

ÉVELYN TRAINA¹

SILVIA DAHER²

CAMILA SOMMERAUER FRANCHIM³

JULIANA AOKI FUZUY⁴

ANTÔNIO FERNANDES MORON⁵

PRISCILLA CHAMELETE ANDRADE BANZATO⁶

ROSIANE MATTAR⁷

Polimorfismo do gene dos receptores de progesterona e o aborto espontâneo de repetição

Progesterone receptor gene polymorphism and recurrent spontaneous abortion

Artigo original

Palavras-chave

Aborto habitual
Polimorfismo genético
Progesterona
Gravidez
Hormônios

Keywords

Abortion, habitual
Polymorphism, genetic
Progesterone
Pregnancy
Hormones

Resumo

OBJETIVO: investigar se polimorfismos dos genes que codificam o receptor de progesterona (PROGINS) estão relacionados à ocorrência de aborto espontâneo de repetição (AER). **MÉTODOS:** em estudo caso-controle, foram selecionados 85 pacientes com antecedente de pelo menos três abortos precoces sem etiologia definida (Grupo Caso) e 157 mulheres com história de pelo menos duas gestações de termo sem intercorrências e sem passado de abortamento (Grupo Controle). Realizada coleta de 10 mL de sangue por punção venosa periférica e extração de DNA pela técnica DTAB/CTAB. As genotipagens foram feitas por reação em cadeia de polimerase (PCR), nas condições de ciclagem específica para o polimorfismo em estudo, seguida de amplificação em gel de agarose a 2%. A visualização das bandas foi feita sob luz ultravioleta e os géis foram fotografados. As diferenças genotípicas e alélicas entre os dois grupos para o polimorfismo PROGINS foram calculadas pelo teste de χ^2 , adotando-se como nível de significância valores de $p < 0,05$. Calculou-se ainda o Odds Ratio (OR, razão de chances), com intervalos de confiança de 95% (IC95%). **RESULTADOS:** As frequências genotípicas encontradas para o polimorfismo PROGINS foram de 72,3% T1/T1 e 27,7% T1/T2 no grupo com AER e 76,4% T1/T1, 22,3% T1/T2 e 1,3% T2/T2 no Grupo Controle. Não houve diferenças entre os grupos, analisando-se as frequências genotípicas e alélicas: respectivamente $p = 0,4$ (OR: 0,8) e $p = 0,6$ (OR: 0,9). **CONCLUSÕES:** os dados do presente estudo sugerem que o polimorfismo PROGINS do gene dos receptores de progesterona não está relacionado ao AER.

Abstract

PURPOSE: to assess a possible association between polymorphism of the progesterone receptor gene (PROGINS) and recurrent spontaneous abortion (RSA). **METHODS:** in this case-control study, 85 women with at least three previous spontaneous abortions without an identifiable cause (RSA Group) and 157 women with at least two previous term pregnancies without pathologies and no previous miscarriage (Control Group) were selected. An amount of 10 mL of peripheral blood was collected by venipuncture and genomic DNA was extracted by the DTAB/CTAB method, followed by the polymerase chain reaction (PCR) under specific conditions for this polymorphism and by amplification by 2% agarose gel electrophoresis. The bands were visualized with an ultraviolet light transilluminator and the gels were photographed. Differences in the PROGINS genotype and allele frequencies between groups were analyzed by the χ^2 test, with the level of significance set at $p < 0.05$. The Odds Ratio (OR) was also used, with 95% confidence intervals 95%CI. **RESULTS:** PROGINS genotypic frequencies were 72.3% T1T1 and 27.7% T1T2 for the RSA group and 76.4% T1T1, 22.3% T1T2 and 1.3% T2T2 for the control group. There were no differences between groups when the genotype and allele frequencies were analyzed: respectively $p = 0.48$ (OR: 0.8) and $p = 0.65$ (OR: 0.9). **CONCLUSIONS:** our results suggest that PROGINS polymorphism is not associated with RSA.

Correspondência:

Évelyn Traina
Rua Rio Grande, 551, apto. 71-A, Vila Mariana
CEP 04018-001 – São Paulo (SP), Brasil
E-mail: evelyntraina@hotmail.com

Recebido

30/3/10

Aceito com modificações

12/5/10

Estudo realizado na Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Doutora pelo Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

² Professor Adjunto do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

³ Bióloga; Mestre pelo Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Acadêmica do Curso de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo, Brasil.

⁵ Professor Titular; Livre-docente do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

⁶ Pós-Graduanda (Mestrado) do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

⁷ Professor Adjunto; Livre-docente do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

Introdução

O aborto espontâneo de repetição (AER) é conceituado como a perda consecutiva de três ou mais gestações e afeta aproximadamente 0,5% da população. Apesar dos inúmeros recursos disponíveis na atualidade, sua etiologia ainda permanece indefinida em mais da metade dos casos¹.

Diversos fatores têm sido associados à perda gestacional recorrente. Entre as diversas hipóteses, postula-se que alterações hormonais, inflamatórias e de vascularização possam estar envolvidas no desenvolvimento da gravidez e na perda gestacional^{2,3}. Nesse contexto, a importância da progesterona está bem documentada, agindo desde as fases iniciais até o final da gravidez⁴. As ações biológicas da progesterona são mediadas por duas isoformas de seu receptor (PR), respectivamente A e B. A ação de cada uma ainda não é totalmente conhecida. Sabe-se que a resposta celular final depende da proporção em que se encontram, e que o equilíbrio espaço-temporal é fundamental para a manutenção da fertilidade e modulação de efeitos tecido-específicos induzidos pela progesterona⁵.

A modulação da expressão de receptores de progesterona depende de muitos fatores. É bem estabelecido, contudo, que ela seja pelo menos em parte determinada geneticamente. O gene que codifica os receptores de progesterona em humanos é único e está localizado no cromossomo 11q22-23, sendo responsável pela produção das duas isoformas proteicas: PR-A e PR-B⁶.

Recentes avanços em técnicas moleculares têm resultado na descrição de grande número de polimorfismos genéticos, muitos deles já estudados em relação a patologias ginecológicas e obstétricas⁷, incluindo o AER^{8,9}.

No estudo dos receptores de progesterona, destaca-se o polimorfismo dos genes que codificam o receptor de progesterona (PROGINS), que consiste em uma inserção da família *Alu* de 306 pares de bases (pb), no íntron G, entre os éxons 7 e 8. Essa inserção levaria à transcrição anômala do gene, culminando na perda da capacidade de ligação do hormônio ao seu receptor e consequente queda da atividade final mediada pela progesterona. A presença do PROGINS já foi associada ao AER^{10,11} e outras afecções hormônio-dependentes¹²⁻¹⁵.

Acredita-se que os avanços na genética desempenharão papel crucial na medicina e na Saúde Pública por dispor de informações para predição e prevenção de doenças. Assim, estima-se que testes genéticos possam revelar suscetibilidades individuais, de forma a analisar riscos e orientar intervenções.

Dessa forma, e conhecendo a importância da progesterona no desenvolvimento da gestação, este estudo teve o objetivo de analisar a relação entre o polimorfismo PROGINS e a ocorrência de aborto espontâneo de repetição.

Métodos

Em estudo caso-controle, foram selecionadas 85 mulheres (idade de 17 a 43 anos, média 30,4) atendidas no Ambulatório de Aborto Habitual do Hospital São Paulo, com antecedente de pelo menos três perdas gestacionais precoces consecutivas (Grupo Caso). Todas foram submetidas ao protocolo de investigação do setor, que inclui exames específicos: histeroscopia, histerossalpingografia, cariótipo dos pais, investigação de deficiência de fase lútea (dosagens seriadas de progesterona) e investigação de Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide através de pesquisa de anticorpo anticardiolipina e anticoagulante lúpico. Também são realizados rotineiramente exames gerias como dosagem de prolactina, hormônios tireoidianos, curva glicêmica, sorologias para toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose, HIV, hepatites B e C, investigação de *Chlamydia trachomatis*, *Streptococo* B e vaginose bacteriana.

O Grupo Controle foi composto por 191 mulheres (idade de 18 a 59 anos, média 33,2) com duas ou mais gestações de termo sem intercorrências e sem história de abortamento.

Foram incluídas pacientes das raças branca, parda e negra, assim definidas por autotranscrição, de acordo com os critérios de classificação racial do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)¹⁶. Os grupos foram pareados quanto à raça, mantendo-se a mesma proporção das três diferentes raças nos dois grupos estudados.

Foram excluídas mulheres portadoras de doenças sistêmicas crônicas (como hipertensão arterial, diabetes e doenças reumatológicas).

Todas as etapas deste trabalho seguiram as normas de boas práticas em pesquisa envolvendo seres humanos, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) (CEP 0299/06) e todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o estudo genético, inicialmente foram coletados 10 mL de sangue por punção de veia periférica de antebraço. Após centrifugação, o DNA foi extraído pela técnica DTAB/CTAB¹⁷. A concentração final de DNA a ser utilizado foi ajustada em 100 ng/μL, podendo ser utilizada entre 25/200 ng/μL, por meio de leituras das absorbâncias em espectrofotômetro.

As genotipagens foram realizadas em condições padrões para reação de polimerase em cadeia (PCR) (Master Mix, Promega Corp., Madison, WI, EUA, Prodlimol). Para a amplificação do gene dos receptores de progesterona, foram utilizados os seguintes primers (13): sense: 5' – GGC AGA AAG CAA AAT AAA AAG A – 3' e anti-sense: 5' – AAA GTA TTT TCT TGC TAA ATG TC – 3'. Foram utilizados 2 μL do DNA a ser estudado, em volume final de 25 μL de reação, contendo 11 μL de Master Mix, 11 μL de Nuclease

Tabela 1 - Frequência dos genótipos do polimorfismo PROGINs, entre mulheres com AER e controles

Genótipo PROGINs	AER (n= 83)		Controle (n=157)		Valor de p	OR (IC95%)
	n	%	n	%		
T1T1	60	72,3	120	76,4	0,4	0,8 (0,4-1,5)
T1T2	23	27,7	35	22,3		
T2T2	0	0	2	1,3		
T1T1 X (T1T1 +T2T2)						

O valor de p foi baseado no teste de χ^2 , sendo considerado significativo quando menor que 5%.

OR: Odds Ratio; IC95%: intervalo de confiança; PROGINs: polimorfismo do gene do receptor de progesterona; AER: aborto espontâneo de repetição; T1T1: homocigoto selvagem; T1T2: heterocigoto; T2T2: homocigoto mutado.

Tabela 2 - Frequência dos alelos do polimorfismo PROGINs entre mulheres com AER e controles

Alelo	AER (n=166)		Controle (n=314)		Valor de p	OR (IC95%)
	n	%	n	%		
T1	143	86,1	275	87,6	0,6	0,9 (0,5-1,5)
T2	23	13,9	39	12,4		

O valor de p foi baseado no teste de χ^2 , sendo considerado significativo quando menor que 5%.

OR: Odds Ratio; IC95%: intervalo de confiança; PROGINs: polimorfismo do gene do receptor de progesterona; AER: aborto espontâneo de repetição; T1: alelo selvagem; T2: alelo mutado.

Free Water (ambos Promega Corp., Madison, WI, EUA, Prodimol) e 0,5 μ L de cada primer (sense e anti-sense). Como controle negativo, foram utilizados 2 μ L de Nuclease Free Water em substituição ao DNA. As reações foram incubadas em termociclador (Biocycler modelo MJ96G), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94° por cinco minutos, seguida de 40 ciclos a 94° por um minuto (desnaturação), 55° por um minuto (hibridização dos oligonucleotídeos) e 72° por um minuto (polimerização), seguidos por incubação a 72° por sete minutos. Os produtos obtidos foram misturados a 1 μ L de Blue Juice (Invitrogen, Califórnia, USA), aplicados em gel de agarose 2% (Gibco BRL, Paisley, UK), corado com brometo de etídio 0,75 μ g/mL (Sigma Chemical Company, Missouri, USA) e submetidos à eletroforese por 40 minutos a 110 volts, em cuba Gel Tray LCH 12 x 14, contendo tampão de corrida TBE 0,5X.

Por visualização em transiluminador de luz ultravioleta, foram detectados os produtos de PCR, que podem apresentar dois tamanhos segundo a presença ou ausência da inserção *Alu* PV /HS-1 (306pb). Se o gene dos receptores de progesterona não apresentar a inserção, um fragmento de 149pb será obtido, e isso representa o alelo selvagem (T1); porém se o gene tiver a inserção *Alu*, o fragmento será de 455pb, correspondente ao alelo mutante ou polimórfico (T2). Desta forma, são determinados três genótipos: selvagem (T1/T1), heterocigoto (T1/T2) e mutado (T2/T2). Os genótipos heterocigoto e mutado, que contêm a inserção *Alu*, são chamados PROGINs-positivo.

Para a análise estatística, os genótipos PROGINs-positivo foram somados e comparados ao genótipo PROGINs-negativo. O teste de χ^2 foi usado para comparação de dados categóricos de amostras relacionadas, adotando-se como nível de significância 5% ($p < 0,05$); todos os testes foram bicaudais. Diferenças entre médias de dados categóricos ordinais foram testadas utilizando-se o teste de Mann-

Whitney. Foi calculada a Odds Ratio (OR), com intervalos de confiança de 95%, para medir a associação entre as frequências alélicas e genotípicas e o AER. A análise foi realizada segundo o pacote estatístico Statistical Package for the Social Science (SPSS) 13.1 para Windows.

Resultados

A distribuição genotípica estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos dois grupos estudados.

A distribuição das frequências do polimorfismo PROGINs no grupo com AER foi de 72,3% T1/T1 e 27,7% T1/T2. No Grupo Controle, encontramos: 76,4% T1/T1, 22,3% T1/T2 e 1,3% T2/T2. Considerando as frequências alélicas, no Grupo Caso 86,1% das mulheres apresentavam o alelo T1 e 13,9% o alelo T2. No Grupo Controle, o alelo T1 apareceu em 87,6% da população e no Grupo Caso em 12,4%. Esses dados estão representados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Não houve diferença significativa entre os dois grupos em relação aos genótipos do polimorfismo PROGINs: $\chi^2(1)=0,5$; OR=0,8; 95%IC (OR): 0,4 a 1,5; $p=0,4$ (Tabela 1). Em relação às frequências alélicas, também não encontramos diferenças significativas entre pacientes com abortamento de repetição e controles: $\chi^2(1)=2,0$; OR=0,9; 95%IC (OR): 0,5 a 1,5; $p=0,6$. Esses dados estão representados na Tabela 2.

Além disso, não houve diferença significativa no número de abortamentos entre as mulheres portadoras ou não do alelo T2: $U=5092,0$; $Z= -0,8$; $p=0,4$.

Discussão

Neste estudo, não encontramos associação entre os polimorfismos do gene dos receptores de progesterona

(PROGINS) e a ocorrência de AER. As frequências genotípicas aqui descritas estão em concordância com outras publicações, inclusive na população brasileira^{12,13}.

O polimorfismo PROGINS já foi investigado em diversas condições ginecológicas e obstétricas. Em relação ao AER, as publicações são, até o momento, discrepantes^{10,11}. Essas divergências podem ser atribuídas ao tamanho amostral, aos critérios para seleção dos participantes, à etnia e à definição da doença. Devido às diversas publicações com resultados divergentes e considerando a importância da progesterona na gravidez, achamos interessante investigar a associação do PROGINS e o AER na presente amostra. Não encontramos associação, ratificando assim os achados iniciais de Kurs¹⁰.

Já foi demonstrado que a presença da inserção *Alu* torna os receptores menos responsivos à ação do hormônio¹⁸. Isso levaria a crer que as pacientes com genótipo PROGINS-positivo teriam maior risco de abortamento, dada a importância da progesterona do desenvolvimento da gravidez. No entanto, nossos dados não confirmaram essa hipótese. Vale ressaltar, aqui, que não se conhece a influência exata do PROGINS sobre os receptores decíduais e placentários. Investigações sobre a expressão desses receptores e sua correlação com os diferentes genótipos certamente fariam surgir novas possibilidades de pesquisa.

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento dramático de descobertas genéticas envolvendo doenças complexas. Nesses estudos, que têm habitualmente desenho caso-controle, a seleção dos participantes e o tamanho amostral são questões importantes, uma vez que o número de indivíduos é influenciado pela frequência do polimorfismo na população. Devido à dificuldade em se obter número elevado de amostras, erro beta de 20% e alfa de 5% geralmente são aceitáveis para o cálculo amostral, sendo que aumentar o número de controles é artifício que aumenta o poder do teste¹⁹. Para a seleção dos participantes, a premissa fundamental é a definição do fenótipo em questão²⁰. Atualmente, dados sobre estudos de associação genética e AER referem tamanho amostral em torno de cem indivíduos²¹.

Assim, nosso grupo foi considerado bastante representativo, na medida em que incluiu mulheres jovens com AER e pacientes com sucesso gestacional comprovado no Grupo Controle. Como foram estudadas alterações genéticas

no sangue periférico, não foram impostas restrição quanto à idade para seleção do Grupo Controle. Em relação à raça, as pacientes não foram subdivididas devido à grande miscigenação racial da população brasileira²². Não há como estudos deste tipo na população brasileira atingirem um critério perfeito de seleção. Optou-se, assim, pelo pareamento das diferentes raças nos dois grupos. Realizamos, ainda, o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além de sugerir que não houve viés na seleção de indivíduos, essa verificação assegura a qualidade das genotipagens.

Amostras maiores certamente melhorariam a análise, mas a dificuldade na obtenção dos casos, o custo financeiro e a complexidade dos exames laboratoriais precisam ser considerados. A análise dos dados precisa ser cautelosa e os resultados devem ser considerados sugestivos. Além disso, os resultados podem ser diferentes quando se investiga a associação entre diferentes genes (epistasia) ou ainda a interação entre os genótipos materno, paterno e fetal, alternativas que permanecem como possibilidades de pesquisa.

Em estudos de associação genética, a necessidade de grandes amostras, o desconhecimento sobre a função do gene e possíveis *bias* na seleção dos participantes são falhas comuns²⁰. Diante dessas considerações, esses trabalhos precisam sempre ser reproduzidos e confirmados. Mesmo assim, resultados negativos devem ser considerados. Uma opção interessante para validação dos achados seria a elaboração de metanálises.

Apesar de não termos encontrado associação entre os polimorfismos PROGINS e a ocorrência de AER, o estudo dessas e outras variações genéticas permanece como um importante campo de pesquisa na busca da etiologia da perda gestacional. Na medida em que se aprende como as alterações genéticas, associadas aos fatores individuais, participam na determinação da doença, intervenções clínicas efetivas serão disponibilizadas, minimizando a angústia de casais que vivenciam a perda gestacional.

Agradecimentos

Estudo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 06/56312-7.

Referências

1. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2(2):76-83.
2. Szekeres-Bartho J, Balasch J. Progestagen therapy for recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update.* 2008;14(1):27-35.
3. Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ, et al. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. *J Reprod Immunol.* 2010;85(1):25-32.
4. Check JH. A practical approach to the prevention of miscarriage: Part 1 - Progesterone therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2009;36(4):203-8.
5. Scarpin KM, Graham JD, Mote PA, Clarke CL. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl Recept Signal.* 2009;7:e009.

6. Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet.* 1987;77(3):280-2.
7. Kim JJ, Choi YM, Choung SH, Yoon SH, Lee GH, Moon SY. Estrogen receptor beta gene +1730 G/A polymorphism in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010;93(6):1942-7.
8. Aléssio AM, Siqueira LH, de Carvalho EC, Barini R, Mansur AP, Hoehr NF, et al. Estrogen receptor alpha and beta gene polymorphisms are not risk factors for recurrent miscarriage in a Brazilian population. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008;14(2):180-5.
9. Goodman C, Hur J, Goodman CS, Jeyendran RS, Coulam C. Are polymorphisms in the ACE and PAI-1 genes associated with recurrent spontaneous miscarriages? *Am J Reprod Immunol.* 2009;62(6):365-70.
10. Kurz C, Tempfer CB, Boescoer S, Unfried G, Nagele F, Hefler LA. The PROGENS progesterone receptor gene polymorphism and idiopathic recurrent miscarriage. *J Soc Gynecol Investig.* 2001;8(5):295-8.
11. Schweikert A, Rau T, Berkholz A, Allera A, Daufeldt S, Wildt L. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;113(1):67-72.
12. Carvalho CV, D'Amora P, Sato H, Girão MJBC, Lima GR, Silva IDCG, et al. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGENS) em mulheres com endometriose pélvica. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(8):613-7.
13. Gomes MT, Castro RA, Villanova FE, da Silva ID, Baracat EC, de Lima GR, et al. The progesterone receptor gene polymorphism, PROGENS, may be a factor related to the development of uterine fibroids. *Fertil Steril.* 2007;87(5):1116-21.
14. Junqueira MG, da Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Carvalho CV, Leite DB, Gomes MT, et al. Progesterone receptor (PROGENS) polymorphism and the risk of endometrial cancer development. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(1):229-32.
15. Linhares JJ, Silva IDCG, Souza NCN, Noronha EC, Ferraro O, Baracat FF. Polimorfismo do gene do receptor de progesterona (PROGENS) em mulheres com câncer de mama: estudo caso-controle. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(8):473-8.
16. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de Indicadores Sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira 2007 [Internet]. Rio de Janeiro; 2007 [citado 2010 Jan 10]. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/indicadoresminimos/sinteseindicais2007/indic_sociais2007.pdf>
17. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques.* 1991;11(3):298-300, 302.
18. Romano A, Delvoux B, Fischer DC, Groothuis P. The PROGENS polymorphism of the human progesterone receptor diminishes the response to progesterone. *J Mol Endocrinol.* 2007;38(1-2):331-50.
19. Romero R, Kuivaniemi H, Tromp G, Olson J. The design, execution, and interpretation of genetic association studies to decipher complex diseases. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(5):1299-312.
20. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA.* 2008;299(11):1335-44.
21. Bombell S, McGuire W. Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2008;48(2):147-54.
22. Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves-Silva J, Prado VF, Santos FR. Retrato molecular do Brasil. *Ciênc Hoje.* 2000;27(159):16-25.