há outros estudos de associação do polimorfismo de *TP63* avaliado neste trabalho com outros desfechos gestacionais, além do conduzido por Feng *et al.* (2011). Também, não há estudos que relacionem este polimorfismo com alterações funcionais da proteína. No entanto, mesmo sem a compreensão do efeito do polimorfismo nesse gene em sua função, sabe-se que o genótipo *MDM2* TT resulta em menores níveis da proteína, e, conseqüentemente, maiores níveis de p63 nos oócitos, ovário e útero, o que poderia estar influenciando no desfecho gestacional abordado neste trabalho.

Em relação ao polimorfismo de *TP73*, o mesmo não se mostrou associado às PGR. Sabe-se que *p73* está envolvida na manutenção do índice de ovulação e no controle do fuso meiótico (Tomasini *et al.*, 2008b), no entanto, possivelmente a apoptose mediada por essa proteína não esteja envolvida na seleção pós-implantacional como a mediada por *p53*.

Os artigos resultantes deste trabalho são os primeiros estudos a avaliar a família *p53* e seus reguladores em mulheres com PGR. Até o momento há apenas quatro estudos que avaliaram o polimorfismo Pro72Arg de *TP53* em mulheres com PGR. Em todos esses estudos a abordagem estatística usada foi apenas o teste qui-quadrado, no qual se avaliou isoladamente os polimorfismos estudados, sem considerar fatores de risco ambientais, sua relação com os polimorfismos ou ainda, a interação com outros genes que poderiam influenciar na função ou nível das proteínas (Pietrowski *et al.*, 2005; Coulam *et al.*, 2006; Firouzabadi *et al.*, 2009; Kaare *et al.*, 2009).

Outra observação importante que os resultados das análises de interação permitiram ver é que *Mdm2* parece influenciar fortemente na relação entre as variantes estudadas e as PGR. Estes resultados sugerem que *MDM2* desempenha importante papel na reprodução humana, especialmente na etiologia de PGR devido sua função como principal regulador da família *p53*.

A simples avaliação dos polimorfismos isolados não permitiu que se pudesse encontrar o efeito das variantes estudadas no risco de PGR. Com a análise de interação realizada através de um modelo de regressão logística multivariada pôde-se controlar o efeito das interações pelos demais fatores de risco associados às PGR. Em estudos epidemiológicos, a interação é utilizada para avaliar o grau em que o efeito conjunto de dois fatores de risco para a doença difere dos efeitos independentes de cada um (Ahlbom & Alfredsson, 2005). Esses fatores, em termos de seus efeitos sobre a incidência da doença, podem aumentar o efeito de um sobre o outro, agindo assim, em sinergia. No caso das interações entre os genótipos *TP53* Arg/Arg e *MDM2* TT e, *TP63* TT e *MDM2* TT, há interações biológicas, que se referem a uma ação conjugada de dois fatores para produzir um efeito (Andersson *et al.*, 2005). Devido às PGR se tratarem de uma condição de etiologia complexa, quando se avaliam possíveis fatores de risco, é importante fazê-lo utilizando o efeito combinado de diversos fatores, e não apenas separadamente. Dessa forma, o resultado deste trabalho se coloca mais aproximado ao modelo biológico real. A

abordagem de avaliação deste estudo vem se tornando cada vez mais comum nos estudos epidemiológicos e genéticos (Kalilani & Atashili, 2006; Chen *et al.*, 2012) e tende a reduzir os problemas de dificuldade de replicação dos estudos de associação, uma vez que avalia não apenas um fator isoladamente e sim como esse fator interage, controla e é controlado pelos demais fatores associados à condição.

Com relação aos fatores clínicos avaliados neste trabalho, os resultados corroboram com trabalhos anteriores que encontraram associação entre o consumo de álcool e o risco para PGR. Também quanto ao número de gestações, que está relacionado às PGR.

Um resultado bastante surpreendente foi que, na amostra estudada, mulheres que sofriam com PGR fumavam menos que o grupo controle. Este dado não está de acordo com os estudos que apontam o fumo como fator de as perdas gestacionais (Armstrong *et al.*, 1992; Lindbohm *et al.*, 2002; Rai & Regan, 2006; Kumar, 2011). Porém, o envolvimento definitivo do fumo com as PGR não está completamente determinado, uma vez que estudos epidemiológicos apresentam dados conflitantes (Kline *et al.*, 1995; Ness *et al.*, 1999; Rasch, 2003). Ainda, deve-se salientar que, tal diferença não é estatisticamente significativa. Porém, levando-se em consideração que o fumo deva ser considerado um fator de risco para as PGR, a hipótese para o grupo controle fumar mais que no grupo de mulheres com PGR é que esta diferença ocorre devido a diferença de idade entre os grupos de mulheres com PGR e os controles, uma vez que na última década foram realizados muitos esforços nas campanhas anti-tabaco (de Almeida *et al.*, 2008), o que, provavelmente, reduziu o número de mulheres fumantes nesses anos.

Quanto às análises de subgrupos de mulheres com PGR primárias e PGR secundárias e, mulheres com duas perdas e mulheres com três perdas ou mais, ao nosso conhecimento, não há evidências que relacionem susceptibilidade genética a PGR primárias e secundárias bem como com diferenças no número de perdas gestacionais. Shapira e colaboradores (2012) avaliaram características obstétricas em mulheres com PGR primárias e secundária e, assim como neste trabalho, encontraram que a idade no período de avaliação foi estatisticamente mais alta entre as mulheres com PGR secundárias. Ainda, nossas análises nos subgrupos de mulheres com duas PGR e mulheres com três ou mais perdas gestacionais reforçaram que deve-se considerar e avaliar mulheres com PGR a partir da segunda perda.

Os resultados deste trabalho fornecem um reforço na explicação das causas genéticas para as PGR. A não associação dos SNPs isolados como fatores de risco para as PGR sugere que os genes abordados neste trabalho possuem pequeno efeito para esta condição, no entanto mostra também que a avaliação da interação entre esses genes pode ser um melhor indicador de possíveis efeitos na etiologia das PGR. Este trabalho contribui para a elucidação dos trabalhos anteriores e reforça a condição multifatorial das PGR. Ainda, a análise multivariada de avaliação abordada neste trabalho, aumenta a possibilidade de que o modelo proposto no estudo seja de mais fácil replicação em outras populações. Em conclusão, nosso estudo evidencia o envolvimento da família p53 e seus reguladores na fisiopatologia das PGR.

REFERÊNCIAS

- Abalovich M, Gutierrez S, Alcaraz G, Maccallini G, Garcia A e Levalle O (2002) Overt and Subclinical Hypothyroidism Complicating Pregnancy. *THYROID* 12(1):63-68.
- ACOG. ACOG committee opinion. Perinatal and infant mortality statistics (1996). Number 167, December 1995. Committee on Obstetric Practice. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 53: 86-88.
- ACOG. ACOG practice bulletin. Management of recurrent pregnancy loss (2002). Number 24, February 2001. (Replaces Technical Bulletin Number 212, September 1995). American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 78(2):179-190.
- Acun T, Terzioglu-Karaa E, Konu O, Ozturka M e Yakicier MC (2010) Mdm2 Snp309 G allele displays high frequency and inverse correlation with somatic P53 mutations in hepatocellular carcinoma. *Mutation Research* 684:106–108.
- Ahlbom A e Alfredsson L (2005) Interaction: A word with two meanings creates confusion. *Eur J Epidemiol.* 20(7):563-4.
- Akita S, Akino K, Ren SG, Melmed S, Imaizumi T e Hirano A (2006) Elevated Circulating Leukemia Inhibitory Factor in Patients With Extensive Burns. *Journal of Burn Care & Research* 27:221-225.
- Alberman E (1988) The epidemiology of repeated abortion. In: Beard RW, Sharp F, editors. *Early pregnancy loss: mechanism and treatment*. London: Royal College of Obstetrics and Gynaecology Press, pp. 9–17.
- Allocati N, Di Ilio C e De Laurenzi V (2012) p63/p73 in the control of cell cycle and cell death. *Exp Cell Res* 318(11):1285-90.
- Andersson T, Alfredsson L, Källberg H, Zdravkovic S e Ahlbom A (2005) Calculating measures of biological interaction. *Eur J Epidemiol* 20(7):575-9.
- Arias F, Romero R, Joist H e Kraus FT (1998) Thrombophilia: a mechanism of disease in women with adverse pregnancy outcome and thrombotic lesions in the placenta. *J Matern Fetal Med* 7:277–286.
- Armstrong BG, McDonald AD e Sloan M (1992) Cigarette, alcohol, and coffee consumption and spontaneous abortion. *Am J Public Health* 82(1):85-7.
- Aruna M, Nagaraja T, Andal S, Tarakeswari S, Sirisha PV, Reddy AG, Thangaraj K, Singh L e Reddy BM (2010) Role of progesterone receptor polymorphisms in the recurrent spontaneous abortions: Indian case. *PLoS ONE* 5:e8712.
- ASRM. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2012) Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 98(5):1103-11.
- Bombell S e McGuire W (2008) Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 48:147–154.

- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P *et al.* (2004) A Single Nucleotide Polymorphism in the *MDM2* Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* 119:591–602.
- Boots C, e Stephenson MD (2011) Does obesity increase the risk of miscarriage in spontaneous conception: a systematic review. *Semin Reprod Med* 29:507–13.
- Brady CA e Attardi LD (2010) p53 at a glance. *Journal of Cell Science* 123(15):2527-2532.
- Branch DW, Gibson M e Silver RM (2010) Clinical practice. Recurrent miscarriage. *N Engl J Med* 363:1740-7.
- Brogin Moreli J, Cirino Ruocco AM, Vernini JM, Rudge MV e Calderon IM (2012) Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *ISRN Obstet Gynecol* 2012:230742.
- Brooks CL e Gu W (2004) Dynamics in the p53-Mdm2 ubiquitination pathway. *Cell Cycle* 3:895-899.
- Brooks CL e Gu W (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21:307–315.
- Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y e Gu W (2007) The p53–Mdm2–HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26:7262–7266.
- Buchholz T e Thaler CJ (2003) Inherited thrombophilia: impact on human reproduction. *Am J Reprod Immunol* 49:1–13.
- Caramins MC, Saville T, Shakeshaft R, Mullan GL, Miller B, Yip MY e Buckley MF (2011) A comparison of molecular and cytogenetic techniques for the diagnosis of pregnancy loss. *Genet Med* 13:46-51.
- Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G (2001) Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 75(4):678–682.
- Celli, J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG *et al.* (1999) Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 99:143–153.
- Chen JR, Jr-Gang C, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L e Stewart CL (2000) Leukemia Inhibitory Factor Can Substitute for Nidatory Estrogen and Is Essential to Inducing a Receptive Uterus for Implantation But Is Not Essential for Subsequent Embryogenesis. *Endocrinology* 141:4365-4372.
- Chen Y, Dawes PT, Packham JC e Matthey DL (2012) Interaction between smoking and functional polymorphism in the *TGFB1* gene is associated with ischaemic heart disease and myocardial infarction in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 18;14(2):R81.

- Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Irminger-Finger I e Bischof P (2007) Status of p53 in first-trimester cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 13:111-6.
- Collavin L, Lunardi A e Sal GD (2010) p53-family proteins and their regulators: hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death and Differentiation* 17:901–911.
- Coulam CB, Kay C e Jeyendran RS (2006) Role of p53 codon 72 polymorphism in recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 12:378-82.
- Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Andersont PS, Pollardt JW, Lesseyt BA e Stewart CL (1996) Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93:3115–3120.
- Daher S, Mattar R, Gueuvoghlian-Silva BY e Torloni MR (2012) Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. *Am J Reprod Immunol* 67(4):341-7.
- Danovi D, Meulmeester E, Pasini D, Migliorini D, Capra M, Francoz S, Gasparini P, Gobbi A, Helin K, Jochemsen A et al. (2004). Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumour formation by inhibiting p53-tumour suppressor activity. *Mol. Cell. Biol* 24:5835-5843.
- de Almeida LM, Cavalcante TM, Casado L, Fernandes EM, Warren CW, Peruga A, Jones NR, Curi Hallal AL, Asma S e Lee J (2008) Linking Global Youth Tobacco Survey (GYTS) data to the WHO Framework Convention. *Prev Med* 47 Suppl 1:S4-10.
- Dobbelstein M, Wienzek S, Konig C e Roth J (1999) Inactivation of the p53-homologue p73 by the mdm2-oncoprotein. *Oncogene* 18:2101–2106.
- Dumont P, Leu JI, Pietra ACD, George DL e Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357–365.
- Escary JL, Perreau J, Dumenil D, Ezine S e Brûlet P (1993) Leukaemia Inhibitory Factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation. *Nature* 363:361–364.
- Farquharson RG, Jauniaux E e Exalto N (2005) Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Human Reproduction* 20(11):3008–3011.
- Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ, Hu W (2011) Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *Faseb j* 25:2245-55.
- Finan RR, Al-Irhayim Z, Mustafa FE, Al-Zaman I, Mohammed FA, Al-Khateeb GM, Madan S, Issa AA e Almawi WY (2010) Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. *J Reprod Immunol* 84:186–192.

- Firouzabadi RD, Ghasemi N, Rozbahani MA e Tabibnejad N (2009) Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 49:216-219.
- Firth HV & Hurst JA (2005) Miscarriage and recurrent miscarriage. In: Firth HV & Hurst JA Oxford desk reference clinical genetics, pp 616-617.
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F e Jacks T (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416:560-564.
- Ford HB e Schust DJ (2009) Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy. *Reviews in Obstetrics & Gynecology* 2(2): 76-83.
- Fox-Lee L e Schust DJ (2007) Recurrent pregnancy loss. In: Berek JS Berek and Novak's Gynecology, pp 1277-1322.
- Franssen MT, Korevaar JC, Leschot NJ, Bossuyt PM, Kneegt AC, Gerssen-Schoorl KB, Wouters CH, Hansson KB, Hochstenbach R, Madan K, van der Veen F e Goddijn M (2005) Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ* 331:137-141.
- Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley B *et al.* (1992) The IL-6 signal transducer, gp 130: An oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255:1434-1437.
- Giess R, Tanasescu I, Steck T e Sendtner M (1999) Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women. *Molecular Human Reproduction* 5:581-586.
- Goldenberg L, Kirby R, Culhane JF (2004) Stillbirth: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med* 16:79-94.
- Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, Mattei M, Candi E, De Felici M, Melino G e Cesareni G (2009) Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med* 15:1179-1185.
- Griebel CP, Halvorsen J, Golemon TB e Day AA (2005) Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician* 72(7):1243-50.
- Hamajima N, Matsuo K, Suzuki T, Nakamura T, Matsuura A, Hatooka S, Shinoda M, Koderac Y, Yamamura Y, Hirai T *et al.* (2002) No association of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro polymorphism with the risk of digestive tract cancers in Japanese. *Cancer Lett* 181:81-85.
- Harper PS (2004) Practical genetic counseling. 5^a edição. Oxford University Press, New York, 407 pp.
- Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Jooss T, Manuel B, Matsuura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane JA, Jacobs PA (1980) A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* 44:151-178.

- Hodes-Wertz B, Grifo J, Ghadir S, Kaplan B, Laskin CA, Glassner M e Munne S (2012) Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. *Fertil Steril* 98:675-80.
- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC e Urvashi S (2003) The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 189:397–400.
- Hu C, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y e Nelson DM (2006) Enhanced basal apoptosis in cultured term human cytotrophoblasts is associated. *Placenta* 27:978-83.
- Hu W (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 00: a001073.
- Hu W, Feng Z, Ma L, Wagner J, Rice JJ, Stolovitzky G e Levine AJ (2007a) A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells. *Cancer Res* 67:2757-2765.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK e Levine AJ (2007b) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 450:721–724.
- Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, Roberts KA e Nestler JE (2002) Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87:524–529.
- Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB e Exalto NE (2006) (ESHRE) Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 21:2216–2222.
- Jivraj S, Anstie B, Cheong YC, Fairlie FM, Laird S e Li TC (2001) Obstetric and neonatal outcome in women with a history of recurrent miscarriage: a cohort study. *Hum Reprod* 16:102–06.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X *et al.* (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1q36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90:809–819.
- Kalilani L e Atashili J (2006) Measuring additive interaction using odds ratios. *Epidemiol Perspect Innov* 18(3):5.
- Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbecke TR, Rosenwaks Z, Levine AJ e Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *PNAS* 106(24):9761–9766.
- Kay C, Jeyendran RS e Coulam CB (2006) p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation. *Reprod Biomed Online* 13:492-6.
- Kesmodel U, Wisborg K, Olsen SF, Henriksen TB e Secher NJ (2002) Moderate alcohol intake in pregnancy and the risk of spontaneous abortion. *Alcohol* 37:435–44.

- Killick R, Niklison-Chirou M, Tomasini R, Bano D, Rufini A, Grespi F, Velletri T, Tucci P, Sayan BS, Conforti F et al. (2011) p73: a multifunctional protein in neurobiology. *Mol Neurobiol* 43:139–146.
- Kline J, Levin B, Kinney A, Stein Z, Susser M e Warburton D (1995) Cigarette smoking and spontaneous abortion of known karyotype: precise data but uncertain inferences. *Am J Epidemiol* 141:417-427.
- Kumar S (2011) Occupational, environmental and lifestyle factors associated with spontaneous. *Reprod Sci* 18:915-30.
- Kurita T, Cunha GR, Robboy SJ, Mills A e Medina RT (2005) Differential expression of p63 isoforms in female reproductive organs. *Mech Dev* 122:1043–1055.
- Lang A, Wegman PP e Wingren S (2009) The significance of MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro in young women with breast cancer. *Oncology Reports* 22:575-579.
- Lashen H, Fear K e Sturdee DW (2004) Obesity is associated with increased risk of first trimester and recurrent miscarriage: matched case-control study. *Hum Reprod* 19:1644–46.
- Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, Lisa Baumeister, Doyle DL, Leppig K, Pettersen B, Resta R, Shields L, Uhrich S *et al.* (2005) Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendation of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Counsel* 14(3):165-181.
- Leon PM, Campos VF, Thurow HS, Hartwig FP, Selau LP, Dellagostin OA, Neto JB, Deschamps JC, Seixas FK e Collares T (2012) Association between single nucleotide polymorphisms in p53 and abortion in in Thoroughbred mares. *Vet J* 193:573-5.
- Levine AJ, Hu W e Feng Z (2006) The P53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13:1027–1036.
- Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW e Melino G (2011) The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 259-265.
- Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT, Sadovsky Y e Nelson DM (2002) Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is. *Am J Obstet Gynecol* 186:1056-61.
- Lin PC (2004) Reproductive outcomes in women with uterine anomalies. *J Womens Health* 13:33-39.
- Lindbohm ML, Sallmen M e Taskinen H (2002) Effects of exposure to environmental tobacco smoke on reproductive health. *Scand J Work Environ Health* 28(2):84–6.
- Liu F, Liu L, Li B, Wei YG, Yan LN, Wen TF, Xu MQ, Wang WT e Yang JY (2011) p73 G4C14-A4T14 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 27 case–control studies. *Mutagenesis* 26(4):573-81.
- Lockwood CJ (2002) Inherited thrombophilias in pregnant patients: Detection and treatment paradigm. *Obstet Gynecol* 99(2):333–341.

- Marine JCW, Dyer MA e Jochemsen AG (2007) MDMX: from bench to bedside. *J. Cell Sci.* 120:371-378.
- Melino G (2010) Journal club. A cancer biologist weighs up p53, metabolism and cancer. *Nature* 466:905.
- Metcalf D (1992) Leukaemia inhibitory factor – a puzzling polyfunctional regulator. *Growth Factors* 7:169–173.
- Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C e Jochemsen AG (2005) Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2. *Mol Cell* 18:565–576.
- Meyer G, Cabrera Socorro A, Perez Garcia CG, Martinez Millan L, Walker N, Caput D, (2004) Developmental roles of p73 in Cajal–Retzius cells and cortical patterning. *J Neurosci* 24:9878–9887.
- Michels TC & Tiu AY (2007) Second Trimester Pregnancy Loss. *American Family Physician* 76(9):1341-1346.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR e Bradley A (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398:708–713.
- Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, Friese K e Makrigiannakis A (2007) Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes. *Mol Hum Reprod* 13:663-73.
- Misra C, Majumder M, Bajaj S, Ghosh S, Roy B e Roychoudhury S (2009) Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 Loci Modulate the Risk of Tobacco Associated Leukoplakia and Oral Cancer. *Molecular Carcinogenesis* 48:790–800.
- Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL *et al.* (2006) International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 4(2):295-306.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D e Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245.
- Ness RB, Grisso JA, Hirshinger N, Markovic N, Shaw LM, Day NL e Kline J (1999) Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 340:333–9.
- Neves Filho EH, Cordeiro DE, Vieira AP e Rabenhorst SH (2012) TP53 codon 72 and intron 3 polymorphisms and mutational status in gastric cancer: an association with tumor onset and prognosis. *Pathobiology* 79(6):323-8.
- Nielsen HS, Steffensen R, Lund M, Egestad L, Mortensen LH, Andersen A-MN, Lidegaard O e Christiansen OB (2010) Frequency and impact of obstetric complications prior and subsequent to unexplained secondary recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 25:1543–52.

- Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y e Kondo S (1996) p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nat Med* 2:577-80.
- Nybo Andersen AM, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J e Melbye M (2000) Maternal age and fetal loss: population based register linkage study. *BMJ* 320:1708–12.
- Okahisa Y, Ujike H, Kunugi H, Ishihara T, Kodama M, Takaki M, Kotaka T e Kuroda S (2010) Leukemia inhibitory factor gene is associated with schizophrenia and working memory function. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34:172–176.
- Pandey MK, Rani R e Agrawal S (2005) An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet* 272:95–108.
- Parazzini F, Acaia B, Ricciardiello O, Fedele L, Liati P e Candiani GB (1988) Short term reproductive prognosis when no cause can be found for recurrent miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol*, 95:654–658.
- Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC e Tempfer C (2005) Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumour suppressor gene. *Human Reproduction* 20(4):848–851.
- Quenby S, Vince G, Farquharson R e Aplin J (2002) Recurrent miscarriage: a defect in nature's quality control? *Hum Reprod.* 17(8):1959-63.
- Quenby SM e Farquharson RG (1993) Predicting recurring miscarriage: what is important? *Obstet Gynecol* 82(1):132-8.
- Rai R e Reagan L (2006) Recurrent miscarriage. *Lancet* 368:601-611.
- Rai R, Backos M, Rushworth F e Regan L (2000). Polycystic ovaries and recurrent miscarriage – a reappraisal. *Human Reproduction* 15(3):612-615.
- Rasch V (2003) Cigarette, alcohol and cocaine consumption: Risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:182–88.
- Rasch V (2003) Cigarette, alcohol, and caffeine consumption: risk factors for spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:182-188.
- Regan L, Braude PR e Trembath PL (1989) Influence of past reproductive performance on risk of spontaneous abortion. *BMJ* 299:541–545.
- Reincke S, Govbakh L, Wilhelm B, Jin H, Bogdanova N, Bremer M, Karstens JH e Dörk T (2008) Mutation analysis of the MDM4 gene in German breast cancer patients. *BMC Cancer* 8:1-7.
- Reynolds LP e Redmer DA (2001) Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod* 64:1033–1040.
- Reynolds LP, Killilea SD e Redmer DA (1992) Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 6:886–892.

- Ricks-Santi L, Mason T, Apprey V, Ahaghotu C, McLaughlin A, Josey D, Bonney G e Dunston GM (2010) p53 Pro72Arg polymorphism and prostate cancer in men of African descent. *Prostate* 70(16):1739-45.
- Riley T, Sontag E, Chen P e Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5):402-12.
- Robinson RC, Grey LM, Staunton D, Vankelecom H, Vernallis AB, Moreau JF, Stuart DI, Heath JK e Jones EY (1994) The crystal structure and biological function of leukaemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell* 77:1101–1116.
- Rotter V, Schwartz D, Almon E, Goldfinger N, Kapon A, Meshoreri A, Donehower LA e Levine AJ (1993) Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 90:9075-9079.
- Sabbatini P e McCormick F (2002) MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA Cell Biol* 21:519-525.
- Salvioli S, Bonafé M, Barbi C, Storci G, Trapassi C, Tocco F, Gravina S, Rossi M, Tiberi L, Mondello C *et al.* (2005) p53 Codon 72 Alleles Influence the Response to Anticancer Drugs in Cells from Aged People by Regulating the Cell Cycle Inhibitor p21^{WAF1}. *Cell Cycle* 4(9):1264-1271.
- Savion S, Lepsky E, Orenstein H, Carp H, Shepshelovich J, Torchinsky A, Fein A e Toder V (2002) Apoptosis in the uterus of mice with pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol* 47:118-27.
- Scacchi R, Gambina G, Moretto G e Corbo RM (2009) Association study between P53 and P73 gene polymorphisms and the sporadic late-onset form of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 116:1179–1184.
- Sebire NJ, Jolly M, Harris JP, Wadsworth J, Joffe M, Beard RW, Regan L e Robinson S. (2001) Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes* 25:1175–82.
- Shan J, Brooks C, Kon N, Li M, Gu W (2008) Dissecting roles of ubiquitination in the p53 pathway. *Ernst Schering Found Symp Proc* 127–136.
- Shapira E, Ratzon R, Shoham-Vardi I, Serjienko R, Mazor M e Bashiri A (2012) Primary vs. secondary recurrent pregnancy loss - epidemiological characteristics, etiology, and next pregnancy outcome. *J Perinat Med* 40(4):389-96.
- Smith SC, Baker PN e Symonds EM (1997) Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 177: 57–65.
- Stahl J, Gearing DP, Willson TA, Brown MA, King JA, e Gough NM (1990) Structural organization of the genes for murine and human leukaemia inhibitory factor. Evolutionary conservation of coding and non-coding regions. *J Biol Chem* 265:8833–41.
- Stephenson M e Kutteh W (2007) Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin. Obstet. Gynecol.* 50:132–145.

- Stephenson MD (1996) Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril* 66:24-29.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F e Abbondanzo SJ (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76-79.
- Su MT, Lin SH e Chen YC (2011) Association of sex hormone receptor gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 96:1435-1444.
- Suh EK, Yang A, Kettenbach A, Bamberger C, Michaelis AH, Zhu Z, Elvin JA, Bronson RT, Crum CP e McKeon F (2006) p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 444:624-628.
- Sullivan AE, Silver RM, LaCoursiere DY, Porter TF e Branch DW (2004) Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstet Gynecol* 104:784-88.
- Summers PR (1994) Microbiology relevant to recurrent miscarriage. *Clin Obstet Gynecol* 37:722-729.
- Talos F, Nemajerova A, Flores ER, Petrenko O e Moll U (2007) p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Mol Cell* 27:647-659.
- Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F e Huber JC (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 16:1644-1647.
- Tomasini R, Mak TW e Melino G (2008a) The impact of p53 and p73 on aneuploidy and cancer. *Trends Cell Biol* 18:244-252.
- Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS et al. (2008b) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 22:2677-2691.
- Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thalerb CJ e Makrigiannakis A (2010) Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *Journal of Reproductive Immunology* 85:25-32.
- Traina E, Daher S, Moron AF, Sun SY, Franchim CS e Mattar R (2011) Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 88:53-57.
- Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C et al. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415:45-53.
- van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Vanmolkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J, Merks GF, et al (2001) p63 Gene mutations in EEC syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69:481-492.

- van den Boogaard E, Kaandrop SP, Franssen MTM, Mol BWJ, Leschot NJ, Wouters CH, van der Veen F, Korevaar JC e Goddijn M (2010) Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: is there any difference in carrier status. *Hum Reprod.* 25:1411–4.
- van den Heuvel MJ, Peralta CG, Hatta K, Han VK e Clark DA (2007) Decline in number of elevated blood CD3(+) CD56(+) NKT cells in response to intravenous immunoglobulin treatment correlates with successful pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 58:447–459.
- Vousden KH e Prives C (2009) Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* 137:413-431.
- Vujaklija DV, Sucic S, Gulic T, Dominovic M e Rukavina D (2012) Cell death mechanisms at the maternal-fetal interface: insights into the role of. *Clin Dev Immunol* 2012:180272.
- Wade M, Wang YV e Wahl GM (2010) The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell. Biol.* 20:299-309.
- Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W e French J (2003) Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertil Steril* 79:577-84.
- Wei P, Jin X, Zhang XS, Hu ZY, Han CS e Liu YX (2005) Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal-maternal interface of rhesus monkey. *Reprod Biol Endocrinol* 3:4.
- Wilhelm MT, Rufini A, Wetzel MK, Tsuchihara K, Inoue S, Tomasini R, Itie-Youten A, Wakeham A, Arsenian-Henriksson R, Melino G et al. (2010) Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes Dev* 24:549–560.
- Xiong X, Wang M, Wang L, Liu J, Zhao X, Tian Z e Wang J (2009) Risk of MDM2 SNP309 alone or in combination with the p53 codon 72 polymorphism in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 33:1454–1458.
- Yamauchi H, Katayama K, Ueno M, He XJ, Mikami T, Uetsuka K, Doi K e Nakayama H (2007) Essential role of p53 in trophoblastic apoptosis induced in the developing rodent. *Apoptosis* 12:1743-54.
- Yang A, Kaghad M, Caput D e McKeon F (2002) On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 18:90–95.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C e McKeon F (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398:714–718.
- Zdzalik M, Pustelny K, Kedracka-Krok S, Huben K, Pecak A, Wladyka B, Jankowski S, Dubin A, Potempa J e Dubin G (2010) Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell Cycle.* Nov 15(22):4584-91.

Zeng X, Chen L, Jost CA, Maya R, Keller D, Wang X, Kaelin WG, Oren M, Chen J e Lu H (1999) MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Mol Cell Biol* 19:3257–3266.

APÊNDICES

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FATORES GENÉTICOS DE RISCO PARA PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES *TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO*

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

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

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

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

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

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

() sim () não

Nome da paciente: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável:

Dra. Maria Teresa Vieira Sanseverino – pesquisadora responsável

Serviço de Genética Médica do HCPA – fone 3359-8011

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

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

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

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

IDENTIFICAÇÃO

Cônjuge da Paciente

- Nome: _____
- Data nascimento: _____ Idade: _____
- Profissão/ocup: _____
- Escolaridade: _____

Paciente

- Nome: _____
- Endereço: _____
- Bairro: _____ Cidade: _____
- CEP: _____
- Fone casa: _____ Fone Cel: _____
- Data nascimento: _____ Idade: _____
- Profissão/ocup: _____
- Escolaridade: _____
- Peso habitual: _____ kg Peso atual: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____
- Doença auto-imune: _____
- Histórico de Tumor/Câncer: _____

	Paciente	Cônjuge	Familiares da paciente	Familiares do Cônjuge
Tumor				
Câncer				

- Grupo Sanguíneo: _____ Fator RH: () positivo () negativo () não sabe
- Consangüinidade do Casal: () Sim () Não Obs.: _____
- Dificuldades para engravidar? () Sim () Não
- Gestações: _____
- NV: _____
- NM: _____
- Abortamento espontâneo: _____
- Abortamento provocado: _____
- 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			

31. Dados gestacionais:

Nº gest	Ano	Pré-natal local	Gesta planej	Uso de fólico peric qdade/data	Compl	HCG	ECO/data	Parto C/N	Curetag	Nvivo	Nmorto	Abort espon	Obs

32. Pesquisa de variantes gênicas relacionadas à via de sinalização da TP53

Gene	Polimorfismo	Resultado
Gene <i>TP53</i>	Pro72Arg (rs1042522)	

Gene <i>TP63</i>	SNP T>G intron 4 (rs17506395)	
Gene <i>MDM2</i>	SNP309 T>G (rs2279744)	

Gene <i>MDM4</i>	SNP T>C intron 9 (rs1563828)	
Gene	Polimorfismo	Resultado
Gene <i>USP7</i>	SNP G>A intron 25 (rs1529916)	

Gene <i>LIF</i>	SNP G>T 3' UTR (rs929271)	
Gene <i>TP73</i>	SNP [4G>A; 14C>T] (rs2273953, rs1801173)	

33. Resumo da investigação realizada

CAUSA	EXAME	S/N	DATA	NORMAL	ANORMAL	OBS
Genética	Cariótipo do esposa					
	Cariótipo do esposo					
	Cariótipo do material de aborto					
Anatômica	Histeroscopia					
	Ecografia					
	Laparoscopia					
	Histerossalpingografia					
	Defeito mülleriano					
	Incompetência Istmocervical					
Endócrina	Biópsia de endométrio					
	Gonadotrofinas					
	Prolactina					
	Hormônios tireóideos					

	TPO - tireoperoxidase					
	Glicemia					
	Outros distúrbios identificados					
Trombofilias adquiridas	Ac anticardiolipina					
	Ac lúpico anticoagulante					
	FAN fator antinuclear					
Outras						