

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FAMÍLIA GÊNICA EGF-CFC E SUAS VIAS
GÊNICAS DE MODULAÇÃO NAS PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES**

João Matheus Bremm

Orientadora: Maria Teresa Vieira Sanseverino
Co-orientador: Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre Junho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FAMÍLIA GÊNICA EGF-CFC E SUAS VIAS
GÊNICAS DE MODULAÇÃO NAS PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES**

João Matheus Bremm

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: Maria Teresa Vieira Sanseverino

Co-orientador: Lucas Rosa Fraga

Porto Alegre Junho de 2019

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).

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 e no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao PPGBM/UFRGS.

“A educação é o único caminho para emancipar o homem. Desenvolvimento sem educação é criação de riquezas apenas para alguns privilegiados.”

Leonel Brizola

A todos educandos e educadores que ainda resistem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a minha mãe que é a pessoa mais importante da minha vida e também minha melhor amiga. Sem o suporte dela eu nunca teria chegado a lugar algum. Também quero agradecer ao meu pai, que mesmo com sua grossura de ser, me ama incondicionalmente e me dá suporte para que eu possa alçar voos cada vez mais altos. Por fim, e não menos importante, na sessão família, quero agradecer as minhas irmãs Mauri e Mari por existirem na minha vida, e por terem me dado as coisas mais preciosas do mundo, que são o Arthur e a Sofia.

Quero agradecer minha orientadora Tere pelo acolhimento e cuidado que sempre teve comigo, por sempre ter acreditado em mim, por ter me dado oportunidade de aprender e mostrar meu trabalho em lugares que eu não teria sozinho. Obrigado Tere por ser essa pessoa iluminada que o cara lá de cima colocou no meu caminho.

Ao meu Co-orientador (que de co- não tem nada) Lucas, pois sempre esteve presente em todos os momentos do meu mestrado. Obrigado Lucas por ser esse excepcional orientador e exemplo de integridade.

Ao meu irmão de pós-graduação Marcus, que foi incansável em me ajudar sempre que necessário. Sem sua colaboração esse trabalho não seria possível.

A Anninha e Flávia (que também é minha irmã de pós), pela ajuda mental que vocês me deram, tornando tudo muito mais leve.

A todo o pessoal do Lab113 e do LabChicken, em especial Thayne, Julia, Lulu e Juliano, por sempre estarem dispostos a me ensinar, e à Bruna e à Gabizinha por aturarem minhas rabugices e sempre me colocarem para cima.

Agradeço também a todos os proferossores do PPGBM e funcionarios do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelos ensinamentos, conversas e orientações.

Ao Elmo e ao Rodrigo do PPGBM pela disponibilidade e disposição para ajudar os alunos do programa em tudo que for possível.

A TODOS os meus colegas de graduação, em especial a Raquel, pois esse trabalho é fruto de um sonho nosso do passado. Sem o incentivo dela lá no inicio, nada disso seria possível.

Por fim agradeço a Deus, que por mais que eu não tenha certeza de sua existência, sempre habita meus pensamentos e me tranquiliza!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
CAPÍTULO 1: Introdução	13
1.1. Perdas Gestacionais.....	14
1.1.1. Classificação das Perdas Gestacionais	15
1.1.2. Perdas Gestacionais Recorrentes (PRG)	16
1.1.2.1. Etiologia das Perdas Gestacionais Recorrentes	19
1.2.2.1.1 Etiologia das Perdas Gestacionais Recorrentes: fatores não genéticos	21
1.2.2.1.2 Fatores Genéticos em Perdas Gestacionais Recorrentes	22
1.2. A família EGF-CFC	24
1.2.1. <i>CFC1 (Cryptic)</i>	26
1.2.2. <i>TDGF1 (Cripto-1)</i>	27
1.2.4. <i>TDGF1 (Cripto-1)</i> e reprodução	29
1.2.5. Interação da família EGF-CFC com Notch	30
1.2.6. Interação da família EGF-CFC com c-Src/MAPK/PI3K/AKT	30
1.2.7. Interação da família EGF-CFC e Wnt/ β -Catenina	31
1.2.8. Interação da família EGF-CFC e TGF- β	31
1.2.4.1. Smads	33
1.2.4.2. <i>SMAD3</i>	34
CAPÍTULO 2: Objetivo e Justificativa	36
CAPÍTULO 3: Investigating the role of EGF-CFC gene family in recurrent pregnancy losses through multiple approaches	40
CAPÍTULO 4: <i>SMAD3</i> gene is associated with recurrent pregnancy loss	92
CAPÍTULO 5: Análises dos Subgrupos de Mulheres com Perdas Gestacionais Recorrentes	131
CAPÍTULO 6: Discussão	137
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
APÊNDICES	163

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG: *American College of Obstetricians and Gynecologists* (Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas)

AKT: Proteína quinase B

A-P: Antero-posterior

AP-1: *Activator protein 1* (Proteína ativadora 1)

APS: *Antiphospholipid Syndrome* (Síndrome do anticorpo antifosfolípide)

ASRM: *American Society for Reproductive Medicine* (Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva)

BMPs: *Bone Morphogenic Proteins* (Proteínas morfogenéticas ósseas)

CFC1: Gene *Cripto, FRL-1, cryptic family 1*

CREB: *cAMP Response Element-Binding Protein* (Proteína de ligação ao elemento de resposta a cAMP)

c-Src: Proto-oncogene da proteína tirosina-quinase Sr

CVS: *Chorionic Villus Sampling* (Amostragem de vilosidades coriônicas)

E-D: Esquerdo-direito

EGF-CFC: *Epidermal Growth Factor- fator de crescimento epidérmico – Cripto/Frl-1/*

Cryptic (Fator de crescimento epidérmico – *Cripto/Frl-1/ Cryptic*)

ESHRE: *European Society of Human Reproduction and Embryology* (Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia)

EVT: *Extravillous trophoblast* (Célula trofoblástica extravílica)

FGF: *Fibroblast Growth Factor* (Fator de crescimento de fibroblasto)

G-CSF: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulador de colônias de granulócitos)

GDF: *Growth Differentiation Factor* (Fator de Diferenciação de Crescimento)

GEO: *Gene Omnibus Expression*

GO: *Gene Ontology Consortium* (Consórcio de Ontologia Genética)

hCG: *Human gonadotrophin Corionic* (Gonadotrofina coriônica humana)

IFN γ : Interferon gamma

IL-6: Interleucina-6

IV Ig: imunoglobulina intravenosa;

JunB: Fator de Transcrição Jun-B

KEEG: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Enciclopédia de Quioto de genes e genomas)

LMWH: *Low Molecular Weight Heparin* (Heparina de baixo peso molecular)

mRNA: *messenger Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico mensageiro)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* (Proteína-quinase ativada por mitógeno)

MMP1: *Matrix metalloproteinase 1* (Matriz metalopeptidase 1)

OR: *Odds Ratio* (Razão de chance)

PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor-1* (Inibidor do ativador do plasminogênio-1)

PGR: Perdas Gestacionais Recorrentes

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)

PGT: *Preimplantational Genetic Test* (Teste genético pré-implantação)

RCOG: *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* (Colégio Real de Obstetras e Ginecologistas)

SH: Síndrome de Heterotaxia

SOP: Síndrome do Ovário Policístico

TDGF1: Gene *Teratocarcinoma-derived growth factor 1*

TGF- β : *Transforming Growth Factor- beta* (Fatores de Crescimento Transformante- beta)

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor - Alpha* (Fatores de Necrose Tumoral – Alfa)

UFH: *Unfractionated Heparin* (Heparina não fracionada)

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular)

RESUMO

As Perdas Gestacionais Recorrentes (PGR) são definidas como duas ou mais perdas gestacionais consecutivas antes das 24 semanas de gestação. É uma condição de etiologia complexa que ocorre em cerca de 5% de todos os casais que tentam ter filhos. As PGR constituem uma condição reprodutiva que merece ser alvo de investigação, já que sua etiologia permanece desconhecida em aproximadamente 50% dos casos. Vários estudos avaliaram as causas genéticas da suscetibilidade às PGR. Nesse contexto, variantes nos genes da família EGF-CFC e suas vias de sinalização são fortes candidatas, já que esses genes desempenham um papel importante na implantação, na placentação, no reconhecimento embrio-materno e no desenvolvimento embrionário. A família gênica EGF-CFC é composta pelos genes *TDGF1* (Cripto-1) e *CFC1* (Cryptic) que são genes do desenvolvimento fundamentais para a angiogênese e o estabelecimento dos eixos corporais. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel desta família e suas vias de sinalização nas PGR. Para isso, múltiplas abordagens foram realizadas: análise de expressão usando dados secundários do banco de dados *Gene Onibus Expression* (GEO); análises *in silico* de predições funcionais e biologia de sistemas, e um estudo de caso-controle de discriminação alélica. Análises de expressão mostraram que existe uma diminuição na expressão de *TDGF1* (Cripto-1) no endométrio ($p=0.049$) e de *CFC1* (Cryptic) ($p=0.015$) na placenta de mulheres com PGR, o que mostra uma possível influência dessa família nas PGR. Para esclarecer os mecanismos pelos quais esses genes poderiam estar envolvidos na patogênese das PGR, análise de redes, ontologias e revisão da literatura, de forma conjunta, apontaram um forte associação entre essa família gênica e respostas celulares a TGF- β , c-Src/MAPK/AKT, Wnt/ β -catenina, Notch, TNF α , IFN γ , IL-6 e hipóxia. Essas vias desempenham papel-chave durante a gestação, controlando a proliferação celular, a decidualização, a angiogênese, a apoptose, o reconhecimento embrio-materno, a implantação embrionária, a placentação, bem como o desenvolvimento embrionário de maneira geral. Alterações em qualquer uma dessas vias podem conduzir a uma perda gestacional. Para avaliar se variações nesses genes estão relacionadas às PGR, um escore de patogenicidade foi desenvolvido pelo nosso grupo e atribuído a cada variante. Essa análise indicou que a variante rs3806702 (c.-14+1429T>C) do gene *TDGF1* (Cripto-1) e a variante rs201431919 (p.Arg47Gln) do gene *CFC1* (Cryptic) são as que tem o maior efeito nas PGR. Realizamos, consecutivamente, um estudo de caso-controle com 149 casos de mulheres com PGR e 159 controles sem história de infertilidade,

PGR, com pelo menos duas gestações a termo. Quando comparamos as frequências alélicas e genotípicas dessas variantes entre os dois grupos, a diferença encontrada por nós não foi estatisticamente significativa. No entanto, quando uma variante do gene *SMAD3* (rs17293443 ou c.207-19370T>C), já relacionada à fertilidade, foi genotipada nesses grupos, observamos uma associação entre essa variante e as PGR. Isto representa outra evidência que liga uma via (TGF- β) modulada pela família de genes EGF-CFC às PGR. Embora os mecanismos moleculares precisos ainda sejam desconhecidos, existem várias evidências que nos apontam para o envolvimento da família EGF-CFC nas PGR. Ainda, mais estudos sobre essa família gênica são necessários para elucidar os mecanismos precisos que influenciam a etiologia das PGR.

Palavras-chave: Perdas Gestacionais Recorrentes, Cripto-1, Cryptic, Smad3, EGF-CFC, Invasão trofoblástica.

ABSTRACT

Recurrent Pregnancy Losses (RPL) are defined as two or more consecutive gestational losses before 24 weeks of pregnancy. This condition occurs in about 5% of all couples that try to have children, and its complex etiology remains unexplained in approximately 50% of the cases. Several studies have evaluated putative genetic causes of susceptibility to RPL. In this context, variants in the genes of the EGF-CFC family and their signaling pathways are strong candidates to be assessed, since these genes play an important role in embryo implantation, placentation, embryo-maternal recognition, and embryonic development. The EGF-CFC gene family is composed of *TDGF1* (*Cripto-1*) and *CFC1* (*Cryptic*), two developmental genes fundamental for angiogenesis and establishment of body axes. The aim of this study was to evaluate the role of this family and its signaling pathways in RPL. To do so, multiple approaches were employed: expression analysis using secondary data from the Gene Omnibus Expression (GEO) database; *in silico* analysis of functional prediction and systems biology, and a case-control study of allelic discrimination. Expression analysis showed that both *TDGF1* (p=0.049) and *CFC1* (p=0.015) are downregulated, respectively, in the endometrium and in the placenta of women who underwent RPL, suggesting a possible influence of this gene family in RPL. In order to clarify the mechanisms by which these genes may be involved in the pathogenesis of RPL, network analysis, ontology and literature review, all together, revealed a powerful connection between this family of genes and cellular responses to TGF- β , c-Src/MAPK/AKT, Wnt/ β -catenin, Notch, TNF α , IFN γ , IL-6 and hypoxia. These pathways play a key role during pregnancy by controlling cell proliferation, decidualization, angiogenesis, apoptosis, embryo-maternal recognition, embryo implantation, placentation as well as embryonic development in general. Changes in any of these pathways may lead to a pregnancy loss. To evaluate if variations in these genes are related to RPL, a pathogenicity score, developed by our group, was attributed to each variant. This analysis indicated that *TDGF1*'s variant rs3806702 (c.-14+1429T>C) and *CFC1*'s variant rs201431919 (p.Arg47Gln) are the ones that have the greatest effect on RPL. We then carried out a case-control study with 149 cases of women with RPL and 159 controls with no history of infertility, RPL, with at least two full-term pregnancies. When we compared the allelic and genotypic frequencies of these variants between the two groups, the difference found by us was not statistically significant. However, when a variant of the *SMAD3* gene (rs17293443 or c.207-19370T>C), already related to fertility, was genotyped in these groups, we observed an association between this variant and RPL. This represents another evidence that links one

pathway (TGF- β) modulated by the EGF-CFC gene family to RPL. Although the precise molecular mechanisms are still unknown, there are several pieces of evidence that point us to the involvement of the EGF-CFC family in RPL. Yet, further studies on this gene family are needed to elucidate the precise mechanisms that influence the etiology of RPL.

Keywords: Recurrent Pregnancy Losses, Cripto-1, Cryptic, Smad3, EGF-CFC, Trophoblastic invasion

CAPÍTULO 1
Introdução

1.1. Perdas Gestacionais

A reprodução humana é consideravelmente ineficaz, uma vez que cerca de 70% de suas concepções não sobrevivem até o nascimento (HYDE; SCHUST, 2015). A incapacidade de concepção, seja por dificuldade em engravidar ou em manter a gestação, está relacionada a fatores femininos em 45% dos casos, fatores masculinos em 30% e a causas desconhecidas em 25% (GIBBS; DANFORTH, 2008). Apesar dos grandes avanços em diagnóstico e tratamento da infertilidade, a sua prevalência cresce a cada ano. De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), um a cada seis casais enfrenta algum tipo de dificuldade ao tentar engravidar, o que corresponde a um total de 80 milhões de pessoas em todo o mundo (TOURNAYE; COHLEN, 2012).

As perdas gestacionais e/ou aborto espontâneo 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). Para fins de pesquisa, elas são definidas como falhas na gravidez antes da viabilidade do feto (KOLTE *et al.*, 2015a).

Uma perda gestacional é definida como o término espontâneo de uma gravidez antes que o feto atinja a viabilidade. Na prática, esse termo inclui perdas gestacionais até a 24ª semana de gestação; devido aos avanços dos cuidados neonatais, porém, há relatos de bebês que sobreviveram com menos de 24 semanas de gestação. Logo, diferentes definições são aplicadas em diferentes países (RCOG, 2011; BENDER ATIK *et al.*, 2018). Essas perdas podem ser subdivididas em abortamentos precoces (antes de 10 semanas de gestação) ou tardios (de 10 a 24 semanas).

A incidência de perdas gestacionais é comum, ocorrendo em aproximadamente 15-25% das gravidezes clinicamente reconhecidas. A maioria desses abortamentos que ocorre nas primeiras 10 semanas de gestação acontecem devido a anomalias cromossômicas (ACOG, 2012). A incidência exata de abortamentos não é conhecida devido à dificuldade em reconhecer concepções e perdas precoces (ACOG, 2002; WHO, 1977). Aproximadamente 15% de todas as gravidezes clinicamente reconhecidas resultam em perda gestacional espontânea. Considerando que existem muitas gestações que falham antes de serem clinicamente reconhecidas, estima-se que apenas 30% de todas as concepções resultam em um nascido vivo e que 80% das perdas gestacionais ocorram no primeiro trimestre (FORD; SCHUST, 2009a).

Cerca de um quarto das mulheres experimentam pelo menos um abortamento espontâneo durante suas vidas (VAN DEN BERG *et al.*, 2012). Dentre essas, estima-se que

aproximadamente 5% das mulheres sofrerão duas perdas gestacionais consecutivas e cerca de 1% experimentará três ou mais (ACOG, 2002; KASER, 2018; MICHELS; TIU, 2007).

A etiologia dos abortamentos de repetição permanece desconhecida em cerca de metade dos casos (KLEBANOFF; *et al.*, 2011). 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, fatores anatômicos, imunológicos, infecciosos e trombofilias. No segundo e terceiro trimestres, além desses fatores, 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 classificar as perdas gestacionais, é considerada a idade gestacional, características embrionárias do aborto e a recorrência dessas perdas. As perdas gestacionais podem ser classificadas em:

- a) **Perda gestacional esporádica:** uma perda gestacional espontânea com menos de 24 semanas de gestação. Perdas de gravidez após a concepção espontânea e após os tratamentos de TARV (Terapia antiretroviral) devem ser incluídas na definição. As gravidezes ectópicas, molares e as falhas de implantação não se enquadram nesta definição (BENDER ATIK *et al.*, 2018).
- b) **Perda gestacional esporádica precoce:** consiste em uma perda gestacional esporádica que tenha ocorrido com menos de 10 semanas de gestação (SARAVELOS; REGAN, 2014).
- c) **Gestação anembrionada:** ocorrência da visualização ultra-sonográfica do saco gestacional sem a presença de embrião com idade gestacional superior a 7,5 semanas (FIRTH & HURST 2005).
- d) **Abortamento retido:** identificação de partes fetais no saco gestacional, mas sem atividade cardíaca na gestação com menos de 24 semanas (FIRTH & HURST 2005).
- e) **Morte fetal intrauterina:** morte fetal com mais de 24 semanas, mas antes do início do trabalho de parto (FIRTH & HURST 2005).

f) Perdas gestacionais recorrentes: ocorrência de duas ou mais perdas gestacionais antes das 24 semanas de gestação (BENDER ATIK *et al.*, 2018).

g) Abortamento de repetição: ocorrência de duas ou mais perdas gestacionais, antes das 24 semanas de gestação, que tenha sido confirmada como aborto espontâneo intrauterino, excluindo perdas de gravidez ectópica (BENDER ATIK *et al.*, 2018).

1.1.2. Perdas Gestacionais Recorrentes (PRG)

A perda recorrente da gravidez é um problema reprodutivo heterogêneo, com múltiplas etiologias e fatores contribuintes (KOLTE *et al.*, 2015a). Atualmente o conceito mais usado para definir as PGR é o de duas ou mais perdas gestacionais que ocorrem antes das 24 semanas de gestação (ASRM, 2012; BENDER ATIK *et al.*, 2018). Entretanto, há divergências entre algumas diretrizes internacionais quanto ao número de perdas gestacionais mínimas para que se considere tal condição, sendo que alguns consideram PGR como duas ou mais perdas e outros como três ou mais perdas consecutivas (KOLTE *et al.*, 2015a). As definições e terminologias para essa condição apresentam como principais diferenças o número de perdas gestacionais e os tipos de perdas (preoces ou tardias) (SARAVELLOS; REGAN, 2014).

Segundo a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE) (BENDER ATIK *et al.*, 2018), recomenda-se o uso de "Perdas Gestacionais Recorrentes" para descrever o fim repetido da gravidez. Já o uso do termo "abortamento recorrentes" só serve para descrever casos em que todas as perdas gestacionais foram confirmadas como abortos intrauterinos.

No contexto da pesquisa e da prática clínica, o número e os tipos de perdas gestacionais que são usados em uma definição são extremamente importantes, pois podem resultar em diferentes coortes de pacientes com diferentes anormalidades, diferentes prognósticos e diferentes necessidades de cuidados de saúde (EL HACHEM *et al.*, 2017).

As PGR são importantes problemas na saúde reprodutiva, porque afetam 2-5% dos casais. As PGR são classificadas em três tipos: as PGR primárias referem-se a perdas múltiplas em uma mulher sem bebês viáveis anteriores, enquanto que as PGR secundárias referem-se a perdas múltiplas em uma mulher que já teve uma gravidez além de 24 semanas de gestação. Por último, as PGR terciárias referem-se a perdas gestacionais múltiplas entre gestações normais (EL HACHEM *et al.*, 2017).

O risco de perdas gestacionais tem uma relação direta com o aumento da idade materna, aumentando abruptamente após os 35 anos de idade. Esse risco também apresenta relação com o sucesso das gestações anteriores, sendo de aproximadamente 20% após uma perda gestacional, 28% após duas perdas gestacionais consecutivas e 43% após três ou mais perdas gestacionais consecutivas (Tabela 1) (ACOG, 2002; CHETTY & DUNCAN, 2015; FORD & SCHUST, 2009; REGAN *et al.*, 1989). De maneira inversa, a taxa de perdas gestacionais diminui com o progresso da gestação, sendo que menos de 5% das perdas ocorrem entre a 13^a e 19^a semana, e apenas 0,3% ocorrem após 20 semanas (MICHELIS; TIU, 2007; WANG *et al.*, 2003).

Tabela 1: Valores aproximados de risco de PGR em relação ao(s) sucesso(s) de gestações anteriores

História de sucesso em gestações anteriores	Perdas gestacionais prévias	Probabilidade de perda gestacional (%)
Mulheres com nascidos vivos	0	5–10
	1	20–25
	2	25
	3	30
	4	30
Mulheres sem nascidos vivos	3	30–40

Adaptado de POLAND *et al.*, 1977.

Além dos impactos fisiológicos no corpo da mãe, as PGR causam significativos impactos emocionais nas mulheres e em seus parceiros. Devido a essas frustrações, mulheres que sofreram PGR apresentam uma prevalência de depressão duas vezes maior que a população geral, além de disfunção sexual (CARVALHO *et al.*, 2016; FRANCISCO *et al.*, 2014; KOLTE *et al.*, 2015b). Com relação a seus parceiros, estes apresentam maior prevalência de ansiedade e depressão, além de insatisfação sexual e disfunção erétil em relação a homens que não vivenciaram PGR com suas parceiras (ZHANG *et al.*, 2016).

Da mesma forma que a definição para essa condição é discordante dependendo da diretriz internacional, as abordagens terapêuticas também são diferentes dependendo das etiologias identificadas (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre as diretrizes da ESHRE e ASRM sobre o tratamento das PGR de acordo com sua etiologia.

Etiologia das PGR		Diretrizes ASRM	Diretrizes ESHRE
Fatores Genéticos		Aconselhamento genético considerando o PGT Aminocentese ou CVS	Diretrizes se limitam às evidências do PGT
Síndrome Antifosfolípide		Baixa dose de aspirina + UFH ou LMWH	Baixa dose de aspirina (75-100mg/dia) antes da concepção + UFH ou LMWH a partir da data do teste positivo para hCG.
Fatores anatômicos		Ressecção histerioscópica do septo é recomendada Evidência de apoio, mas não conclusiva, sobre o tratamento cirúrgico das sinéquias intra-uterinas, miomas uterinos e pólipos uterinos	Efeito da cirurgia com evidência insuficiente
Herança Trobófica			
Fatores Hormonais e Metabólicos	Hipotireoidismo	Levotiroxina	Levotiroxina
	Defeitos no metabolismo da glicose	Metformina	Metformina não é recomendado
	Hiperprolactinemia	Agonista de dopamina (bromocriptina ou cabergolina)	Agonista de dopamina (bromocriptina ou cabergolina)
	Deficiência na fase lútea	Progesterona poderia ser benéfica	Não recomendado progesterona
	Níveis de vitamina D	-	Recomendado suplementação com Vitamina D
Causa infecciosa		Não recomendado o uso de antibióticos	Não recomendado o uso de antibióticos
Fatores Paternos		Antioxidantes não são recomendados	Mudança no estilo de vida Antioxidantes não são recomendados
Fatores Psicológicos		Suporte e acompanhamento	Suporte e acompanhamento psicológico de perto

	psicológico de perto	
Comportamentos insalubres	Parar de fumar Manter peso na faixa adequada Limitar consumo de álcool Limitar o consumo de cafeína	Suplementação profilática de vitamina D Parar de fumar Manter peso na faixa adequada Limitar consumo de álcool Limitar o consumo de cafeína Fazer exercícios regularmente
Abortamento Espontâneo	IV Ig empírica não é recomendada	As seguintes terapias empíricas não são recomendadas:
Inexplicado	Tratamentos imunomodulatórios não são recomendados	- IV Ig - Terapia de imunização linfocitária - Glicocorticoides - Heparina ou baixas doses de aspirina - Progesterona vaginal - G-CSF - “Risco endometrial” (endometrial scratching)

Abreviaturas: PGT: teste genético pré-implantação; hCG: gonadotrofina coriônica humana; CVS: amostragem de vilosidades coriônicas; UFH: heparina não fracionada; LMWH: heparina de baixo peso molecular; IV Ig: imunoglobulina intravenosa; G-CSF: Fator Estimulador de colônias de granulócitos. Adaptado de KHALIFE; GHAZEERI; KUTTEH, 2018.

1.1.2.1. Etiologia das Perdas Gestacionais Recorrentes

Em relação à etiologia, historicamente, as PGR têm sido atribuídos a fatores genéticos, imunológico, anatômicos, infecciosos, ambientais, endócrinos e hematológicos (trombofilicos) (Tabela 3).

Tabela 3: Etiologias conhecidas para PGR.

Etiologia das PGR	
Causas Genéticas	Aneuploidias Somáticas Cromossomos sexuais Distúrbios mendelianos Transtornos multifatoriais Anormalidades nos cromossomos parentais (translocações) Inversões cromossômicas
Causas imunológicas	Causas autoimunes Causas aloimunes
Causas anatômicas	Anormalidade uterina mülleriana Septo uterino (mais comum associada às PGR)

	Hemiútero (útero unicorno)
	Útero Bicornio
	Condição ligada ao dietilestilbestrol
	Efeitos adquiridos (Ex., Síndrome de Asherman)
	Cérvix incompetente
	Leiomas
	Pólipos uterinos
Causas Infeciosas	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Toxoplasma gondii</i>
	Rubéola
	Herpes vírus
	Sarampo
	Citomegalovírus
	Vírus de Coxsackie
Causas ambientais	Fumo
	Consumo excessivo de álcool
	Cafeína
Causas endócrinas	Diabetes mellitus
	Anticorpos antitireoidianos
	Deficiência na fase lútea
Causas Hematológicas	Trombofilias

Adaptado de CHAITHRA; MALINI; KUMAR, 2011.

Mesmo com essa imensa gama de fatores, em aproximadamente 40-50% dos casos a causa ainda permanece sem explicação (Figura 1) (FORD; SCHUST, 2009b; KHALIFE; GHAZEERI; KUTTEH, 2018). A identificação da etiologia para essas perdas é de extrema importância para que se conduza um manejo adequado dessas mulheres quando possível.

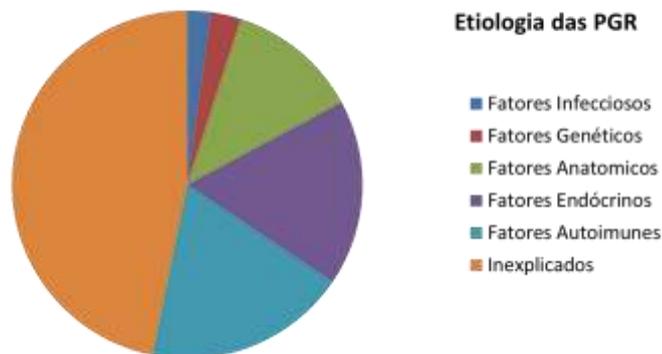


Figura 1: Principais etiologias das perdas recorrentes. Adaptado de FORD; SCHUST, 2009b.

1.2.2.1.1 Etiologia das Perdas Gestacionais Recorrentes: fatores não genéticos

As anormalidades anatômicas são responsáveis por 10-15% dos casos de PRG e geralmente parecem causar perdas gestacionais por interromper a vascularização do endométrio, levando a uma placentação anormal e inadequada. Assim, as anormalidades que podem interromper o suprimento vascular do endométrio são consideradas causas potenciais de PGR. Aqui, são incluídas anomalias uterinas congênitas, aderências intrauterinas e miomas uterinos ou pólipos (FORD; SCHUST, 2009b; LIN, 2004).

Defeito da fase lútea (LPD), síndrome do ovário policístico (SOP), diabetes mellitus, doença da tireoide e hiperprolactinemia estão entre os distúrbios endócrinos envolvidos em aproximadamente 17% a 20% das PGR (FORD; SCHUST, 2009b).

O papel dos agentes infecciosos na perda recorrente é menos claro, com uma incidência estimada de 0,5% a 5%. Os mecanismos propostos para causas infecciosas de perda da gravidez incluem: (1) infecção direta do útero, feto ou placenta, (2) insuficiência placentária, (3) endometrite crônica ou endocervicite, (4) amnionite ou (5) dispositivo intra-uterino (DIU) infectado. Algumas infecções, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, rubéola, herpes vírus, sarampo, citomegalovírus e vírus de Coxsackie, são conhecidas ou suspeitas de terem um papel na perda espontânea esporádica de gravidez. A avaliação e a terapia devem ser adaptadas a casos individuais (CHAITHRA; MALINI; KUMAR, 2011; FORD; SCHUST, 2009b).

Como o embrião/feto não é geneticamente idêntico à mãe, é razoável inferir que há eventos imunológicos que devem ocorrer para permitir que a mãe carregue o embrião/feto durante toda a gestação sem rejeição. Anormalidades nesses mecanismos imunológicos podem levar à perda de gravidez esporádica e recorrente. Terapias como a imunização de leucócitos paternos, imunoglobulina intravenosa, imunização com células do doador de terceiros e infusões de membranas de trofoblasto demonstraram não proporcionar melhora significativa nas taxas de nascidos vivos, e estão disponíveis apenas para uso em estudos aprovados (FORD; SCHUST, 2009a; PORTER; LACOURSIERE; SCOTT, 2006; THELLIN *et al.*, 2000).

Em relação aos fatores ambientais, três exposições particulares - fumo, álcool e cafeína - merecem consideração especial, devido ao seu uso generalizado e sua natureza modificável. Embora o alcoolismo materno (ou o consumo frequente de quantidades intoxicantes de álcool) esteja consistentemente associado a taxas mais altas de perda

espontânea da gravidez, uma conexão com ingestão mais moderada permanece tênue. Outras substâncias, como solventes orgânicos, medicamentos, radiação ionizante e toxinas também podem estar associadas às perdas gestacionais recorrentes (FORD; SCHUST, 2009a).

Por muito tempo a pesquisa centrou-se principalmente nas causas maternas para as PGR. Entretanto, há evidências crescentes que demonstram o impacto dos fatores masculinos nessa condição. Parceiros de mulheres que sofrem de PGR têm uma taxa significativamente maior de fragmentação de DNA espermático em comparação a parceiros de mulheres férteis de grupos controle (MCQUEEN; ZHANG; ROBINS, 2019).

1.2.2.1.2 Fatores Genéticos em Perdas Gestacionais Recorrentes

Dentre as causas genéticas, a aneuploidia fetal é a causa mais importante em casos de abortamento precoce (aquelas que ocorrem antes de dez semanas de gestação). Pelo menos 50-70% das PGR com etiologia genética estão associados a aneuploidias, sendo mais frequentes as trissomias, seguidas da monossomia do cromossomo X e de poliploidias (Tabela 4) (HYDE; SCHUST, 2015; RAI; REGAN, 2006).

Tabela 4: Anomalias cromossômicas em PGR reconhecidas clinicamente no primeiro trimestre.

Característica	Frequência (%)
Normal 46,XX ou 46,XY	54.1
Triploidia	7.7
69,XXX	2.7
69,XYX	0.2
69,XXY	4.0
Outros	0.8
Tetraploidia	2.6
92,XXX	1.5
92,XXYY	0.55
Não especificado	0.55
Monossomia do X	8.6
Anormalidades Estruturais	1.5
Polissomia dos cromossomos sexuais	0.2
47,XXX	0.05
47,XXY	0.15
Monossomia autossômica (G)	0.1
Trissomia autossômica	22.3

1	0
2	1.11
3	0.25
4	0.64
5	0.04
6	0.14
7	0.89
8	0.79
9	0.72
10	0.36
11	0.04
12	0.18
13	1.07
14	0.82
15	1.68
16	7.27
17	0.18
18	1.15
19	0.01
20	0.61
21	2.11
22	2.26
Dupla trissomia	0.7
Mosaico trissômico	1.3
Outras anormalidades ou não especificados	0.9
<hr/>	
Total	100.0

. Adaptado de SIMPSON; CARSON, 2009.

Numerosos distúrbios genéticos únicos também são conhecidos como fatores de risco para as PGR. Porém, mesmo com a extensa gama de estudos já conduzidos em relação a fatores genéticos de susceptibilidade as PGR, ainda há muito a ser explorado sobre fatores que estejam envolvidos na ocorrência dessa condição. Certamente existe um número maior de mutações monogênicas que causam PGR do que as já descritas em humanos. Além disso, há provavelmente numerosas variações genéticas ou polimorfismos que aumentam a probabilidade de perdas gestacionais, predispondo às PGR. Essas podem ser comuns na população e provavelmente não impedem sozinhas as gravidezes normais e, portanto, são de difícil identificação e confirmação. Todavia, em outras condições melhor definidas (por

exemplo, diabetes mellitus tipo 2), os polimorfismos etiológicos podem interagir com outros genes ou fatores ambientais para gerar uma perda gestacional. Felizmente, desenvolvimentos recentes em tecnologia genética molecular facilitaram nossa capacidade de identificar sistematicamente tais genes e polimorfismos (PAGE; SILVER, 2016).

Existem muitos genes candidatos a serem somados a tais fatores, mas ainda há muitos com potencial que carecem de estudos voltados para esse âmbito, incluindo os genes envolvidos com a implantação e o desenvolvimento embrionário, como os membros da família EGF-CFC.

1.2. A família EGF-CFC

Os genes da família EGF-CFC (*epidermal growth factors – Cripto/FRL/Cryptic*) codificam uma classe de proteínas extracelulares, associadas à membrana celular, que desempenham um papel especialmente importante durante ao desenvolvimento embrionário (COLAS & SCHOENWOLF, 2000). A família EGF-CFC inclui *Cripto-1*(*TDGF1*) e *Cryptic* (*CFC1*) em mamífero, *FRL-1* em anfíbios (*Xenopus* sp.) e *oep* em peixes (*Danio* sp.) (Figura 2) (SHEN & SCHIER, 2000).

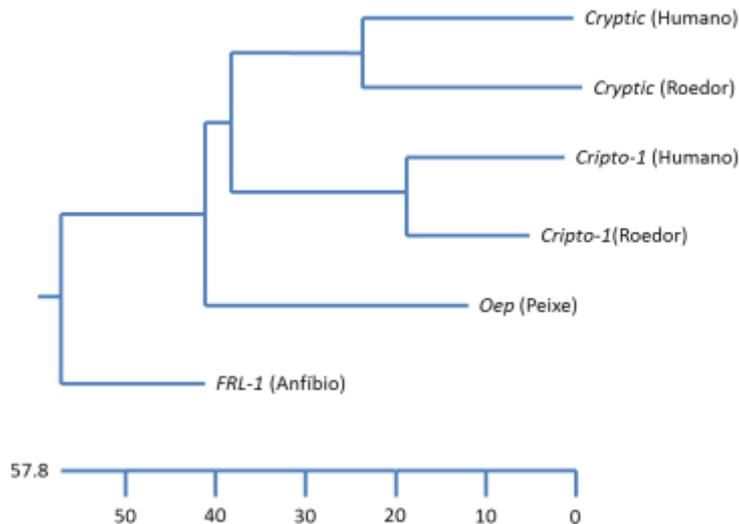


Figura 2: Relações filogenéticas de membros da família EGF-CFC, com escala indicativa do número de eventos de substituição de aminoácidos entre sequências. Adaptado de SHEN & SCHIER, 2000.

Em estudos com modelos animais, as mutações nesses genes levam a anomalias na formação da camada germinativa, na orientação do eixo antero-posterior (A-P) e na especificação do eixo esquerdo-direito (E-D); também existem fortes evidências de uma relação desses genes em processos carcinogênicos (SALOMAN, D. S. *et al.*, 2000).

Todas as proteínas EGF-CFC contêm uma sequência de sinal, um domínio característico semelhante à EGF, uma segunda região rica em cisteína chamada domínio CFC e uma região carboxiterminal hidrofóbica que se prende à membrana por um motivo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MINCHIOTTI *et al.*, 2002a; SHEN, 2003) (Figura 3). Os domínios funcionais das proteínas são conservados entre vertebrados. Por exemplo, entre camundongos e humanos existe mais de 94% de similaridade. No entanto, a similaridade das sequências é reduzida quando se aproximam das regiões amino e carboxiterminal (SHEN & SCHIER, 2000).

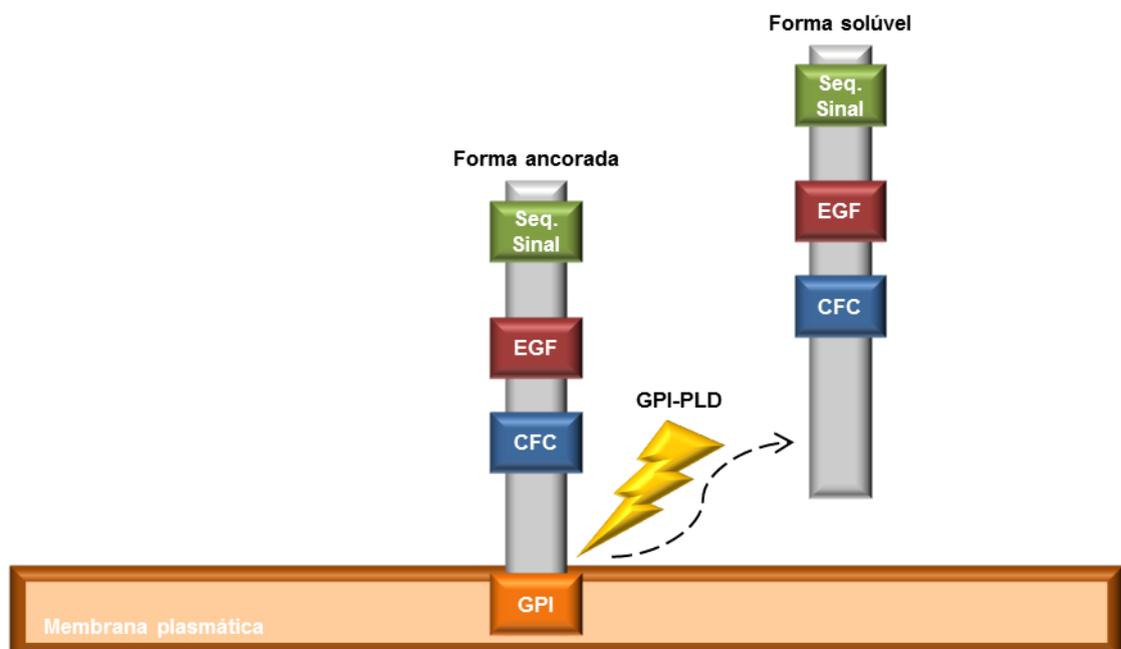


Figura 3: Representação estrutural das proteínas da família EGF-CFC, onde podem ser observadas as suas principais regiões: uma sequência de sinal (em verde), um domínio característico semelhante à EGF (em vermelho), uma segunda região rica em cisteína chamada domínio CFC (em azul) e uma região carboxiterminal hidrofóbica que se prende à membrana por um motivo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (em laranja). O domínio GPI pode ser clivado pela enzima GPI-PLD (glicosilfosfatidilinositol fosfolipase D), liberando as proteínas dessa família na sua forma solúvel no meio extracelular. Adaptado de SALOMAN *et al.*, 2000.

Em humanos, a família EGF-CFC é composta por dois genes: *Cripto-1* (também conhecido como *TDGF1*) e *Cryptic* (também conhecido como *CFC1*). Estudos utilizando modelos animais mostram a função embrionária desses genes na formação dos eixos corporais, de modo que *TDGF1* (*Cripto-1*) é necessário para a formação da camada germinativa e o posicionamento correto do eixo anterior-posterior (A-P), enquanto que *CFC1* (*Cryptic*) é necessário para a determinação do eixo esquerdo-direito (E-D). É provável

que as diferenças na função biológica entre os dois ocorram devido aos seus padrões de expressão distintos (SHEN & SCHIER, 2000).

Estudos também relatam a importância desses genes como moduladores de múltiplas vias, como Nodal, SRC, ERK1/2 e AKT, que estão relacionadas à reprodução e ao desenvolvimento (DE CASTRO *et al.*, 2010; GERSHON *et al.*, 2018).

1.2.1. *CFC1 (Cryptic)*

O gene humano *Cryptic*, também conhecido como *CFC1* (OMIM #605194), é um gene do desenvolvimento localizado na região 2q21.1 do genoma (OMIM, 2015). O maior transcrito desse gene (ENST00000259216.4) contém 6 éxons que codificam uma proteína de 223 resíduos de aminoácidos. Até o momento, existem 1.576 variantes descritas nesse transcrito (ENSEMBL, 2017a) (Figura 4).

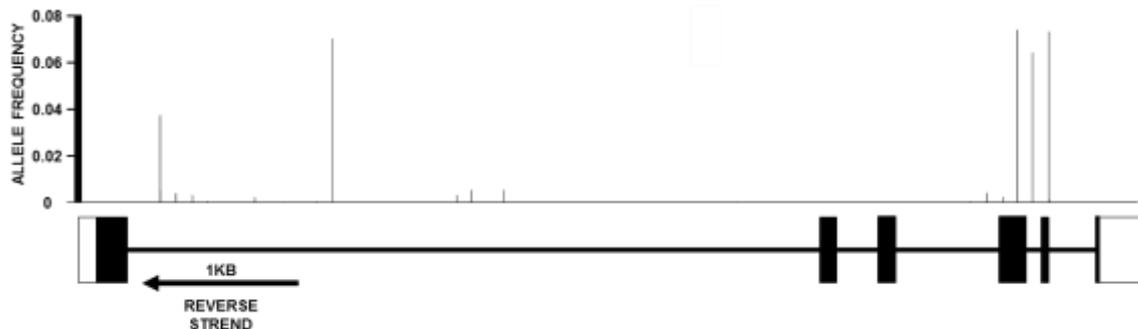


Figura 4: Representação esquemática do gene *Cryptic -1 (CFC1)* com a distribuição de suas variantes. Os polígonos representam as regiões exônicas, sendo os brancos referentes a regiões exônicas regulatórias, mas não codificantes (5' e 3' UTR) e os pretos referentes a regiões exônicas codificantes. As linhas representam as regiões intrônicas. Acima da representação do gene, está a distribuição das suas variantes ao longo do mesmo, com suas respectivas frequências alélicas. Baseado em dados do ENSEMBL, 2017a

CFC1 (Cryptic) é um gene ativo durante o desenvolvimento embrionário. Sendo assim, possui um padrão de expressão restrito espacialmente e temporariamente de acordo com suas funções de sinalização durante a gastrulação. A expressão de *CFC1 (Cryptic)* também pode ser detectada no estágio inicial da dobra do neuroectoderma da linha média, o que faz dele um marcador precoce para a futura placa do tubo neural. A expressão de *CFC1 (Cryptic)* cessa no final da gastrulação, e esta não foi observada em fases embrionárias posteriores ou em tecidos adultos (SHEN; WANG; LEDER, 1997). Estudos em modelos animais mostram a associação do mesmo em quase toda a morfogênese

assimétrica E-D, bem como em alterações morfogênicas cardíacas e em processos carcinogênicos (CHIKARAISHI *et al.*, 2017; SHEN; SCHIER, 2000). Em um estudo com humanos, também já foi relatada a associação desse gene com defeitos cardíacos congênitos (WANG *et al.*, 2011), e a relação de deleções e duplicações de *CFC1* (*Cryptic*) com a Síndrome de Heterotaxia (SH) (CAO *et al.*, 2015). Esses estudos mostram a grande importância desse gene para o estabelecimento do eixo E-D. Esse gene é expresso na mesoderme axial e lateral durante o período embrionário, e também representa um dos primeiros marcadores para o estabelecimento do assoalho da placa neural, que posteriormente dará origem ao tubo neural (SHEN *et al.*, 1997).

Ainda carecem estudos relacionando a função desse gene a problemas reprodutivos, como falhas de implantação e perdas gestacionais.

1.2.2. *TDGF1* (*Cripto-1*)

O gene *Cripto-1* (OMIM #187395) é um gene relacionado ao desenvolvimento que foi isolado pela primeira vez partir de cDNA humano de linhagens celulares de teratocarcinoma (CICCODICOLA *et al.*, 1989). Localizado na posição 3p21.31 (SACCONE *et al.*, 1995) do genoma, esse gene codifica um transcrito (ENST00000542931.6) com 6 éxons, que é traduzido em uma proteína de 172 resíduos de aminoácido, alocados em 5 desses éxons. Até o momento já estão descritas 1.804 variantes para esse transcrito (ENSEMBL, 2017b). Também conhecido como *TDGF1* (*Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1*), foi o primeiro gene descrito da família gênica EGF-CFC (DONO *et al.*, 1991) (Figura 5).

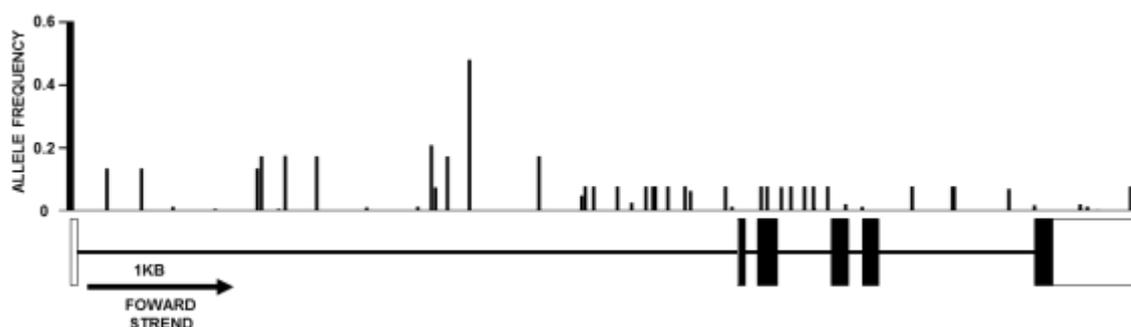


Figura 5: Representação esquemática do gene *Cripto-1* (*TDGF1*) com a distribuição de suas variantes ao longo do mesmo. Os polígonos representam as regiões exônicas, sendo os brancos referentes a regiões exônicas regulatórias, mas não codificantes (5' e 3' UTR), e os pretos referentes a regiões exônicas codificantes. As linhas representam as regiões intrônicas. Acima da representação do gene, está a distribuição das suas variantes ao longo do mesmo, com suas respectivas frequências alélicas. Baseado em dados do ENSEMBL, 2017b.

Inicialmente relacionado à família EGF (*Epidermal Growth-Factors*), o *TDGF1* (*Cripto-1*) tem função essencial na formação e posicionamento correto do eixo antero-posterior do embrião. Nos tecidos adultos, o *TDGF1* (*Cripto-1*) é expresso em baixos níveis em todos os estágios do desenvolvimento da glândula mamária, e sua expressão também aumenta durante a gravidez e a lactação (BIANCO & SALOMON, 2010; DE CASTRO *et al.*, 2010). Porém, em pacientes oncológicos foi relatada a presença de produtos do gene no soro, indicando uma relação com o processo de tumorigênese. (MINCHIOTTI *et al.*, 2002; RUGGIERO *et al.*, 2015).

A sinalização de Cripto-1 (*TDGF1*) em células tumorais modula o crescimento celular, a sobrevivência e a invasão de muitos cânceres humanos. Isto é especialmente relevante para a biologia de células trofoblásticas, em particular, as células trofoblásticas extravilosas (EVTs - *extra villus trophoblasts*), que exibem um baixo índice apoptótico durante os estágios finais da gestação, o que sugere a hipótese de que o Cripto-1 contribui para a invasividade do trofoblasto ou para mecanismos de sobrevivência celular. Uma maior incidência de apoptose já está relacionada a complicações gestacionais como pré-eclâmpsia (BANDEIRA *et al.*, 2014a; BIANCO *et al.*, 2010a; STRASZEWSKI-CHAVEZ; ABRAHAMS; MOR, 2005)

Ao estudar a expressão de seu ortólogo em camundongos, vê-se uma grande importância durante o desenvolvimento embrionário. O seu mRNA está presente no epiblasto (camada de células superior à blastocela secundária) logo após a gastrulação. A primeira expressão do *TDGF1* (*Cripto-1*) se dá tanto nos trofoblastos quanto na massa celular interna do blastocisto. Posteriormente no desenvolvimento, esse gene é expresso em um padrão altamente restrito. Esse padrão restrito de expressão do *TDGF1* (*Cripto-1*) sugere um papel tanto no processo de gastrulação quanto, mais tardiamente, na morfogênese cardíaca (MINCHIOTTI *et al.*, 2002). Após o 10º dia de desenvolvimento do embrião de camundongo, não foram mais detectados sinais de expressão do *TDGF1* (*Cripto-1*) (DONO *et al.*, 1993).

Em estudos experimentais, a ruptura direcionada do gene *TDGF1* (*Cripto-1*) com a produção de mutantes homocigotos resulta em letalidade logo após a gastrulação, sendo que os mutantes não possuem uma linha primitiva, nódulo e mesoderme embrionária (XU *et al.*, 1999).

A placentação anormal é uma das complicações de gravidez mais comuns, e as placentas de acreta aparecem extensivamente entre elas. Um estudo em tecidos de mulheres

com placenta acreta (placenta que se adere anormalmente à decídua ou à parede uterina) encontrou um aumento na expressão de *TDGF1 (Cripto-1)* em relação ao grupo controle, levando a crer que esse gene faz parte do mecanismo que leva ao desenvolvimento placentário anormal, através da modulação da invasão trofoblástica (BANDEIRA *et al.*, 2014b). Também já foi descrita a relação do gene *TDGF1 (Cripto-1)* com os processos de reconhecimento embrio-materno e de implantação embrionária (GERSHON *et al.*, 2018a).

1.2.4. *TDGF1 (Cripto-1)* e reprodução

Cripto-1 (TDGF1) é conhecido como modulador de múltiplas vias relacionadas à reprodução e ao desenvolvimento embrionário, como Nodal, SRC/MAPK/AKT, Notch, Wnt (Figura 6) (BIANCO *et al.*, 2010a).

Os processos de reconhecimento embrio-materno, de implantação embrionária, de placentação, bem como de desenvolvimento embrionário, são processos chave para a manutenção de uma gravidez, e como tais, são processos envolvidos na fisiopatologia das PGR (BAZER *et al.*, 2011; BOYD & REDLINE, 2000; BULLA *et al.*, 1999; JINDAL *et al.*, 2007; PORTER & SCOTT, 2005; TIMEVA *et al.*, 2014). A identificação da relação de *TDGF1 (Cripto-1)* como um fator importante desses processos (BANDEIRA *et al.*, 2014a; GERSHON *et al.*, 2018) nos leva a crer que o estudo do mesmo aumente nossa compreensão dos mecanismos envolvidos nas PGR e pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento desse problema reprodutivo.

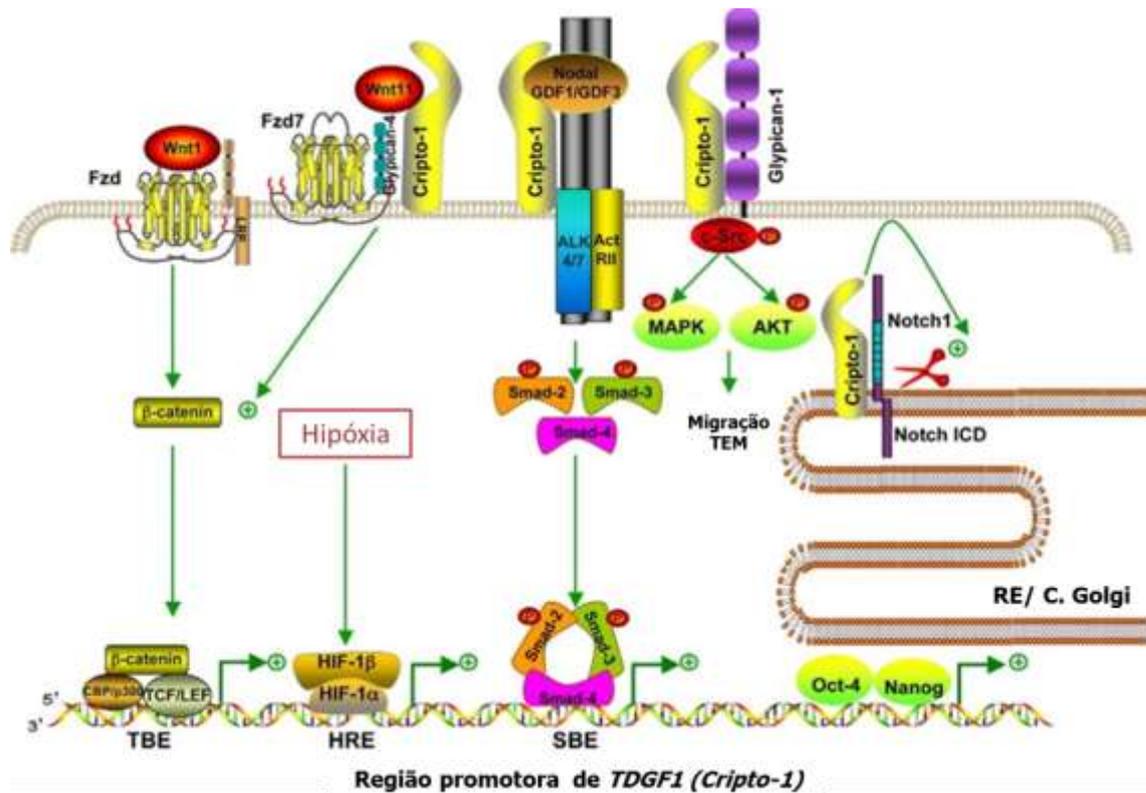


Figura 6: Representação das interações de Cripto-1 (TDGF1) com várias vias celulares que atuam no controle da expressão gênica. TEM: Transição Epitelial-Mesenquimal; RE: Retículo Endoplasmático. Adaptado de BIANCO *et al.*, 2010a.

1.2.5. Interação da família EGF-CFC com Notch

Notch é uma via importante para o desenvolvimento normal e para decisões sobre o destino das células-tronco em diferentes tecidos (BIANCO *et al.*, 2010b; WANG *et al.*, 2009). A ativação de Notch está relacionada à invasão e à diferenciação das EVT, além de existirem evidências de que ele atua na angiogênese placentária. Já foi relatado que Cripto-1 (*TDGF1*) atua como um ativador da via de Notch devido à facilitação da maturação do receptor Notch (PEREIRA *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2009).

1.2.6. Interação da família EGF-CFC com c-Src/MAPK/PI3K/AKT

O Cripto-1 (*TDGF1*) também pode funcionar como um ligante para o Glipicano-1. A ligação do Cripto-1 ao Glipicano-1 ativa as vias de sinalização c-Src/MAPK/PI3K/AKT, que regulam a proliferação, a motilidade e a sobrevivência celular. Glipicano-1 e c-Src são requeridos por Cripto-1 (*TDGF1*) para induzir a fosforilação de MAPK e AKT (NAGAOKA *et al.*, 2012). A via c-Src demonstrou regular a formação da placenta e a decidualização do

endométrio (CHEN *et al.*, 2010; GEHIN *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 2007). Além disso, tanto MAPK quanto PI3K/AKT desempenham papéis importantes no transporte de glicose e na regulação da sobrevivência do blastocisto (KIM & MOLEY, 2009; RILEY *et al.*, 2006), na migração de células endometriais (GENTILINI *et al.*, 2007), na invasão precoce de células trofoblásticas na gestação (LI *et al.*, 2015), indução de metaloproteinase-2 e expressão de *VEGF* em células de trofoblasto humano (FURMENTO *et al.*, 2014).

A atividade quinase de c-Src é essencial para que Cripto-1 (*TDGFI*) possa induzir a diferenciação e acentuação da migração de células epiteliais em mamíferos. As vias MAPK e AKT também podem inibir a atividade da GSK-3b levando à estabilização de β -catenina e de Snail, que podem aumentar a proliferação e a transição epitelial para o mesênquima através da via de sinalização canônica Wnt/ β -catenina (NAGAOKA *et al.*, 2012).

1.2.7. Interação da família EGF-CFC e Wnt/ β -Catenina

Cripto-1 (*TDGFI*) também se liga ao complexo Glipicano-4-Fzd7, agindo como um correceptor que modula a interação de Wnt. A via de sinalização Wnt controla múltiplos aspectos do desenvolvimento, incluindo proliferação celular, especificação do destino, polaridade e migração. Os sinais Wnt são transduzidos em pelo menos duas maneiras distintas: uma via canônica bem estabelecida ou Wnt/ β -catenina, e uma via ou vias independentes da β -catenina não canônica. A interação de Cripto-1 (*TDGFI*) como correceptor induz a ativação de β -catenina, um mediador intracelular da sinalização, que é fosforilado e estabilizado devido à ativação pelo ligante Wnt. Posteriormente, a β -catenina é transportada para o núcleo, onde age regulando a expressão gênica junto com um complexo cotranscricional (BIANCO *et al.*, 2010b; EISENMANN, 2005; KAWANO; KYPTA, 2003). Já existem estudos que correlacionam diretamente variações genéticas nos níveis de expressão dos genes dessa via de sinalização com as PGR (BELLATI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2015).

1.2.8. Interação da família EGF-CFC e TGF- β

Os membros desta família são fatores de crescimento expressos dinamicamente no endométrio humano, e suas ações estão relacionadas à proliferação celular, à decidualização, à apoptose e à remodelação dos tecidos após a menstruação. Estes mecanismos são

fundamentais para o ciclo reprodutivo humano e para o estabelecimento da gravidez (CRUZ *et al.*, 2015).

Em relação às citocinas da via TGF- β , Cripto-1 (*TDGF1*) é fundamental para a via Nodal, onde modula a interação do mesmo com os receptores ALK4 (ActRIB - Activin receptor type-1B), sendo imprescindível para essa ligação (CRUZ *et al.*, 2015). Em relação a outras citocinas da superfamília TGF- β como BPM, ativinas e TGF- β propriamente dito, Cripto-1 (*TDGF1*) atua como um antagonista de sua sinalização (GRAY *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2005; KENNEY; ADKINS; SANICOLA, 2004; NAGAOKA *et al.*, 2012). Alguns estudos apontam que variantes genéticas e alterações nos níveis das citocinas da família TGF- β estão relacionados com as PGR (MAGDOUD *et al.*, 2013; MAZDAPOUR; DEGHANI ASHKEZARI; SEIFATI, 2018; PRAKASH *et al.*, 2005), (OGASAWARA *et al.*, 2000), (CHOI *et al.*, 2003).

Diferentemente de outros membros da família TGF- β , Nodal, GDF-1 e GDF-3 requerem co-receptores da família de proteínas EGF-CFC para montar seu complexo receptor de sinalização (HARRISON *et al.*, 2005; NAGAOKA *et al.*, 2012). As proteínas da família EGF-CFC permitem que essas citocinas interajam com ALK4. O complexo de receptor Cripto-1/Nodal ou GDF/ALK4/ActRII desencadeia ativação e fosforilação de Smad2 e Smad3. Smad2 fosforilado e Smad3 formam um complexo com Smad4 e se translocam para o núcleo. Lá, o complexo Smad2/3/4 interage com as proteínas de ligação CREB (cAMP response element-binding protein) e ativa a transcrição de genes alvo específicos (DE CASTRO *et al.*, 2010; NAGAOKA *et al.*, 2012). Um estudo recente já demonstrou que a proteína CREB5 tem papel crucial na patogênese das perdas gestacionais recorrentes (YU *et al.*, 2018).

A sinalização através de ALK4 via Nodal (Figura 6), tanto no trofoblasto fetal quanto na decídua materna, regula a diferenciação e a proliferação dos trofoblastos e a formação da interface materno-fetal. Defeitos nessa interface na placenta podem contribuir para a pré-eclâmpsia e para a restrição do crescimento intrauterino, além de aumentarem o risco de morte neonatal e de perdas gestacionais (PENG *et al.*, 2015).

Na via Nodal, a fosforilação de Smad2/3 regula a expressão de vários genes alvo dessa via. Smad2 foi detectado no endométrio de ratos e camundongos ao longo do ciclo estral, bem como no momento da peri-implantação, e já foi fortemente implicado na embriogênese (LIN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004). Ademais se sabe que a deficiência de Smad3 materna compromete a decidualização em camundongos (ZHAO *et al.*, 2012). De

maneira geral, o efeito da família EGF-CFC nas vias da superfamília TGF- β , além de modular a expressão de alguns membros da mesma, é possibilitar ou inibir a fosforilação das proteínas Smad que são as reais efetoras da sinalização dos TGF- β .

1.2.4.1. Smads

Smads pertencem a uma classe de proteínas que funcionam como efetores de sinalização intracelular da superfamília TGF- β (DERYNCK; ZHANG; FENG, 1998). Após a ligação de um ligante TGF-beta, os receptores do tipo II fosforilam e ativam o domínio citoplasmático dos receptores do tipo I, que por sua vez, fosforilam as proteínas Smads, as quais funcionam como transdutoras de sinal, transmitindo sinais do meio extracelular até o núcleo, onde regulam a transcrição de genes selecionados em resposta ao ligante (Figura 7) (DERYNCK; ZHANG; FENG, 1998; HARRISON *et al.*, 2005).

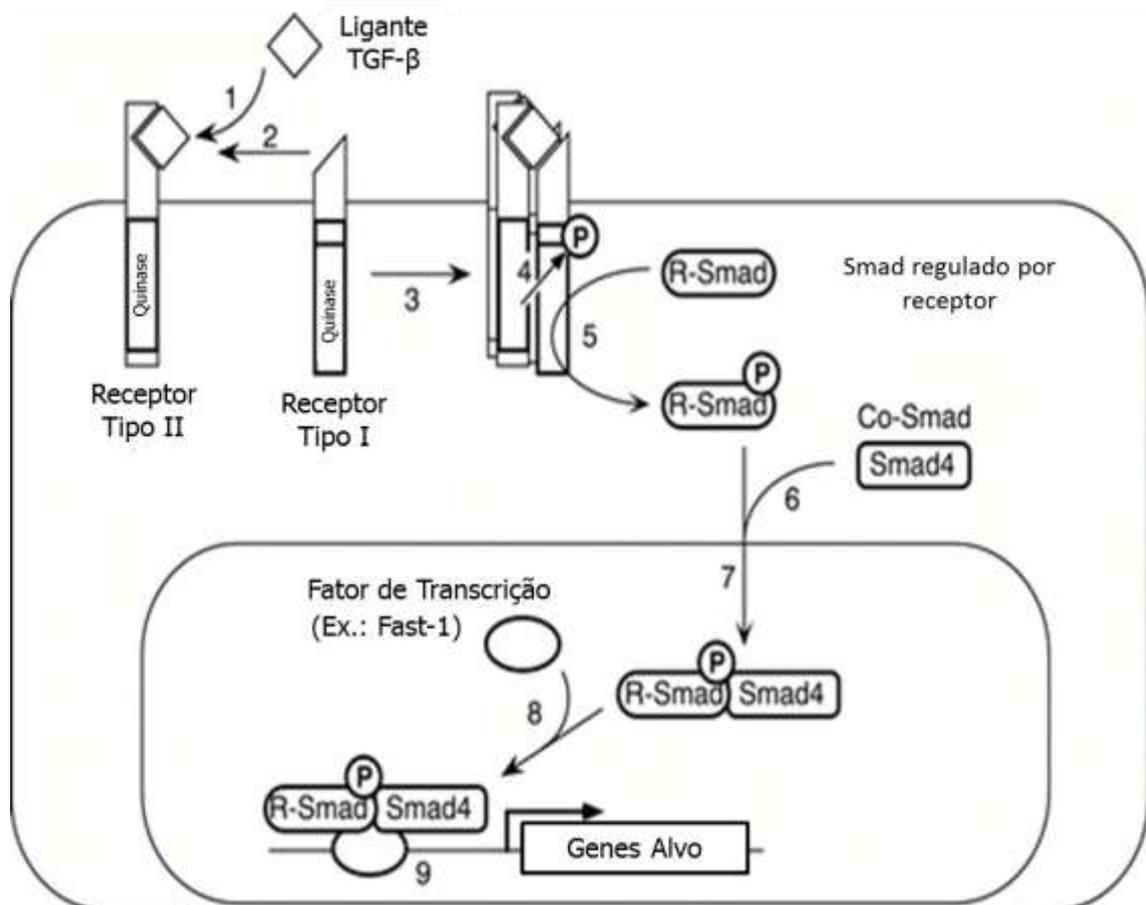


Figura 7: Representação do mecanismo de ação das proteínas de Smad, transduzindo o sinal de ligante até o núcleo, onde ativam ou reprimem a expressão gênica. Adaptado de MASSAGUÉ, 1998.

Suas sequências alinhadas mostram dois grandes domínios conservados, o domínio MH1 ou N, e o domínio MH2 ou C, separados por um segmento de ligante (L) menos

conservado (DERYNCK; ZHANG; FENG, 1998). O domínio MH1 contém um *hairpin* com capacidade de ligação ao DNA. O domínio MH2 possui uma série de partes superficiais hidrofóbicas que realizam interações versáteis com proteínas adaptadoras citoplasmáticas, receptores TGF- β ativados, vários cofatores de ligação ao DNA, co-ativadores e correpressores (Figura 8) (MASSAGUÉ, 2012; SHI; MASSAGUÉ, 2003).

A família Smad em humanos inclui oito membros, cinco dos quais (Smads 1, 2, 3, 5 e 8), chamados R-Smads, contêm o motivo Ser-X-Ser C-terminal para fosforilação pelos receptores do tipo I. A especificidade da sinalização é determinada pela escolha dos receptores tipo I e tipo II a quem cada membro da família TGF- β em particular pode ligar e dirigir para um complexo. Com algumas exceções notáveis, os receptores para TGF- β , Nodal, ativina e miostatina (o ramo TGF- β da família) sinalizam através de Smad2 e Smad3, enquanto as BMP e o hormônio anti-Mülleriano (o ramo BMP) sinaliza através de Smad1,-5 e -8 (MACIAS; MARTIN-MALPARTIDA; MASSAGUÉ, 2015; MASSAGUÉ, 1998; PARDALI; GOUMANS; TEN DIJKE, 2010; WU *et al.*, 2001).

A sinalização de TGF-beta é iniciada pela ligação de uma citocina a um par de receptores transmembrânicos específicos, causando a fosforilação da região GS nos domínios citoplasmáticos de Serina/Treonina quinase (Massague e Chen 2000, Wrana *et al.* 1994). Então, a quinase ativada recruta um R-Smad específico e fosforila seu motivo SSXS C-terminal. O motivo pSer desencadeia a formação de um complexo heteromérico entre o R-Smad e Smad4, que então se transloca para o núcleo e regula a expressão de genes responsivos a ligantes (MASSAGUÉ, 1998)

O Smad4 é, portanto, chamado de Co-Smad, e seu papel é o de recrutar co-reguladores transcricionais específicos para o complexo de transcrição Smad. Os dois membros restantes da família, Smad6 e Smad7, são Smads inibitórios (I-Smads) que interagem com receptores ativados e R-Smads para suprimir sua atividade. A expressão de Smad7 é induzida por TGF- β e BMP como uma alça de retroalimentação negativa que é conservada em todos os tipos de células e espécies de metazoários. Além disso, os I-Smads respondem a vias que se opõem à sinalização de TGF- β . (MACIAS; MARTIN-MALPARTIDA; MASSAGUÉ, 2015; MASSAGUÉ, 1998; PARDALI; GOUMANS; TEN DIJKE, 2010; WU *et al.*, 2001).

1.2.4.2. SMAD3

O gene humano *SMAD3* tem 129.339 pares de bases e está localizado no cromossomo 15, *locus* 15q22.3. O maior transcrito desse gene (ENST00000327367.9) apresenta 29.494

variantes descritas e codifica uma proteína de 425 resíduos de aminoácidos, com seus códons distribuídos ao longo dos seus 9 éxons (ENSEMBL, 2019) (Figura 8).

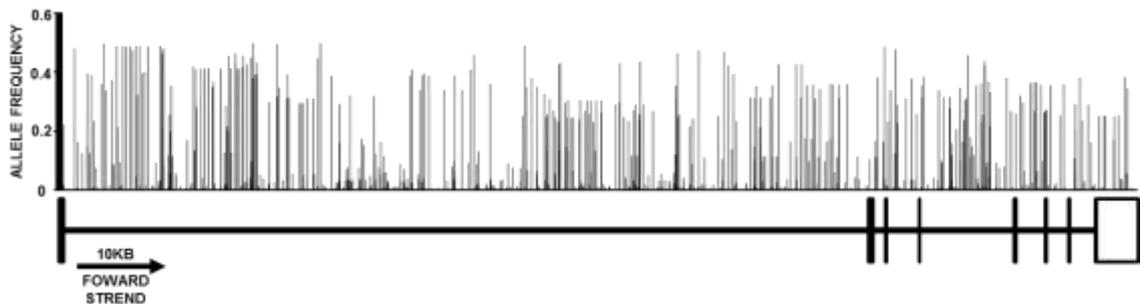


Figura 8: Representação esquemática do gene *SMAD3* com a distribuição de suas variantes ao longo do mesmo. Os polígonos representam as regiões exônicas, sendo os brancos referentes a regiões exônicas regulatórias, mas não codificantes (5' e 3' UTR), e os pretos referentes a regiões exônicas codificantes. As linhas representam as regiões intrônicas. Acima da representação do gene, está a distribuição das suas variantes ao longo do mesmo, com suas respectivas frequências alélicas.

O complexo Smad3/4 interage em resposta ao TGF- β com sequências responsivas nos promotores dos genes *PAI-1*, *JunB* ou *Colagenase 1* e *MMP1*. Nesses promotores, os Smad interagem diretamente com sequências de DNA definidas, induzindo a expressão desses genes. Esses três genes aos quais Smad3 interage diretamente já foram relatados como tendo variações na sua sequência ou níveis de expressão em mulheres que sofreram PGR (PEREZA *et al.*, 2012).

Um estudo em modelos animais mostrou que *SMAD3* é altamente expresso na zona decídua durante o período peri-implantacional e que animais nocaute para *SMAD3* apresentaram comprometimento da decidualização. Esse estudo nos mostra a importância de *SMAD3* no processo de decidualização (ZHAO *et al.*, 2012), processo esse que, se prejudicado, representa um mecanismo subjacente importante nas PGR (SALKER *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 2
Justificativa e Objetivos

Mesmo com a intensa busca por explicações que ajudem no entendimento da etiologia das PGR através de estudos com mulheres com este problema, atualmente, consegue-se explicar a causa de apenas metade dos casos, podendo-se considerar as PGR como um grave problema reprodutivo. Assim torna-se relevante a identificação de outros fatores que possam expandir nosso conhecimento sobre as PGR para tentar explicar sua causa, e a partir desse conhecimento possam ser desenvolvidos melhores protocolos para manejar esses casos.

A literatura tem trazido genes e vias de sinalização possivelmente envolvidos com processos reprodutivos. Entretanto existem muitos outros genes potencialmente implicados que carecem estudos voltados para esse âmbito. A maioria dos estudos utiliza como abordagem a análise de genes isolados relacionados a processos específicos da reprodução, avaliando, assim, condições isoladas das falhas reprodutivas. Portanto, há a necessidade de pesquisas com abordagens múltiplas que possam, com maior aprofundamento, consolidar as rotas gênicas alteradas em falhas reprodutivas.

Poucos estudos avaliam a participação dos mesmos genes em diferentes eventos adversos da gestação, sendo necessária uma abordagem mais integrada na busca de genes nas PGR. Um estudo integrativo, utilizando abordagens aliando ferramentas de bioinformática, literatura e técnicas de genética molecular poderá nos apontar fatores genéticos possivelmente envolvidos nas falhas reprodutivas, levando ao conhecimento mais profundo das bases genéticas dessa falha reprodutiva.

Neste contexto, faz-se relevante o estudo dos genes família EGF-CFC e suas vias de sinalização como possíveis fatores de susceptibilidade para as PGR, visto seu envolvimento em diferentes processos chave para a reprodução, como o desenvolvimento embrionário, a implantação, a placentação e o reconhecimento embrio-materno. Sendo assim, a elucidação dos mecanismos genéticos envolvidos nas PGR contribuirá para o melhor entendimento da função desses genes na reprodução humana e pode contribuir também para o diagnóstico e prognóstico desses casos, além de beneficiar o aconselhamento genético. Ao estabelecer genes de suscetibilidade para as falhas reprodutivas pode-se conduzir um melhor manejo aos pacientes, através de possíveis testes diagnósticos e intervenções terapêuticas visando genes alvo.

A partir do estudo proposto, será possível avançar no conhecimento sobre potenciais biomarcadores envolvidos nas PGR. Isso pode representar uma importante ferramenta para a prática clínica, uma vez que facilitaria o diagnóstico da causa da falha reprodutiva e o prognóstico do casal, reduzindo, assim, custos e sofrimentos envolvidos na

busca pela concepção, além de contribuir para o aconselhamento genético e a conduta médica de casais com dificuldade reprodutiva. A partir disso, com uma medicina personalizada, o manejo de cada paciente poderia ser mais preciso e eficiente e seria possível até mesmo melhorar as taxas de sucesso nos processos de reprodução assistida.

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel dos genes da família EGF-CFC e em suas vias de modulação na suscetibilidade às perdas gestacionais recorrentes.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a participação dos genes da família EGF-CFC e em suas vias de modulação na reprodução e nas perdas gestacionais recorrentes através de abordagens de biologia de sistemas.
- b) Avaliar a expressão dos genes da família gênica EGF-CFC em tecidos reprodutivos, com base em dados armazenados no banco *Gene Omnibus Expression* (GEO).
- c) Avaliar, *in silico*, as variantes já descritas em bancos de dados dos genes da família EGF-CFC, conduzindo predições funcionais nos genes e em seus produtos finais.
- d) Selecionar variantes dos genes da família EGF-CFC, a partir de predição funcional, que tenham possível impacto na susceptibilidade nas perdas gestacionais recorrentes.
- e) Analisar e comparar a frequência de variantes selecionadas nos genes da família EGF-CFC e em suas vias de modulação entre uma amostra de mulheres com duas ou mais perdas gestacionais e mulheres com pelo menos dois filhos e sem história prévia de abortos ou infertilidade.

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 Secundárias

O número de gestações e a idade no período de avaliação são maiores 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 ($P=0.04$). 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 PGR primárias e secundárias.

Característica	PGR-P	PGR-S	P
Frequência [N (%)]	115 (77.2)	34 (22.8)	-
Idade no Período de Avaliação [média (DP)]	32.63 (7.0)	35.8 (8.6)	0.040 ^{MW}
Idade na Primeira Gestação [média (DP)]	24.4 (7.7)	22 (6.8)	0.233
Gestações [média (DP)]	3.4 (1.7)	4.4 (1.4)	<0.001 ^{MW}
Fumo [N (%)]	17 (14.8)	6 (17.6)	0.787 ^{X2}
Consumo de Álcool [N (%)]	49 (42.6)	11 (32.4)	0.324 ^{X2}
Consanguinidade [N (%)]	3 (2.6)	1 (2.9)	1 ^{X2}
Ancestralidade Africana [N (%)]	18 (15.7)	3 (8.8)	0.408 ^{X2}
História Familiar de Malformações [N (%)]	20 (22.7)	9 (26.5)	0.813 ^{X2}
Doença Crônica [N (%)]	30 (34.1)	13 (38.2)	0.678 ^{X2}
Perdas Gestacionais [média (DP)]	3,35 (1,7)	2,9 (1,1)	0.161 ^{MW}
Perdas Gestacionais			
Duas Perdas [N (%)]	41 (35.7)	13 (3.2)	-
Três Perdas [N (%)]	36 (31.3)	16 (47.1)	-
Acima de Três Perdas [N (%)]	38 (33.0)	5 (14.7)	0.084 ^{X2}
Índice de Massa Corporal [média (DP)]	26,1 (4.2)	26,6 (4,7)	0.549 ^{MW}
Dificuldade de Engravidar [N (%)]	31 (27.4)	14 (41.2)	0.141 ^{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 genotípicas de *TDGF1* e *CFC1* e na frequência alélica de *SMAD3* entre esses subgrupos, entretanto houve uma diferença na frequência genotípica de *SMAD3* (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da família EGF-CFC e do gene *SMAD3* entre mulheres com PGR primárias e com PGR secundárias.

Gene	Genótipo/Alelo do SNP	PGR-P n (%)	PGR-S N (%)	<i>P</i> [#]
<i>CFC1</i> (rs20131919)	CC	103 (89.6)	30 (88.2)	1
	CT	12 (10.4)	4 (11.8)	
	TT	0 (0)	0 (0)	
	C	218 (94.8)	64 (94.1)	
	T	12 (5.2)	4 (5.9)	
<i>TDGF1</i> (rs3806702)	TT	75 (65.2)	22 (64.7)	0.831
	TC	31 (27.0)	9 (26.5)	
	CC	9 (7.8)	3 (8.8)	
	T	181 (78.6)	53 (77.9)	
	C	49 (22.4)	15 (22.1)	
<i>SMAD3</i> (rs17293443)	TT	89 (77.4)	20 (58.8)	0.894
	TC	22 (19.1)	14 (41.2)	
	CC	4 (3.5)	0 (0)	
	T	200 (87.0)	54 (79.4)	
	C	30 (13.0)	14 (20.6)	

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, o número de gestações e o índice de massa corporal estão aumentados no subgrupo de mulheres com três ou mais perdas em relação ao subgrupo de mulheres com duas perdas. Entretanto, o subgrupo de mulheres com três ou mais perdas apresentou uma menor dificuldade de engravidar em relação ao subgrupo de mulheres com duas perdas (Tabela 3). 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
Frequência [N (%)]	54 (36.2)	95 (63.8)	-
Idade no Período de Avaliação [média (DP)]	31 (6.8)	34.7 (7.5)	0.004 ^{MW}
Idade na Primeira Gestação [média (DP)]	24.4 (7.1)	23.4 (7.8)	0.559 ^{MW}
Gestações [média (DP)]	2.4 (0,8)	4.35 (1.7)	<0.001 ^{MW}
Fumo [N (%)]	9 (16.7)	14 (14.7)	0.815 ^{X2}
Consumo de Álcool [N (%)]	28 (51.9)	32 (33.7)	0.037 ^{X2}
Consanguinidade [N (%)]	1 (1.9)	3 (3.2)	1 ^{X2}
Ancestralidade Africana [N(%)]	11 (20.4)	10 (10.5)	0.140
História Familiar de Malformações [N (%)]	11 (25)	18 (23.1)	0.827 ^{X2}
Doença Crônica [N (%)]	15 (34.1)	28 (35.9)	0.847 ^{X2}
Índice de Massa Corporal [média (DP)]	25.1 (3.9)	26.9 (4.4)	0.019 ^{MW}
Dificuldade de Engravidar [N (%)]	21 (38.9)	24 (25.8)	<0.001 ^{X2}

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

Ao se avaliar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs estudados não se encontrou diferenças significativas entre o subgrupo de mulheres com duas perdas e o subgrupo de mulheres com três ou mais perdas (tabela 4)

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

Gene	Genótipo/Alelo do SNP	Duas Perdas n (%)	Três Perdas ou Mais N (%)	P[#]
<i>CFC1</i> (rs20131919)	CC	49 (80.7)	84 (88.4)	0.787
	CT	5 (9.3)	11 (11.6)	
	TT	0 (0)	0 (0)	
	C	103 (95.4)	179 (88.4)	0.669
	T	5 (4.6)	11 (11.6)	
<i>TDGF1</i> (rs3806702)	TT	32 (59.3)	65 (64.7)	0.464
	TC	16 (29.6)	24 (26.5)	
	CC	6 (11.1)	6 (6,3)	
	T	80 (74.1)	154 (81.1)	
	C	28 (25.9)	36 (18.9)	
<i>SMAD3</i> (rs17293443)	TT	38 (70.4)	71 (74.7)	0,732
	TC	14 (25.9)	22 (23.2)	
	CC	2 (3.7)	2 (2.1)	
	T	90 (83.3)	164 (86.3)	
	C	18 (16.6)	26 (13.7)	

Teste de Qui-Quadrado.

CAPÍTULO 6
Discussão

As PGR são um das mais recorrentes falhas reprodutivas, atingindo de 1-5% dos casais, e por mais que muitas causas já tenham sido identificadas, em 40-50% dos casos a etiologia permanece desconhecida. Nesse estudo exploramos possíveis etiologias genéticas desses 40-50% de casos sem diagnóstico definido. Concentramos-nos em avaliar por múltiplas abordagens o papel dos genes da família EGF-CFC nas PGR.

As ferramentas de bioinformática proporcionaram um salto no planejamento, análise e compreensão dos dados de biologia molecular. No entendimento dos mecanismos genéticos por trás de distúrbios, a biologia de sistemas e a biologia molecular podem responder à mesma pergunta de maneiras bem diferentes, mas complementares. Assim, um entendimento mais completo é alcançado quando as duas abordagens são unificadas (STEVENS, 2004).

Nossas análises de expressão realizadas com dados secundários depositados em bancos de dados mostraram uma diminuição na expressão dos genes da família EGF-CFC nas perdas gestacionais recorrentes (*TDGF1* em endométrio e *CFC1* em placenta), nos mostrando uma possível influência dessa família genica com essa condição. Somando nossos dados de expressão com nossas análises de redes e ontologias, juntamente com uma revisão da literatura podemos estabelecer possíveis vias de influência da família EGF-CFC nas PGR. Dentre essas vias nossas análises moleculares confirmaram a associação de variantes em *SMAD3*, da via TGF- β com as PGR.

As análises de redes e ontologias mostram forte relação da família EGF-CFC com a via de sinalização da superfamília TGF- β . Os membros dessa superfamília são fatores de crescimento expressos dinamicamente no endométrio humano, e suas ações estão relacionadas à proliferação celular, decidualização, apoptose e remodelação dos tecidos após a menstruação. Estes mecanismos são fundamentais para o ciclo reprodutivo humano e para o estabelecimento da gravidez (CRUZ *et al.*, 2015). Os dados de expressão de *TDGF1* e *CFC1* mostram padrões alterados justamente em endométrio e placenta, respectivamente; sabendo da interação entre essas duas famílias genicas, a alteração nos níveis de expressão de *TDGF1* e *CFC1* nesses tecidos poderiam interferir diretamente nesses processos reprodutivos.

Em relação às citocinas da via TGF- β , Cripto-1 (*TDGF1*) é fundamental para via Nodal onde modula a interação do mesmo com os receptores ALK4 (ActRIB - Activin receptor type-1B), sendo imprescindível para essa ligação (CRUZ *et al.*, 2015). Em relação a outras citocinas da superfamília TGF- β como ativinas, BMP-4 e TGF- β propriamente dito, Cripto-1 (*TDGF1*) atua como um antagonista de sua sinalização (GRAY *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2005; KENNEY; ADKINS; SANICOLA, 2004; NAGAOKA *et al.*, 2012).

Alguns estudos já apontam que variantes genéticas e alterações nos níveis das citocinas da família TGF- β estão relacionados com as PGR (MAGDOUD *et al.*, 2013; MAZDAPOUR; DEGHANI ASHKEZARI; SEIFATI, 2018; PRAKASH *et al.*, 2005). Em um estudo de Ogasawara *et al.* viu-se que em mulheres com PGR havia um aumento nos níveis de TGF- β 1 (OGASAWARA *et al.*, 2000). Sabe-se que TGF- β 1 é expresso na interface materno-fetal e inibe a proliferação e invasão trofoblástica (BAGHERI; CHIANEH; RAO, 2013; GIUDICE; SALEH, 1995). Esse dado corrobora com nossos resultados da análise de expressão, nos dando possíveis indícios de como os genes da família EGF-CFC podem estar envolvidos nas PGR, visto que seus níveis de expressão diminuídos em endométrio e placenta (interface materno-fetal), podem levar a uma potencialização da ação de TGF- β 1, que eles atuam como antagonistas do mesmo, e por consequência uma interferência negativa na invasão e diferenciação trofoblástica. Sabemos que essa relação pode não ser direta, mas pode ser um dos possíveis mecanismos por de trás dessa associação.

Diferentemente de outros membros da família TGF- β , Nodal, GDF-1 e GDF-3 requerem co-receptores da família de proteínas EGF-CFC para montar seu complexo receptor de sinalização (HARRISON *et al.*, 2005; NAGAOKA *et al.*, 2012). As proteínas da família EGF-CFC permitem que essas citocinas interajam com ALK4. O complexo de receptor Cripto-1/Nodal ou GDF/ALK4/ActRII desencadeia ativação e fosforilação de Smad2 e Smad3. Smad2 fosforilado e Smad3 formam um complexo com Smad4 e transcolam-se para o núcleo. No núcleo, o complexo Smad2/3/4 interage com a proteínas de ligação CREB (cAMP response element-binding protein) e ativa a transcrição de genes alvo específicos (DE CASTRO *et al.*, 2010; NAGAOKA *et al.*, 2012). Um estudo recente já demonstrou que a proteína CREB5 tem papel crucial na patogênese das perdas gestacionais recorrentes (YU *et al.*, 2018).

Trabalhos prévios indicam a associação de *SMAD3* com processos chaves na patogênese das PGR. Um estudo com ratos mostrou que *SMAD3* está altamente expresso na decídua materna durante o período peri-implantacional e que as diminuições de sua expressão estão associados comprometimento desse processo nesse processo chave para a gestação (ZHAO *et al.*, 2012). Outro estudo também mostrou que alterações nos níveis de *SMAD3* também já foram relacionados a alterações na adesão intrauterina (AIU) (NING; ZHANG; YANG, 2018).

Na via Nodal, Smad2 também foi fortemente implicado na embriogênese e foi detectado no endométrio de ratos e camundongos ao longo do ciclo estral, bem como no momento da peri-implantação (LIN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004).

A sinalização através de ALK4 via Nodal, tanto no trofoblasto fetal quanto na decídua materna, regula a diferenciação e a proliferação dos trofoblastos e a formação da interface materno-fetal. Defeitos nessa interface materno-fetal na placenta podem contribuir para a pré-eclâmpsia e para a restrição do crescimento intrauterino, aumentam o risco de morte neonatal e de abortamento espontâneo (PENG *et al.*, 2015). Alguma alteração na via Nodal de sinalização poderia ser um possível mecanismo molecular que a família EGF-CFC poderia atuar como um fator de risco para as PRG.

Cripto-1 também atua como modulador de outras vias de sinalização que se relacionam a reprodução e desenvolvimento embrionário, devido a sua capacidade de se ligar com a proteína Glypican. Ao se ligar a Glypican-1 cripto-1 ativa vias como SRC (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src)/ MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)/AKT (PKB - Protein kinase B) (BIANCO; SALOMON, 2010). Estudos já demonstraram que o nocaute de *TDGF1* reduz a forma ativa de moléculas sinalização de cada uma dessa via (DE CASTRO *et al.*, 2010; GERSHON *et al.*, 2018). As vias de sinalização de c-SRC demonstrou regular a formação da placenta e a decidualização do endométrio (CHEN; LIU; XU, 2010; GEHIN *et al.*, 2002; MUKHERJEE *et al.*, 2007). Tanto o MAPK quanto o PI3K/AKT desempenham papéis importantes no transporte de glicose e na regulação da sobrevivência do blastocisto (KIM; MOLEY, 2009; RILEY *et al.*, 2006), migração de células endometriais (GENTILINI *et al.*, 2007), invasão de células trofoblastos em gravidez precoce humana (LI *et al.*, 2015), nos processos apoptóticos (ALLAN *et al.*, 2003; SUMMY; GALLICK, 2006) e indução de MMP2 e expressão de VEGF em células de trofoblasto humano (FURMENTO *et al.*, 2014).

Nossas análises de ontologias também mostram uma relação entre Cripto-1 (TDGF1) com o FGF. Já foi demonstrado que Cripto-1 (TDGF1) aumenta os níveis de expressão do *VEGF* e *FGF*, ambos os genes são cruciais no processo de angiogenese agindo no núcleo em um complexo que controla a expressão gênica (YUN *et al.*, 2018). Baixos níveis das proteínas VEGF, FGF e MMP2 nas vilosidades coriônicas já foram relatadas em mulheres com PGR (CHOI *et al.*, 2003). Esses dados corroboram com nossos achados de expressão, pois a baixa expressão de *TDGF1* (Cripto-1) poderia ocasionar numa diminuição dos níveis que expressão de *VEGF* e *FGF*. Esse poderia se caracterizar como um terceiro possível mecanismo em que os genes da família EGF-CFC se interferirem as PGR.

Cripto-1(TDGF1) também ao se liga ao complexo a Glypican4/Fzd7 agindo como um correceptor modulando a interação de Wnt. A via de sinalização Wnt controla múltiplos aspectos do desenvolvimento, incluindo proliferação celular, especificação do destino,

polaridade e migração. Os sinais Wnt são traduzidos em pelo menos duas maneiras distintas: uma via canônica bem estabelecida ou Wnt/ β -catenina, e uma via ou vias independentes da β -catenina não canônica. A interação de Cripto-1(TDGF1) como co-receptor modela induz a ativação da β -catenina. A β -catenina é um mediador intracelular da sinalização, sendo fosforilada e estabilizada devido à ativação pelo ligante Wnt e posteriormente transportada para o núcleo, onde age regulando a expressão gênica junto com um complexo cotranscricional (BIANCO *et al.*, 2010b; EISENMANN, 2005; KAWANO; KYPTA, 2003). Já existem estudos já correlacionam diretamente variações genéticas e nos níveis de expressão dos genes dessa via de sinalização com as PGR (BELLATI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2015).

O resultado de um estudo mostra que a diminuição dos níveis de β -catenina no endométrio está relacionado com as PGR, o que corrobora com nosso resultado de que baixos níveis de expressão dos genes da família EGF-CFC poderiam estar envolvidos nas PGR, uma vez que eles regulam positivamente a ativação da β -catenina, então uma diluição dos níveis dos mesmos poderia levar a uma diminuição da ação dessa molécula no núcleo. Esse poderia ser outro mecanismo possível em que a família EGF-CFC interfira nas PGR.

Nossas análises de ontologias mostraram que Cripto-1 atua modulando as respostas celulares as citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-6. A literatura traz um farto arsenal de estudos que já associaram alterações nos níveis genéticas e nos níveis dessas citocinas nas perdas gestacionais recorrentes (ABOUTORABI *et al.*, 2018; AL-TIMIMI; DARWEESH; HUSSEIN, 2014; KIM *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2016) TNF- α e IFN apresentam seus níveis aumentados enquanto a IL-6 apresenta uma diminuição de seus níveis nessa condição (ALJAMEIL *et al.*, 2018; MAKHSEED *et al.*, 2001). Já é sabido que reação inflamatória induzindo TNF- α afeta a função trofoblástica, que pode impactar a resposta imune conduzindo as PGR (HUANG *et al.*, 2018). Esse pode representar mecanismo que a família EGF-CFC poderia estar envolvida nas PGR

Outra via de sinalização que Cripto-1 (TDGF1) participa e que está relacionada a processos reprodutivos é a Notch. Notch é uma via importante para o processo de desenvolvimento normal e para decisões sobre o destino das células tronco em diferentes tecidos (BIANCO *et al.*, 2010b; WANG *et al.*, 2009). A ativação de Notch está relacionada à invasão e diferenciação das EVT's, além de que, existem evidências que ele atua na angiogênese placentária. Já é relato que Cripto-1 atua como um ativador da via Notch devido a facilitação da maturação do receptor Notch (PEREIRA *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2009).

Os mecanismos de hipóxia são uma parte crítica da placentação normal. A diminuição da tensão de oxigênio na placenta é essencial para a regulação da invasão trofoblástica, proliferação e diferenciação celular, angiogênese placentária e organogênese embrionária. Condições de hipóxia podem regular diretamente a expressão de cripto-1 através da ligação do fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1- α) na sua região promotora (BIANCO *et al.*, 2010b). HIF-1 α é um regulador chave para a adaptação da placenta a mudanças na pressão de oxigênio e especialmente na diferenciação de EVTs (SHEIBAK, 2018). Já foram relatados níveis de expressão aberrantes desse gene em abortos espontâneos e perdas gestacionais recorrentes (CHEN *et al.*, 2016; ZHI *et al.*, 2018). Visto a regulação de HIF-1 α sobre a expressão de cripto-1 esses estudos corroboram com nossos achados, visto que alterações nos níveis de expressão de HIF-1 α durante nas PGR podem culminar em alterações nos níveis de expressão de cripto-1.

Já foi relatado também, em um estudo em bovinos, alteração nos níveis de expressão de miRNAs e perdas gestacionais precoces. Dentre as dez principais vias de sinalização alvos dos 27 miRNAs estudados, estavam as vias de formação do eixo dorso ventral, de câncer de pâncreas, de câncer coloretal, de sinalização TGF- β e a de sinalização Wnt (DE BEM *et al.*, 2017). Essas cinco vias listadas aparecem enriquecidas quando analisamos via KEEG os genes da família EGF-CFC e seus genes de interação (Figura Suplementar 3). Visto o papel funcional dos miRNAs no controle dos produtos proteicos dentro da célula, esse estudo corrobora com nossos dados de que alterações nos produtos proteicos dos genes relacionados as vias de modulação da família EGF-CFC contribuem para desfechos negativos na gestação. Esse é outro estudo mostra a relevância dos da família EGF-CFC e das vias que ela interage nas PGR.

Corroborando com todas essas explicações de possíveis mecanismos de influência dos genes da família EGF-CFC nas PGR, já se viu em estudos experimentais, que a ruptura direcionada do *TDGF-1* (Cripto-1) com produção de mutantes homozigotos resulta em letalidade logo após a gastrulação, sendo que os mutantes não possuem uma linha primitiva, nódulo e mesoderme embrionária (XU *et al.*, 1999). Isso nos mostra que mutações deletérias nesse gene em homozigose levam a morte embrionária que posteriormente pode ocasionar um abortamento.

A literatura ainda é muito pobre a respeito de interações e do papel de *CFC1* (*Cryptic*) durante a reprodução, porém visto ao ver nossos dados de expressão, de biologia de sistemas e da consulta na literatura, acreditamos que seu papel nas perdas gestacionais recorrentes seja

similar aos de *TDGFI (Cripto-1)*, diferindo principalmente nos seus padrões de expressão temporal e espacial.

A partir das variantes selecionadas *in silico*, a variante estudada em *CFC1 (Cryptic)* (rs201431919) leva uma substituição de uma Arg por uma Gln na posição 47 da proteína (GEER *et al.*, 2010); já a variante em *TDGFI (Cripto-1)* (rs3806702) leva a uma diminuição dos níveis de sua proteína (RUGGIERO *et al.*, 2015). Por mais que nenhuma associação tenha identificada entre o RPL e as variantes na nossa amostra, isso não descarta o envolvimento dos genes da família EGF-CFC nas PGR. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg observado no grupo de PGR da variante de *TDGFI* provavelmente pode ser explicado pelo tamanho da amostra.

Essa falta de associação também pode sugerir que o papel biológico do gene é tão importante que variantes com grande impacto na proteína ou sua expressão não são toleradas, o que nos é apontado pela falta de homozigotos mutantes para a variante *missense* do gene *CFC1*. A quase inexistência de homozigotos para a variante *missense* rs201431919 em *CFC1* nos sugere que a mesma seja uma mutação recessiva com grande patogenicidade. Esse efeito provavelmente não é pronunciado em heterozigotos devido à haplossuficiência de *CFC1*. Dados do Ensembl (ENSEMBL, 2019) nos mostram que apenas populações africanas apresentam raros homozigotos para essa mutação, sendo que a mesma está ausente em todas as outras populações listadas nesse banco de dados. Na única amostra biológica que encontramos esse genótipo homozigoto (TT) pode ser um caso de mosaicismo (BIESECKER; SPINNER, 2013). Para uma análise mais profunda do efeito dessa variante seria fundamental o genótipo paterno, pois em pais heterozigotos para essa mutação, embriões homozigotos poderiam pronunciar o efeito da mesma.

Um dado que corroborou a eficiência de nosso score de patogenicidade foi o de que as variantes com maior escore tendiam a estar localizadas mais próximas do início do gene. Esse dado segue o padrão bem estabelecido de que variantes nas regiões mais iniciais dos genes tendem a ser mais prejudiciais do que variantes localizadas mais posteriormente, devido ao seu possível maior efeito no produto proteico final. Um exemplo clássico que podemos usar para demonstrar isso são de proteínas truncadas, que quanto mais posterior for o truncamento maior a probabilidade de uma proteína pelo menos parcialmente funcional.

Trabalhos utilizando modelos animais mostram a função embrionária dos genes da família EGF-CFC na formação dos eixos corporais. Em ensaios de resgate em peixes-zebra, Cripto e Cryptic mostraram funções similares (GRITSMAN *et al.*, 1999). É provável que as diferenças na função biológica entre os dois ocorram devido aos seus padrões de expressão

distintos (SHEN; SCHIER, 2000c). Nossas análises de expressão corroboram com esses dados, pois tanto *TDGF1* (Cripto-1) quanto *CFC1* (Cryptic), mostravam o mesmo comportamento de diminuição de expressão, entretanto, essa diminuição de expressão se deu em tecidos diferentes padrões espacial diferentes. Outro dado que reforça essa hipótese é nossa análise de interação proteína-proteína onde todas as interações que Cryptic (*CFC1*) faz são compartilhadas com Cripto-1 (*TDGF1*); além disso, as análises de ontologias mostram que 5 das 6 ontologias de Cryptic (*CFC1*) são compartilhadas com Cripto-1 (*TDGF1*).

Finalmente, esse foi o primeiro estudo a avaliar a família EGF-CFC em falhas reprodutivas. As análises de expressão sugerem que uma baixa expressão dos genes dessa família esteja relacionada com as PGR. Adicionalmente, nossas análises moleculares mostraram associação de *SMAD3*, que também tem sua ativação regulada pelos genes da família EGF-CFC, com esta condição. As análises de expressão, as análises de rede e ontologias e a literatura nos mostram o envolvimento dessa família como moduladora de vias chaves para o sucesso reprodutivo, tais como Wnt/ β -catenina, TGF- β , c-Src/AKT/MAPK e Notch e resposta a estímulos externos como a hipóxia. Essas vias, por sua vez, desempenham papel chave durante a gestação controlando proliferação celular, decidualização, angiogênese, apoptose, reconhecimento embrio-materno, implantação embrionária, placentação bem como de desenvolvimento embrionário de maneira geral.

Nosso estudo mostrou o poder das ferramentas de bioinformáticas aliadas às de biologia molecular como abordagens complementares para o maior entendimento de uma condição. Mesmo que os mecanismos moleculares precisos ainda sejam desconhecidos, existem várias evidências que nos apontam o envolvimento da família EGF-CFC nas PGR. Como perspectiva, cabem mais estudos sobre essa família gênica para elucidar os mecanismos precisos que determinam sua influência na etiologia das PRG.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUTORABI, Roshanak *et al.* The Study of Association Between Polymorphism of TNF- α Gene's Promoter Region and Recurrent Pregnancy Loss. **Journal of reproduction & infertility**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 211–218, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30746336>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

ACOG - American College of Obstetricians and Gynecologists. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: A committee opinion. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 1103–1111, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048>>

ACOG - American College of Obstetricians and Gynecologists. Early Pregnancy Loss. **the American College of Obstetricians and Gynecologists**, [s. l.], p. 1–10, 2015.

AL-TIMIMI, Fatima A.; DARWEESH, Mayyada F.; HUSSEIN, Ali R. The Role of Interferon- γ Gene Polymorphism in Spontaneous Abortion. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, [s. l.], v. 5, 2014. Disponível em: <<http://www.ijser.org>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

ALJAMEIL, Noura *et al.* Identification of serum cytokines as markers in women with recurrent pregnancy loss or miscarriage using MILLIPLEX analysis. **Biomedical Research**, [s. l.], v. 29, n. 18, 2018. Disponível em: <<http://www.alliedacademies.org/articles/identification-of-serum-cytokines-as-markers-in-women-with-recurrent-pregnancy-loss-or-miscarriage-using-milliplex-analysis-10873.html>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

ALLAN, Lindsey A. *et al.* Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 647–654, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ncb1005>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

ACOG - AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. 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. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 179–90, 2002.

ASRM - AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. [s. l.], v. 98, n. 5, p. 1103–

1111, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.048>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

BAGHERI, Azadeh; CHIANEH, Yousef Rezaei; RAO, Pragna. Role of angiogenic factors in recurrent pregnancy loss. **International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 497–502, 2013. Disponível em: <<https://www.ijrcog.org/index.php/ijrcog/article/view/228>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

BAMFORD, Richard N. *et al.* Loss-of-function mutations in the EGF-CFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 365–369, 2000. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ng1100_365>. Acesso em: 6 mar. 2018.

BANDEIRA, Carla Letícia *et al.* Tumorigenic factor CRIPTO-1 is immunolocalized in extravillous cytotrophoblast in placenta creta. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2014, p. 892856, 2014. a.

BANDEIRA, Carla Letícia *et al.* Tumorigenic factor CRIPTO-1 is immunolocalized in extravillous cytotrophoblast in placenta creta. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2014, p. 892856, 2014. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165718>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

BAZER, Fuller W. *et al.* Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, [s. l.], v. 3, p. 745–67, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196409>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

BELLATI, Filippo *et al.* Low endometrial beta-catenin and cadherins expression patterns are predictive for primary infertility and recurrent pregnancy loss. **Gynecological Endocrinology**, [s. l.], p. 1–5, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30806528>>. Acesso em: 11 maio. 2019.

BENDER ATIK, Ruth *et al.* ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. **Human Reproduction Open**, [s. l.], v. 2018, n. 2, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hropen/article/doi/10.1093/hropen/hoy004/4963604>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

BIANCO, Caterina *et al.* Role of Cripto-1 in Stem Cell Maintenance and Malignant Progression. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 177, n. 2, p. 532–540, 2010. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616345>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

BIANCO, Caterina *et al.* Role of Cripto-1 in Stem Cell Maintenance and Malignant Progression. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 177, n. 2, p. 532–540, 2010. b.

BIANCO, Caterina; SALOMON, David S. Targeting the embryonic gene Cripto-1 in cancer and beyond. **Expert opinion on therapeutic patents**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1739–49, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073352>>. Acesso em: 16 mar. 2018.

BOYD, Theonia K.; REDLINE, Raymond W. Chronic histiocytic intervillitis: a placental lesion associated with recurrent reproductive loss. **Human Pathology**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 1389–1396, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004681770080009X?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

BULLA, R. *et al.* Inhibition of trophoblast adhesion to endothelial cells by the sera of women with recurrent spontaneous abortions. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 116–23, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10476694>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

CAO, Ruixue *et al.* Duplication and deletion of CFC1 associated with heterotaxy syndrome. **DNA and cell biology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 101–6, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423076>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

CARVALHO, Ariel *et al.* Depression in Women with Recurrent Miscarriages – an Exploratory Study. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 609–614, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28024303>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

CHAITHRA, P. T.; MALINI, Suttur S.; KUMAR, C. Sharath. An Overview of Genetic and Molecular Factors Responsible for Recurrent Pregnancy Loss. **International Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 217–225, 2011. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09723757.2011.11886145>>. Acesso em: 17 maio. 2019.

CHEN, Xian; LIU, Zhaoliang; XU, Jianming. The Cooperative Function of Nuclear Receptor Coactivator 1 (NCOA1) and NCOA3 in Placental Development and Embryo Survival. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1917–1934, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20685850>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

CHEN, Xiaoyan *et al.* Hypoxia inducible factor and microvessels in peri-implantation endometrium of women with recurrent miscarriage. [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://fertstertforum.com/chenx-hif1alpha-micro-vessels-endometrium/>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

CHIKARAISHI, Koji *et al.* CFC1 is a cancer stemness-regulating factor in neuroblastoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 28, p. 45046, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620148>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

CHOI, Hee-Kyung *et al.* Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 24–31, 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.10331>>. Acesso em: 18 maio. 2019.

CICCODICOLA, A. *et al.* Molecular characterization of a gene of the “EGF family” expressed in undifferentiated human NTERA2 teratocarcinoma cells. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1987–91, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2792079>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

COLAS, Jean-François; SCHOENWOLF, Gary C. Subtractive hybridization identifies chick-cripto, a novel EGF–CFC ortholog expressed during gastrulation, neurulation and early cardiogenesis. **Gene**, [s. l.], v. 255, n. 2, p. 205–217, 2000. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111900003371>>. Acesso em: 6 mar. 2018.

CRUZ, Cynthia Dela *et al.* Expression of Nodal, Cripto, SMAD3, phosphorylated SMAD3, and SMAD4 in the proliferative endometrium of women with endometriosis. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 527–33, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25228630>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

DE BEM, T. H. C. *et al.* Low levels of exosomal-miRNAs in maternal blood are associated with early pregnancy loss in cloned cattle. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 14319, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-14616-1>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

DE CASTRO, Nadia Pereira *et al.* Cripto-1: an embryonic gene that promotes tumorigenesis. **Future Oncology**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1127–1142, 2010. a. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fon.10.68>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

DERYNCK, Rik; ZHANG, Ying; FENG, Xin-Hua. Transcriptional Activators of TGF- β Responses: Smads. **Cell**, [s. l.], v. 95, n. 6, p. 737–740, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400816967?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 abr. 2019.

DONO, R. *et al.* Isolation and characterization of the CRIPTO autosomal gene and its X-linked related sequence. **American journal of human genetics**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 555–65, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1882841>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

EISENMANN, David M. Wnt signaling. **WormBook**, [s. l.], p. 1–17, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18050402>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

EL HACHEM, Hady *et al.* Recurrent pregnancy loss: current perspectives. **International journal of women's health**, [s. l.], v. 9, p. 331–345, 2017.

ENSEMBL. **Transcript: CFC1-201 ENST00000259216.4**. 2017a. Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Variation_Transcript/Table?db=core;g=ENSG00000136698;r=2:130592766-130599550;t=ENST00000259216>. Acesso em: 9 mar. 2018.

ENSEMBL. **No Transcript: TDGF1-205 ENST00000542931.6**. 2017b. Disponível em: <https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000241186;r=3:46574534-46582457;t=ENST00000542931>. Acesso em: 9 mar. 2018.

ENSEMBL. **Transcript: SMAD3-201 ENST00000327367.9**. 2019. Disponível em: <https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000166949;r=15:67063763-67195169;t=ENST00000327367>. Acesso em: 25 maio. 2019.

FORD, Holly B.; SCHUST, Danny J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. **Reviews in obstetrics & gynecology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 76–83, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609401>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

FRANCISCO, Maria de Fátima Rezende *et al.* [Sexuality and depression among pregnant women with recurrent spontaneous abortion]. **Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 152–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760178>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

FURMENTO, V. A. *et al.* The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells. **Placenta**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 937–46, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400414007796>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

GEER, Lewis Y. *et al.* The NCBI BioSystems database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 38, n. suppl_1, p. D492–D496, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854944>>. Acesso em: 25 maio. 2019.

GEHIN, Martine *et al.* The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 22, n. 16, p. 5923–37, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12138202>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

GENTILINI, D. *et al.* PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. **Molecular human reproduction**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 317–22, 2007. Disponível em: <<http://academic.oup.com/molehr/article/13/5/317/1120312/PI3KAkt-And-ERK12-signalling-pathways-are-involved>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

GERSHON, Eran *et al.* Identification of trophoctoderm-derived Cripto as an essential mediator of embryo implantation. **Endocrinology**, [s. l.], 2018. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/endo/advance-article/doi/10.1210/en.2017-03039/4912392>>.

Acesso em: 13 mar. 2018.

GIBBS, Ronald S.; DANFORTH, David N. (David Newton). **Danforth's obstetrics and gynecology**. [s.l.] : Lippincott Williams & Wilkins, 2008. Disponível em: <<http://www.ovid.com/site/catalog/books/724.jsp>>. Acesso em: 1 mar. 2019.

GIUDICE, Linda C.; SALEH, Walid. Growth factors in reproduction. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 60–69, 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104327609400205I?via%3Dihub>>.

Acesso em: 13 maio. 2019.

GRAY, Peter C. *et al.* Cripto binds transforming growth factor beta (TGF-beta) and inhibits TGF-beta signaling. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 26, n. 24, p. 9268–78, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030617>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

GRITSMAN, Kira *et al.* The EGF-CFC Protein One-Eyed Pinhead Is Essential for Nodal Signaling. **Cell**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 121–132, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400807205>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

HARRISON, Craig A. *et al.* Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 73–78, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734148>>. Acesso em: 9 abr. 2019.

HUANG, Zhenyao *et al.* The enhancer RNA Inc-SLC4A1-1 epigenetically regulates unexplained recurrent pregnancy loss (URPL) by activating CXCL8 and NF-kB pathway. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 38, p. 162–170, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30448228>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

HYDE, Kassie J.; SCHUST, Danny J. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. a023119, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25659378>>. Acesso em: 3 set. 2018.

JINDAL, P. *et al.* Placental pathology of recurrent spontaneous abortion: the role of histopathological examination of products of conception in routine clinical practice: a mini review. **Human Reproduction**, [s. 1.], v. 22, n. 2, p. 313–316, 2007. Disponível em: <<http://academic.oup.com/humrep/article/22/2/313/2939062/Placental-pathology-of-recurrent-spontaneous>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

KASER, Daniel. The Status of Genetic Screening in Recurrent Pregnancy Loss. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, [s. 1.], v. 45, n. 1, p. 143–154, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29428282>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

KAWANO, Y.; KYPTA, Robert. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. **Journal of Cell Science**, [s. 1.], v. 116, n. 13, p. 2627–2634, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775774>>. Acesso em: 11 maio. 2019.

KENNEY, Nicholas J.; ADKINS, Heather B.; SANICOLA, Michele. Nodal and Cripto-1: Embryonic Pattern Formation Genes Involved in Mammary Gland Development and Tumorigenesis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/B:JOMG.0000037158.91940.1c.pdf>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

KHALIFE, Dalia; GHAZEERI, Ghina; KUTTEH, William. Review of current guidelines for recurrent pregnancy loss: new strategies for optimal evaluation of women who may be superfertile. **Seminars in Perinatology**, [s. 1.], 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0146000518301447?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

KIM, Jung A. *et al.* Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. **Human Fertility**, [s. 1.], p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14647273.2018.1543899>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

KIM, Sung Tae; MOLEY, Kelle H. Regulation of Facilitative Glucose Transporters and AKT/MAPK/PRKAA Signaling via Estradiol and Progesterone in the Mouse Uterine

Epithelium1. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 188–198, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208550>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

KLEBANOFF, Robert Silver; D. Branch; Robert Goldenberg; Jay Iams; Mark *et al.* Nomenclature for Pregnancy Outcomes. **Obstetrics &**, [s. l.], v. 118, n. 6, p. 1402–1408, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105271>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

KOLTE, A. M. *et al.* Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 495–498, 2015. a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/deu299>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

KOLTE, A. M. *et al.* Depression and emotional stress is highly prevalent among women with recurrent pregnancy loss. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 777–782, 2015. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662810>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

BIESECKER, L.B.; SPINNER, N.B. A genomic view of mosaicism and human disease. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], vol: 14, n. 5, p: 307-320, 2013. Disponível em: <www.nature.com/articles/nrg3424>. Acesso em: 29 mai 2019.

LI, Hui-Hui *et al.* Association of TNF- α genetic polymorphisms with recurrent pregnancy loss risk: a systematic review and meta-analysis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 6, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26837816>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

LI, Hui *et al.* Chemokine CCL24 promotes the growth and invasiveness of trophoblasts through ERK1/2 and PI3K signaling pathways in human early pregnancy. **Reproduction (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 150, n. 5, p. 417–27, 2015. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/lookup/doi/10.1530/REP-15-0119>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

LIN, Hai-Yan *et al.* Expression of Smad2 and Smad4, transforming growth factor-beta signal transducers in rat endometrium during the estrous cycle, pre-, and peri-implantation.

Animal reproduction science, [s. l.], v. 80, n. 3–4, p. 303–16, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003001714>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

LIN, Paul C. Reproductive Outcomes in Women with Uterine Anomalies. **Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 33–39, 2004. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/154099904322836438>>. Acesso em: 17 maio. 2019.

LIU, G. *et al.* Expression of Smad2 and Smad4 in mouse uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. **Placenta**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 530–7, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400403003084>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

MACIAS, Maria J.; MARTIN-MALPARTIDA, Pau; MASSAGUÉ, Joan. Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling. **Trends in biochemical sciences**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 296–308, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25935112>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

MAGDOUD, K. *et al.* Genetic variation in TGFB1 gene and risk of idiopathic recurrent pregnancy loss. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 438–443, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gat012>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

MAKHSEED, M. *et al.* Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 2219–2226, 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/16.10.2219>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

MASSAGUÉ, J. TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 753–791, 1998. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

MASSAGUÉ, Joan. TGF β signalling in context. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 616–30, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992590>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

MAZDAPOUR, Manouchehr; DEHGHANI ASHKEZARI, Mahmood; SEIFATI, Seyed. Analysis of BMP4 (rs121912765) polymorphism in Iranian women with history of

recurrent spontaneous abortion: A case-control study. **Biomedical Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 29–32, 2018. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2018.1170>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

MCQUEEN, Dana B.; ZHANG, John; ROBINS, Jared C. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028219302468?via%3Dihub#bib19>>. Acesso em: 19 maio. 2019.

MICHELS, Thomas C.; TIU, ALVIN Y. Second Trimester Pregnancy Loss. **American Family Physician**, [s. l.], v. 76, n. 9, p. 1341–1346, 2007.

MINCHIOTTI, Gabriella *et al.* Role of the EGF-CFC gene cripto in cell differentiation and embryo development. **Gene**, [s. l.], v. 287, n. 1–2, p. 33–7, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992720>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

MUKHERJEE, Atish *et al.* Steroid receptor coactivator 2 is required for female fertility and mammary morphogenesis: insights from the mouse, relevance to the human. **Nuclear Receptor Signaling**, [s. l.], v. 4, p. e011, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174919>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

NAGAOKA, Tadahiro *et al.* An evolving web of signaling networks regulated by Cripto-1. **Growth Factors**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 13–21, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08977194.2011.641962>>. Acesso em: 12 maio. 2019.

OGASAWARA, M. S. *et al.* Elevation of transforming growth factor-beta1 is associated with recurrent miscarriage. **Journal of clinical immunology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 453–7, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11202235>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

OMIM. * **605194 CRYPTIC PROTEIN; CFC1**. 2015. Disponível em: <<https://www.omim.org/entry/605194?search=cfc1&highlight=cfc1>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

PAGE, Jessica M.; SILVER, Robert M. Genetic Causes of Recurrent Pregnancy Loss. **Clinical obstetrics and gynecology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 498–508, 2016. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003081-201609000-00007>>. Acesso em: 3 set. 2018.

PARDALI, Evangelia; GOUMANS, Marie-José; TEN DIJKE, Peter. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 9, p. 556–567, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656490>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

PENG, Jia *et al.* Uterine Activin-Like Kinase 4 Regulates Trophoblast Development During Mouse Placentation. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 1684–1693, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26484579>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

PEREIRA, Nadia *et al.* Cripto-1: At the Crossroads of Embryonic Stem Cells and Cancer. In: **Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering**. [s.l.] : InTech, 2011.

PEREZA, Nina *et al.* Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 567–575, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1472648312000272>>. Acesso em: 18 maio. 2019.

POLAND, B. J. *et al.* Reproductive counseling in patients who have had a spontaneous abortion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [s. l.], v. 127, n. 7, p. 685–691, 1977. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000293787790240X?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 maio. 2019.

PORTER, T. Flint; LACOURSIERE, Yvette; SCOTT, James R. Immunotherapy for recurrent miscarriage. In: PORTER, T. Flint (Ed.). **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

PORTER, T. Flint; SCOTT, James R. Evidence-based care of recurrent miscarriage. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 85–101, 2005. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521693404001804?via%3Dihub>>.

Acesso em: 19 mar. 2018.

PRAKASH, Alka *et al.* Inhibin A and activin A may be used to predict pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 1758–1763, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028205003808?via%3Dihub-bib17>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

RAI, Raj; REGAN, Lesley. Recurrent miscarriage. **The Lancet**, [s. l.], v. 368, n. 9535, p. 601–611, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606692040>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

RILEY, Joan K. *et al.* Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity Is Critical for Glucose Metabolism and Embryo Survival in Murine Blastocysts. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 9, p. 6010–6019, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272157>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

RCOG - Royal College Of Obstetricians And Gynaecologists. The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First- trimester and Second-trimester Miscarriage The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First-trimester and Second-trimester Miscarriage. [s. l.], 2011. Disponível em: <https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg_17.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2018.

RUGGIERO, Daniela *et al.* Genetic variants modulating CRIPTO serum levels identified by genome-wide association study in Cilento isolates. **PLoS genetics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. e1004976, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25629528>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

SACCONI, S. *et al.* Regional localization of the human EGF-like growth factor CRIPTO gene (TDGF-1) to chromosome 3p21. **Human genetics**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 229–30, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860072>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

SALKER, Madhuri *et al.* Natural Selection of Human Embryos: Impaired Decidualization of Endometrium Disables Embryo-Maternal Interactions and Causes

Recurrent Pregnancy Loss. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e10287, 2010. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010287>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

SALOMAN, D. S. *et al.* The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. **Endocrine-related cancer**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 199–226, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11174844>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

SARAVELOS, Sotirios H.; REGAN, Lesley. Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 157–166, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889854513000958?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

SHEIBAK, Nadia. The Role of Hypoxia in Normal Pregnancy and Pregnancy Complications. **Gene, Cell and Tissue**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2018. Disponível em: <<http://genecelltissue.com/en/articles/80202.html>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

SHEN, M. M.; SCHIER, A. F. The EGF-CFC gene family in vertebrate development. **Trends in genetics: TIG**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 303–9, 2000. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858660>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

SHEN, M. M.; WANG, H.; LEDER, P. A differential display strategy identifies Cryptic, a novel EGF-related gene expressed in the axial and lateral mesoderm during mouse gastrulation. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 124, n. 2, p. 429–42, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9053319>>. Acesso em: 8 mar. 2018.

SHEN, Michael M. Decrypting the role of Cripto in tumorigenesis. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 500–502, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925690>>. Acesso em: 9 mar. 2018.

SHI, Yigong; MASSAGUÉ, Joan. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, [s. l.], v. 113, n. 6, p. 685–700, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

SIMPSON, Joe Leigh; CARSON, Sandra Ann. Genetic and Nongenetic Causes of Pregnancy Loss. **The Global Library of Women's Medicine**, [s. l.], 2009. Disponível em:

<http://www.glowm.com/index.html?p=glowm.cml/section_view&articleid=318>. Acesso em: 16 maio. 2019.

STEVENS, Charles F. Systems biology versus molecular biology. **Current biology : CB**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. R51-2, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738745>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

STRASZEWSKI-CHAVEZ, Shawn L.; ABRAHAMS, Vikki M.; MOR, Gil. The Role of Apoptosis in the Regulation of Trophoblast Survival and Differentiation during Pregnancy. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 877–897, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article/26/7/877/2355158>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

SUMMY, J. M.; GALLICK, Gary E. Treatment for Advanced Tumors: Src Reclaims Center Stage. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1398–1401, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533761>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

THELLIN, Olivier *et al.* Tolerance to the foeto-placental ‘graft’: ten ways to support a child for nine months. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 731–737, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791500001709?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

TIMEVA, Tanya; SHTEREV, Atanas; KYURKCHIEV, Stanimir. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. **Journal of reproduction & infertility**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 173–83, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473625>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

TOURNAYE, Herman J.; COHLEN, Ben J. Management of male-factor infertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 769–775, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704953>>. Acesso em: 5 set. 2018.

VAN DEN BERG, Merel M. J. *et al.* Genetics of early miscarriage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1822, n. 12, p. 1951–1959, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912001494>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

WANG, Binbin *et al.* CFC1 mutations in Chinese children with congenital heart disease. **International Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 146, n. 1, p. 86–88, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19853937>>. Acesso em: 16 maio. 2019.

WANG, Xiaobin *et al.* Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. **Fertility and sterility**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 577–84, 2003.

WANG, Zhiwei *et al.* Emerging role of Notch in stem cells and cancer. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 279, n. 1, p. 8–12, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438350800801X?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

WATANABE, Kazuhide *et al.* Enhancement of Notch receptor maturation and signaling sensitivity by Cripto-1. **The Journal of cell biology**, [s. l.], v. 187, n. 3, p. 343–53, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19948478>>. Acesso em: 13 maio. 2019.

Who: Recommended Definitions, Terminology and Format for Statistical Tables Related to The Perinatal Period And Use of A New Certificate For Cause of Perinatal Deaths. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 247–253, 1977.

WU, Jia-Wei *et al.* Crystal Structure of a Phosphorylated Smad2: Recognition of Phosphoserine by the MH2 Domain and Insights on Smad Function in TGF- β Signaling. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1277–1289, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S109727650100421X?via%3Dihub>>. Acesso em: 9 abr. 2019.

XU, Chunhui *et al.* Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. [s. l.], v. 126, n. 3, p. 483–494, 1999. Disponível em: <<https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-0033000369&origin=inward&txGid=c66cf6031b6ed168b111b7c91feabf80>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

YU, Mingming *et al.* Integrated analysis of DNA methylome and transcriptome identified CREB5 as a novel risk gene contributing to recurrent pregnancy loss.

EBioMedicine, [s. l.], v. 35, p. 334–344, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30100398>>. Acesso em: 9 abr. 2019.

YUN, SeungPil *et al.* Cripto Enhances Proliferation and Survival of Mesenchymal Stem Cells by Up-Regulating JAK2/STAT3 Pathway in a GRP78-Dependent Manner. **Biomolecules & therapeutics**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 464–473, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28835002>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

ZHANG, Yi-xiang *et al.* Psychological burden, sexual satisfaction and erectile function in men whose partners experience recurrent pregnancy loss in China: a cross-sectional study. **Reproductive Health**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 73, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27296130>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

ZHANG, Yimei *et al.* Novel missense mutation in WNT6 in 100 couples with unexplained recurrent miscarriage. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 994–999, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/dev028>>. Acesso em: 11 maio. 2019.

ZHAO, Kun-Qing *et al.* Maternal Smad3 deficiency compromises decidualization in mice. **Journal of cellular biochemistry**, [s. l.], v. 113, n. 10, p. 3266–75, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.24204>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

ZHI, Zhifu *et al.* Early missed abortion is associated with villous angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 298, n. 3, p. 537–543, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00404-018-4802-9>>. Acesso em: 20 maio. 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 89992818300005327

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS NA FAMÍLIA EGF-CFC EM MULHERES COM ABORTAMENTO DE REPETIÇÃO

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o papel dos genes da família EGF-CFC e UMA DE SUAS VIAS DE SINALIZAÇÃO, NODAL, ENVOLVIDA COM PROCESSOS REPRODUTIVOS, na suscetibilidade aos abortamentos de repetição. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os abortamentos de repetição podem ter diversas causas, no entanto, na maioria dos casos não se reconhece uma causa específica. Então o objetivo desta pesquisa é avaliar se um grupo específico de genes (pequenas partes do DNA) pode estar envolvido nos abortamentos de repetição.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: responder a um questionário sobre seu histórico familiar e médico, uso de medicamentos e informações sociodemográficas. O tempo de duração da entrevista é em torno de 15 minutos. Caso seja necessário, para confirmação, nós acessaremos informações no seu prontuário.

O material biológico a ser analisado (seu DNA) será obtido a partir de uma parte do que é coletado para os exames padrões, os quais você já foi submetida para as análises que avaliam as possíveis causas dos abortamentos de repetição. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para reconsentir com o uso do material.

Os riscos para participação do projeto são: potencial de hematoma no momento da coleta de amostra de sangue e risco de perda de confidencialidade. Entretanto os profissionais que realizarão a coleta são qualificados e experientes para a realização desses procedimentos. Em relação a possível perda de confidencialidade, para evitar que este evento ocorra os dados serão codificados.

Não existem benefícios diretos da participação na pesquisa, ou seja, a investigação desses genes não acarretará no seu atendimento ou identificação direta da causa de abortamento espontâneo. Porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre os abortamentos de repetição, e se aplicável, poderá beneficiar futuras pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Com relação às amostras biológicas armazenadas:

() Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

() Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Maria Teresa Vieira Sanseverino, pelo telefone 3359-8011, com o pesquisador João Matheus Bremm, pelo mesmo telefone, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

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

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

IDENTIFICAÇÃO

Cônjuge da Paciente

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

Paciente

5. Nome: _____
6. Endereço: _____
7. Bairro: _____ Cidade: _____
8. CEP: _____
9. Fone casa: _____ Fone Cel: _____
10. Data nascimento: _____ Idade: _____
11. Profissão/ocup: _____
12. Escolaridade: _____
13. Peso habitual: _____ kg Peso atual: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____
14. Doença auto-imune: _____
15. Histórico de Tumor/Câncer: _____

	Paciente	Cônjuge	Familiares da paciente	Familiares do Cônjuge
Tumor				
Câncer				

16. Grupo Sanguíneo: _____ Fator RH: () positivo () negativo () não sabe
17. Consangüinidade do Casal: () Sim () Não Obs.: _____
18. Dificuldades para engravidar? () Sim () Não
19. Gestações: _____
20. NV: _____
21. NM: _____
22. Abortamento espontâneo: _____
23. Abortamento provocado: _____
24. Filhos vivos: _____

(heredograma no verso)

	Materna	Paterna	Obs
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	HC G	ECO/data	Parto C/N	Curetag	Nvivo	Nmorto	Abort espon	Obs

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						