

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luiza Pretto

ORIENTADOR

Prof. Lucas Rosa Fraga, PhD.

Porto Alegre (RS)

2023

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SENESCÊNCIA CELULAR EM TECIDOS REPRODUTIVOS E SEU IMPACTO NA
GESTAÇÃO: UM ESTUDO DE BIOINFORMÁTICA E GENÉTICA EM PERDAS
GESTACIONAIS RECORRENTES**

LUIZA PRETTO

Orientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre (RS)

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Pretto, Luiza

SENEESCÊNCIA CELULAR EM TECIDOS REPRODUTIVOS E SEU
IMPACTO NA GESTAÇÃO: UM ESTUDO DE BIOINFORMÁTICA E
GENÉTICA EM PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES / Luiza
Pretto. -- 2023.

104 f.

Orientador: Lucas Rosa Fraga.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Reprodução Humana. 2. Genética Médica. I. Fraga,
Lucas Rosa, orient. II. Título.

*“O cientista não é o homem que
fornece as verdadeiras respostas; é
quem faz as verdadeiras perguntas”.*

Claude Lévi-Strauss

AGRADECIMENTOS

Como diz o ditado, “uma andorinha só não faz verão”. Por isso, gostaria de agradecer imensamente:

Aos meus pais, Luiz e Suzana, por incentivarem meus estudos e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus irmãos, Angelo e Luana, por serem meus exemplos profissionais.

Aos meus cunhados, Leonardo e Aline, por se fazerem presentes sempre que necessário.

Aos meus pequenos, Aurora, Bernardo, Antônia, Benício e Noah, por conseguirem meu riso fácil nos dias difíceis.

Aos meus amigos, impossível de nomear a todos, pelo companheirismo e compreensão durante minha trajetória acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Lucas Rosa Fraga, pelos inúmeros ensinamentos teóricos e de vida.

Ao Prof. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela pelas explicações e artigos divididos.

À Profa. Sandra Leistner pela atenção e interesse.

À Profa. Márcia Rosângela Wink, minha orientadora durante a graduação, por me incentivar a ir atrás do que faz meus olhos brilharem independentemente da área de atuação.

À Profa. Mônica Fernandes Rosa de Lima pelo ensino de Embriologia.

Às professoras Adriana Bos-Mikich e Juliana Trevisan da Rocha pelo ensino de Reprodução Humana.

À aluna de iniciação científica Eduarda por vestir a camisa junto comigo.

À Clévia e ao Hugo, da Unidade de Pesquisa Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UPL/HCPA), a Bruna, ao Arthur, a Maria e ao Vinícius, pelos auxílios nos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPG-CM/UFRGS) pela excelência acadêmica.

Ao Grupo de Pesquisa em Biologia Reprodutiva e do Desenvolvimento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (GBRD/UFRGS) e ao Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LMG/HCPA) pela acolhida e trabalho em equipe.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pela estrutura e fomento disponibilizados.

À equipe do Laboratório de Análises Clínicas Carlos Franco Voegeli da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA) por entenderem e cobrirem minhas eventuais ausências.

À todas as pacientes que sofreram perdas gestacionais por acreditarem na pesquisa científica e possibilitarem a realização deste trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Perda gestacional recorrente (RPL, do inglês *Recurrent Pregnancy Loss*) é uma condição reprodutiva adversa que se manifesta em cerca de 1 a 2% dos casais em idade reprodutiva e é caracterizada pela ocorrência de mais de um evento de perda gestacional. A etiologia dessa condição abrange diversos fatores conhecidos, entretanto mais da metade dos casos permanecem idiopáticos. Assim, tratam-se das chamadas perdas gestacionais recorrentes idiopáticas, um desafio para as equipes de saúde em termos de medicina reprodutiva. Senescência celular (CS, do inglês *Cellular Senescence*), por sua vez, é entendida como o momento em que as células perdem a capacidade de se dividir mesmo depois de estimuladas com fatores de crescimento. Este processo fisiológico está presente em diversos contextos orgânicos, inclusive durante a gestação e o desenvolvimento embrionário. Apesar disso, a CS pode estar vinculada a condições reprodutivas adversas, a exemplo das RPL. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre o processo de CS e RPL a partir de revisão de literatura, abordagens de bioinformática e biologia de sistemas e investigação genética em amostras de mulheres com histórico de RPL (casos) e sem histórico de RPL e com, pelo menos, duas gestações a termo (controles). Conjuntamente, a revisão de literatura e as análises de bioinformática indicaram relação entre CS e RPL, uma vez que há estudos que colocam a CS no contexto das RPL e que muitas proteínas envolvidas no processo de CS já foram relacionadas com RPL ou com processos fisiológicos relacionados à esta condição. Dois genes candidatos foram apontados para a análise genética pelas análises *in silico* – *EP300* e *AKT1* – e foram avaliados simultaneamente a outros dois genes-chave para o processo de CS – *CDKN1A* e *CDKN2A*. A frequência das variantes investigadas – rs20551, rs1130233, rs2395655 e rs11515, respectivamente – não diferiu estatisticamente entre casos e controles. Apesar disso propusemos através de nosso estudo algumas hipóteses sobre como o processo de CS e o fenótipo de RPL podem estar relacionados. Entretanto, mais estudos nesta área são necessários para dar continuidade ao entendimento desta relação.

Palavras-chave: Abortamento; Abortamento de repetição; Senescência Celular; Suscetibilidade genética; Bioinformática.

ABSTRACT

Recurrent pregnancy loss (RPL) is an adverse reproductive condition that occurs in approximately 1 to 2% of couples in reproductive age and is characterized by the occurrence of more than one pregnancy loss event. The etiology of this condition encompasses several known factors, however more than half of the cases remain idiopathic. Thus, these are the so-called idiopathic RPL, a challenge for healthcare teams in terms of reproductive medicine. Cellular senescence (CS), in turn, is understood as the moment when cells lose the ability to divide even after being stimulated with growth factors. This physiological process is present in different organic contexts, including during pregnancy and embryonic development. Despite this, CS may be linked to adverse reproductive conditions, such as RPL. In this context, the aim of this study was to investigate the relationship between CS and RPL based on literature review, bioinformatics and systems biology approaches and genetic investigation in samples of women with a history of RPL (case group) and women with no history of RPL and, at least, two successful pregnancies (control group). Together, the literature review and bioinformatics analysis indicated a relationship between CS and RPL, since there are studies that place CS in the context of RPL and that many proteins involved in CS have already been related to RPL or with physiological processes related to this condition. Two candidate genes were identified for genetic evaluation by *in silico* analyses – *EP300* e *AKT1* – and were evaluated simultaneously with two other key-genes for the CS process – *CDKN1A* and *CDKN2A*. The frequency of the investigated variants – rs20551, rs1130233, rs2395655 and rs11515, respectively – was not statistically different between the groups of women who suffered RPL and controls. Despite this, through our study we proposed some hypotheses about how the CS process and the RPL phenotype may be related. However, more studies in this area are necessary to continue understanding this relationship.

Keywords: Miscarriage; Recurrent miscarriage; Abortion; Recurrent abortion; Cellular senescence; Genetic susceptibility; Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O *iceberg* das perdas gestacionais: um panorama dos desfechos das concepções humanas espontâneas.

Figura 2 – *Hallmarks* da senescência celular.

Figura 3 – Efeitos prejudiciais das células senescentes. As células senescentes podem entrepor-se em diversas situações prejudiciais ao organismo.

Figura 4 – Efeitos benéficos das células senescentes.

Figura 5 – Senescência celular mediada pelas vias TP53 e p16-Rb.

Figura 6 – Funções pleiotrópicas do SASP.

Figura 7 – Localização gênica de *CDKN1A* e *CDKN2A*.

Figura 8 – Padrão secretório comum entre os tecidos gestacionais e as células senescentes.

Figura 9 – Marco conceitual.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estratégia de busca empregada na revisão sistematizada da literatura.

Quadro 2 – Fatores de risco e/ou causais para perdas gestacionais recorrentes.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologist
ARF	Quadro de Leitura Alternativa (do inglês <i>Alternative Reading Frame</i>)
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
DDR	Resposta de Dano ao DNA (do inglês <i>DNA Damage Response</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
HCG	Gonadotrofina Coriônica Humana (do inglês <i>Human Chorionic Gonadotropin</i>)
hESCs	Células Estromais Endometriais Humanas (do inglês <i>Human Endometrial Stromal Cells</i>)
IF	Falha de Implantação (do inglês <i>Implantation Failure</i>)
MeSH	Medical Subject Headings
mRNA	RNA mensageiro
<i>MTHFR</i>	Gene Metilenotetrahidrofolato Redutase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK	Células Natural Killer
NVOG	Dutch Society of Obstetrics and Gynecology
PROSPERO	International Prospective Register of Systematic Reviews
RCOG	Royal College of Obstetricians and Gynecologists
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RPL	Perdas Gestacionais Recorrentes (do inglês <i>Recurrent Pregnancy Loss</i>)
SAAF	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide
SAHF	Foci de Heterocromatina Associados à Senescência (do inglês <i>Senescence-associated Heterochromatin Foci</i>)
SASP	Fenótipo Secretor Associado à Senescência (do inglês <i>Senescence-associated Secretory Phenotype</i>)
SC	Senescência Celular (do inglês <i>Cellular Senescence</i>)
SOP	Síndrome dos Ovários Policísticos
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador Beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	14
2.2 Perdas gestacionais.....	17
2.2.1 Epidemiologia das perdas gestacionais.....	17
2.2.2 Perdas gestacionais recorrentes.....	18
2.2.3 Etiologia das perdas gestacionais recorrentes.....	19
2.2.4 Fatores genéticos de risco e/ou causais para perdas gestacionais recorrentes.....	21
2.3 Senescência celular.....	23
2.3.1 Características morfofuncionais de células senescentes.....	23
2.3.2 Indutores e vias de senescência celular.....	26
2.3.3 Genes <i>CDKN1A</i> e <i>CDKN2A</i>	28
2.3.4 Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP).....	29
2.3.5 Senescência celular e reprodução humana.....	30
2.3.6 Senescência celular e perdas gestacionais recorrentes.....	32
3. MARCO CONCEITUAL.....	34
4. JUSTIFICATIVA.....	34
5. OBJETIVOS.....	36
5.1 Objetivo primário	36
5.2 Objetivos secundários.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	38
7. ARTIGOS.....	46
7.1 Artigo de revisão.....	46
7.2 Artigo original.....	46
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
9. PERSPECTIVAS.....	47
10. ANEXOS.....	48
10.1 Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto	48

1. INTRODUÇÃO

Perda gestacional é uma gravidez intrauterina inviável com um saco gestacional vazio ou contendo um embrião ou feto sem atividade cardíaca fetal nas primeiras 24 semanas de gestação. Apesar das perdas gestacionais poderem ocorrer em todos os trimestres, 80% delas se dão no primeiro trimestre (WILCOX *et al.*, 1988; ACOG, 2018; BENDER *et al.*, 2023). A incidência exata dos eventos não é conhecida devido à dificuldade em reconhecer concepções e perdas precoces, mas, em um panorama dos desfechos das concepções humanas espontâneas, estima-se que 70% dessas são perdidas antes do nascimento com vida (LARSEN *et al.*, 2013). Por definição, as perdas gestacionais podem ser isoladas ou recorrentes. Quando recorrentes, são denominadas perdas gestacionais recorrentes (RPL, do inglês *Recurrent Pregnancy Loss*) (BENDER *et al.*, 2023).

RPL é uma condição reprodutiva na qual mais de uma perda gestacional espontânea ocorre (BENDER *et al.*, 2023). A etiologia das RPL abrange diversos fatores conhecidos. Apesar disso, cerca da metade dos casos permanecem idiopáticos. Para contornar essas situações, um leque de possíveis causas não corriqueiramente examinadas se instaura para investigação. Dentre as principais, destacam-se aneuploidias embrionárias, parâmetros seminais, trombofilias adquiridas, formação e remodelamento ineficientes da placenta e membranas fetais, rejeição aloimune e alterações epigenéticas (ARIAS-SOSA *et al.*, 2018). Uma vez que o impacto gerado nos casais que passam por RPL é considerável, esforços estão sendo realizados na comunidade científica para melhor compreensão e manejo dessa condição. Uma abordagem bastante atual é a busca por fatores genéticos de risco e/ou causais, sendo eles cromossômicos ou gênicos e versando as mais diversas vertentes de associação.

A senescência celular (CS, do inglês *Cellular Senescence*) é entendida como o momento em que as células perdem a capacidade de divisão mesmo depois de estimuladas com fatores de crescimento. Esse marco temporal foi postulado em 1965 e é conhecido como Limite de Hayflick (HAYFLICK, 1965). A CS pode ser dividida em senescência replicativa, que ocorre por perda dos telômeros, ou senescência induzida, resultante de estresse celular (KAMAL *et al.*, 2020). Ao ser estabelecida, a CS pode levar a uma mudança de características nas células em que se manifesta. As novas características abrangem desde a parada no ciclo celular até o remodelamento de tamanho, remanejamento da composição da membrana plasmática, modificações no núcleo, aumento do conteúdo lisossomal, alteração no funcionamento metabólico e de vias de sinalização, resistência a apoptose e expressão de um fenótipo secretor característico (LAWLESS *et al.*, 2010; HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2018; GONZALEZ-GUALDA *et al.*, 2021). As células senescentes também apresentam foci de histonas e foci de heterocromatina associados à senescência

(SAHF, do inglês *Senescence-associated Heterochromatin Foci*) (MITSUI e SCHNEIDER, 1976; ZHANG *et al.*, 2005; FUNAMAYA e ISHIKAWA, 2007).

Quando inserida em um contexto tecidual e orgânico, a CS tem papel pleiotrópico antagônico. Ao passo que pode influenciar negativamente a homeostase por causar toxicidade ao organismo com o passar da idade, ela também tem papéis fisiológicos bem definidos, dentre eles a reprodução. Nesse sentido, a presença de células senescentes é reconhecida desde a embriogênese até o parto e essas exercem funções tanto em tecidos reprodutivos quanto nos embriões e fetos. Em centros de sinalização, contribuem para a especificação dos destinos celulares e padronização de tecidos. Em estruturas embrionárias, surgem em relações tempo-espaço bem estabelecidas, realizando suas funções e posteriormente desaparecendo, demonstrando que a indução, a presença e a remoção dessas células são um método celular programado e rigidamente controlado (HE e SHARPLESS, 2017). Outro aspecto importante é a produção do chamado fenótipo secretor associado à senescência (SASP, do inglês *Senescence-Associated Secretory Phenotype*), cujos fatores solúveis liberados por células senescentes são compartilhados, em sua maioria, com o perfil de fatores secretado pelos tecidos gestacionais (MARQUEZ *et al.*, 2017).

Assim sendo, um mecanismo celular que pode estar envolvido com as RPL é a CS, podendo, em alguns contextos, explicar os casos idiopáticos. Células senescentes, como anteriormente citado, estão presentes no útero e nos tecidos fetais e, apesar de não se dividirem, permanecem viáveis, funcionais, influenciando seus microambientes e secretando fatores sinalizadores. Mesmo que haja evidências na literatura demonstrando a relação entre CS e gestação, pouco se sabe sobre como a CS está implicada em falhas reprodutivas, especialmente em RPL. Assim sendo, mais estudos sobre o tema se fazem necessários para investigar com maiores detalhes a relação entre ambos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Uma revisão sistematizada da literatura foi realizada para apresentar os dois temas principais deste projeto: perdas gestacionais recorrentes (RPL) e senescência celular (CS). A base de dados selecionada para a busca foi o PubMed. Para ambos os temas, pesquisou-se por descritores MeSH e termos livres na base de dados MeSH do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Tanto os descritores MeSH quanto os termos livres encontrados foram reunidos para gerar um conceito individual sobre cada tema. Após, os conceitos foram unidos para compor a estratégia de busca que está demonstrada no Quadro 1, abaixo. Como resultado, 37 artigos foram encontrados. Os estudos, então, foram incluídos com

base em seus escopos através da leitura de seus resumos e, posteriormente, textos completos. Ainda, alguns estudos foram incluídos por conveniência, independentemente da estratégia de busca mencionada, através de busca simples no PubMed utilizando os seguintes termos: *pregnancy loss, miscarriage, abortion, recurrent pregnancy loss, recurrent miscarriage, recurrent abortion, unexplained pregnancy loss, unexplained miscarriage, unexplained abortion, idiopathic recurrent pregnancy loss, idiopathic recurrent miscarriage, idiopathic recurrent abortion, cellular senescence, cell senescence, cell ageing, cellular ageing, replicative senescence, senescence-associated secretory phenotype e/ou SASP* e suas variantes gráficas. Diretrizes clínicas referentes ao manejo de casos de RPL também foram incluídas por conveniência dada a importância para a área em investigação.

Conceitos	Termos MeSH	Termos livres	Termos MeSH + termos livres
Recurrent pregnancy loss	Abortion[mh]	Abortion[tw] Recurrent abortion[tw] Miscarriage[tw] Recurrent miscarriage[tw] Early pregnancy loss[tw]	(Abortion[mh] OR Abortion[tw] OR Recurrent abortion[tw] OR Miscarriage[tw] OR Recurrent miscarriage[tw] OR Early pregnancy loss[tw])
Cellular senescence	Cellular senescence[mh]	Cellular senescence[tw] Cell senescence[tw] Cell aging[tw] Cellular ageing[tw] Cellular aging[tw] Replicative senescence[tw] Cell ageing[tw]	(Cellular senescence[mh] OR Cellular senescence[tw] OR Cell senescence[tw] OR Cell aging[tw] OR Cellular ageing[tw] OR Cellular aging[tw] OR Replicative senescence[tw] OR Cell ageing[tw])
Estratégia de busca montada		Resultado	
(Abortion[mh] OR Abortion[tw] OR Recurrent abortion[tw] OR Miscarriage[tw] OR Recurrent miscarriage[tw] OR Early pregnancy loss[tw]) AND (Cellular senescence[mh] OR Cellular senescence[tw] OR Cell senescence[tw] OR Cell aging[tw] OR Cellular ageing[tw] OR Cellular aging[tw] OR Replicative senescence[tw] OR Cell ageing[tw])		37 artigos	

Quadro 1 – Estratégia de busca empregada na revisão sistematizada da literatura.

2.2 Perdas gestacionais

Perda gestacional é definida como o término espontâneo de uma gestação antes que o embrião ou feto atinja a viabilidade, incluindo todos os eventos desde o momento da concepção até as 24 semanas de gestação (ACOG, 2018; BENDER *et al.*, 2023). No primeiro trimestre, os termos “perda gestacional” e “abortamento espontâneo” são usados indistintamente e não há consenso na literatura sobre o uso de cada terminologia (ACOG, 2018). Entretanto, a Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia (ESHRE, *European Society of Human Reproduction and Embryology*) recomenda o uso do termo "perda gestacional" como um termo geral e, por este motivo, este termo será adotado ao longo desta dissertação. Cabe ressaltar que há pelo menos uma revisão sistemática em andamento registrada no PROSPERO, uma base de dados internacional para registros de revisões sistemáticas, que busca entender, dentre outros aspectos, qual é o impacto da definição na prevalência e risco de novos casos (ALLUMALLA *et al.*, dados em revisão).

2.2.1 Epidemiologia das perdas gestacionais

Apesar de ser um desfecho reprodutivo adverso comum, a exata incidência das perdas gestacionais é difícil de ser estimada devido à dificuldade em reconhecer concepções e perdas precoces. Ainda assim, em um panorama geral dos desfechos das concepções humanas espontâneas, estima-se que 70% dessas são perdidas antes do nascimento com vida. A maioria das perdas gestacionais ocorre antes do período menstrual perdido ou da implantação embrionária e, desde que não percebidas pela mulher e/ou pelas equipes de saúde, são denominadas pré-clínicas. Das concepções que evoluem e são clinicamente detectadas, cerca de 10 a 15% são perdidas, porcentagem que pode variar de acordo com o avançar da idade materna (LARSEN *et al.*, 2013; BENDER *et al.*, 2023). A estratificação das perdas gestacionais é visualmente exemplificada no chamado *iceberg* das perdas gestacionais (Figura 1). Apesar das perdas gestacionais poderem acontecer ao longo de toda a gravidez, cerca de 80% delas se dão no primeiro trimestre de gestação (WILCOX *et al.*, 1988; ACOG, 2018).

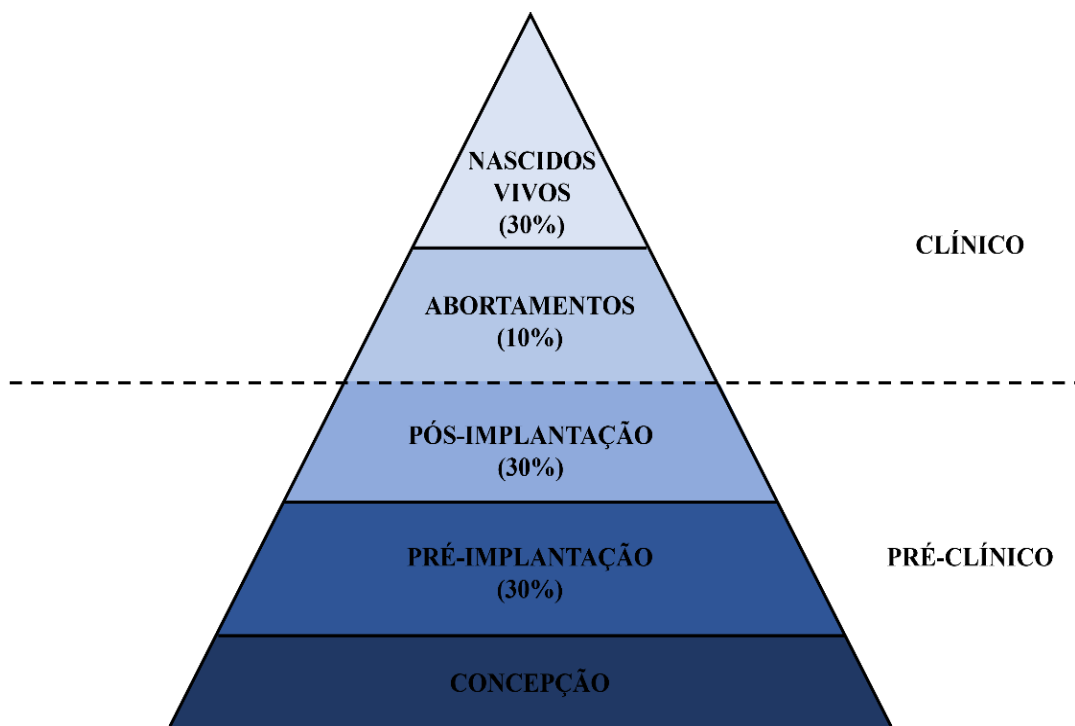


Figura 1 – O iceberg das perdas gestacionais: um panorama dos desfechos das concepções humanas espontâneas. Na analogia do *iceberg*, as perdas gestacionais pré-clínicas estão abaixo da linha da água, ou seja, não são percebidas pela mulher e/ou pelas equipes de saúde. As perdas gestacionais clínicas, por sua vez, estão sobre a superfície. Imagem modificada de *New insights into mechanisms behind miscarriage* (LARSEN *et al.*, 2013).

2.2.2 Perdas gestacionais recorrentes

Perda gestacional recorrente (RPL) é uma condição reprodutiva onde mais de uma perda gestacional espontânea ocorre. Atualmente, não existe consenso sobre o conceito de RPL. Várias diretrizes foram publicadas acerca do tema, mas suas definições variam em relação ao número de perdas gestacionais espontâneas ocorridas e o período gestacional em que as mesmas ocorrem. O Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG, *American College of Obstetricians and Gynecologists*) e a ESHRE definem RPL como duas ou mais perdas gestacionais espontâneas consecutivas. Em contraste, as definições do Colégio Real de Obstetras e Ginecologistas (RCOG, *Royal College of Obstetricians and Gynecologists*), que define RPL como a ocorrência de três ou mais perdas gestacionais espontâneas, e da Sociedade Holandesa de Obstetrícia e Ginecologia (NVOG, *Dutch Society of Obstetrics and Gynecology*), que define RPL como duas ou mais perdas gestacionais espontâneas, não apresentando o termo “consecutiva” em suas definições (ACOG,

2002; RCOG, 2003; JAUNIAUX *et al.*, 2006; NVOG, 2007; VAN DEN BOOGAARD *et al.*, 2010). As RPL podem ser classificadas em primárias, quando nenhuma gestação viável ocorreu anteriormente, e em secundárias, quando há o histórico de pelo menos uma gestação de sucesso, independentemente do número de perdas (BENDER *et al.*, 2023).

Assim como observado nos dados de perdas gestacionais em geral, estudos de epidemiologia em RPL também são difíceis de serem encontrados. Diversas referências disponíveis são antigas e, muitas vezes, podem não representar a atual situação da condição. Apesar disso, a literatura aponta que as RPL se manifestam em cerca de 1 a 2% dos casais em idade reprodutiva, correspondem de 8 a 15% das gestações clinicamente reconhecidas e a aproximadamente 30% de todas as gestações (FORD e SCHUST, 2009; LINNAKAARI *et al.*, 2019; BENDER *et al.*, 2023). Notoriamente, mais estudos populacionais são necessários acerca do tema.

2.2.3 Etiologia das perdas gestacionais recorrentes

A etiologia das RPL abrange diversos fatores de risco e/ou causais conhecidos. Dentre eles, destacam-se principalmente a presença de anormalidades cromossômicas no casal, anomalias anatômicas femininas, infecções de sistema reprodutor, doenças autoimunes e desregulações endócrinas (ARIAS-SOSA *et al.*, 2018). Um resumo dos fatores de risco e/ou causais para RPL pode ser observado no Quadro 2.

FATORES DE RISCO E/OU CAUSAIS PARA PERDAS GESTACIONAIS RECORRENTES
Distúrbios cromossômicos e genéticos
Anormalidades endócrinas Diabetes Disfunções tireoidianas Distúrbios de prolactina SOP Insuficiência de fase lútea Distúrbios androgênicos
Fatores anatômicos Anomalias congênitas Malformações uterinas Miomas Síndrome de Asherman Receptividade endometrial anormal
Distúrbios imunológicos Disfunções tireoidianas Doença celíaca SAAF Síndrome de falha reprodutiva autoimune Positividade para autoanticorpos Distúrbios de células T regulatórias e células NK Aumento da rede de citocinas pró-inflamatórias (imunodistrofismo)
Trombofilias adquiridas Antitrombina Deficiência proteica C Deficiência proteica S Fator II Fator V de Leiden Mutações do gene <i>MTHFR</i> Outras mutações gênicas relacionadas a proteínas da cascata de coagulação
Doenças infecciosas
Fatores diversos Ambientais Exercício físico exacerbado Estresse Anormalidades placentárias Doenças de base Fator masculino Estilo de vida nocivo
Novos fatores de risco e/ou causais Micropartículas derivadas de células circulantes Leptina HCG Glicodelina Receptores de células NK

Quadro 2 – Fatores de risco e/ou causais para perdas gestacionais recorrentes. Modificado de: *Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management* (GIMENEZ e REIG, 2015).

SOP: Síndrome dos Ovários Policísticos; SAAF: Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide; NK: Células *Natural Killer*; *MTHFR*: Gene Metilenotetrahidrofolato Redutase; HCG: Gonadotrofina Coriônica Humana (do inglês *Human Chorionic Gonadotropin*).

A presença de um ou mais fator(es) de risco e/ou causais frente às RPL norteia a investigação para o manejo clínico e prescrição de um tratamento. Entretanto, a falta dela torna a busca pela solução do quadro mais conturbada. Nessa conjuntura, trata-se da manifestação das chamadas RPL idiopáticas. As RPL idiopáticas, que correspondem a cerca de metade dos casos, estão presentes em um grupo extremamente heterogêneo de pacientes. Alguns dos eventos serão atribuídos a uma situação isolada e de melhor prognóstico, enquanto outros serão alusivos a uma doença de base ainda não detectada pelos atuais protocolos de investigação e, conseqüentemente, caracterizam pior prognóstico (SARAVELLOS e REGAN, 2014).

Para contornar essas situações, um leque de possíveis causas se instaura para análise. Dentre as principais, destacam-se a investigação de aneuploidias embrionárias, parâmetros seminais – como fragmentação excessiva do DNA espermático e a presença de microdeleções cromossômicas, trombofilias adquiridas, formação e remodelamento ineficientes da placenta e das membranas fetais, rejeição aloimune e alterações epigenéticas – como o encurtamento telomérico e a inativação assimétrica do cromossomo X (ARIAS-SOSA *et al.*, 2018).

Uma vez que o impacto gerado nos casais que passam por RPL é considerável – cita-se elevado sentimento de culpa e impotência (KOERT *et al.*, 2019) e maior predisposição para ansiedade, depressão e suicídio (VOSS *et al.*, 2020), esforços vêm sendo realizados na comunidade científica para o manejo dessas condições. Além de uma avaliação clínica dos casais com histórico de RPL, a administração de certos medicamentos e estudos em material de aborto fazem parte dos avanços da área (HENKEL e SHAW, 2018). Outra abordagem bastante atual é a busca por fatores genéticos de risco e/ou causais, sendo eles cromossômicos ou gênicos e versando as mais diversas vertentes de associação.

2.2.4 Fatores genéticos de risco e/ou causais para perdas gestacionais recorrentes

Os fatores genéticos de risco e/ou causais para as RPL podem se apresentar, como acima citado, a nível cromossômico e/ou a nível gênico.

A nível cromossômico, estima-se que em aproximadamente 2 a 5% dos casais acometidos por RPL pelo menos um dos parceiros, mais frequentemente a mulher, possui uma anormalidade cromossômica estrutural equilibrada (RCOG, 2011). O

genitor afetado é, portanto, portador equilibrado da anormalidade cromossômica estrutural em questão e não possui desbalanço de carga genética. Entretanto, pode gerar gametas tanto geneticamente normais quanto gametas geneticamente desequilibrados. Dentre as anormalidades cromossômicas estruturais mais comuns estão as translocações, as inversões, as deleções, as duplicações em tandem e os anéis cromossômicos (MORIN *et al.*, 2017; MENGHI *et al.*, 2018; PANDAY *et al.*, 2021). Em mulheres com RPL, as translocações, tanto recíprocas quanto Robertsonianas, são mais comumente observadas.

A nível gênico, a presença de variantes em genes candidatos tem dado pistas sobre os potenciais fatores genéticos relacionados à ocorrência de RPL. Em um estudo de coorte retrospectivo, Berkay e colaboradores (2023) identificaram, com auxílio de análises de bioinformática, 43 variantes em 39 genes candidatos associadas com RPL e/ou falha de implantação (IF, do inglês *Implantation Failure*). Os genes identificados estavam relacionados à implantação, placentação, coagulação, metabolismo, sistema imunológico, desenvolvimento embrionário, ciclo celular e funções ovarianas. Nosso grupo de pesquisa vem, ao longo dos anos, também se dedicando ao estudo de genes candidatos. O gene *TP53* – um supressor tumoral que codifica uma proteína de mesmo nome – e seu regulador *HDM2* (*MDM2*) são exemplos. Fraga e colaboradores (2014) observaram que uma combinação de polimorfismos em *TP53* Arg/Arg (rs1042522) e em *MDM2* TT (rs2279744) eram mais frequentes em mulheres com RPL quando comparada a controles. Recentemente, Bremm e colaboradores (2021) demonstraram que os genes *TDGF1* e *CFC1* podem estar relacionados a RPL. Em contrapartida, a falta de associações também é útil em termos de aplicabilidade clínica. Dutra e colaboradores (2014) estudaram genes relacionados a trombofilia e demonstraram que polimorfismos em *MTHFR* C677T (rs1801133), *FVL* G1691A (rs6025), *FII* G20210A (rs1799963), *eNOS* T-786C (rs2070744) e *eNOS* Glu298Asp (rs1799983) não se associavam com o risco de ocorrência de RPL.

Reiterando a importância do estudo genético nos casos de RPL, a suposição de uma predisposição genética para casos idiopáticos ainda se baseia em três observações: 1) irmãos de pacientes com RPL exibem uma frequência maior de eventos de perdas gestacionais de repetição do que indivíduos controle; 2) o risco de RPL aumenta conforme o número de eventos de perda aumenta; e 3) perdas gestacionais em casais com RPL ocorrem na mesma idade gestacional (90% antes das 12 semanas de gestação) (CHRISTIANSEN *et al.*, 1990; BRIGHAM *et al.*, 1999; ANDERSEN *et al.*, 2000; HEUSER *et al.*, 2010; KOLTE *et al.*, 2011; PEREZA *et al.*, 2017). Assim sendo, faz-se necessário elucidar as circunstâncias envolvidas em RPL,

principalmente nos casos de etiologia não definida, para maior assertividade na terapêutica. Nesse sentido, a busca por marcadores moleculares genéticos parece ser interessante. Por envolver mecanismos complexos e pela porcentagem expressiva de casos sem etiologia definida, a investigação genética de possíveis fatores de risco e/ou causais para RPL é crucial para que sejam identificados genes alvos envolvidos nessa condição reprodutiva.

2.3 Senescência celular

A senescência celular (CS) é compreendida como o momento em que as células perdem a sua capacidade de divisão mesmo após estimuladas com fatores de crescimento. Esse marco temporal foi postulado em 1965 e é conhecido como limite de Hayflick, termo que só foi cunhado por Macfarlane Burnett em 1974 (HAYFLICK, 1965; SHAY e WRIGHT, 2000). Antes da conceituação de CS, assumia-se que todas as células explantadas em cultura eram imortais e que a falta de replicação celular contínua se devia a problemas técnicos durante a experimentação. Essa noção era defendida por Alexis Carrel, cujos trabalhos foram refutados por não serem reprodutíveis, dando luz às ideias de Hayflick na comunidade científica. Como resultado, outros pesquisadores ao redor do mundo começaram a observar o cultivo e a manipulação de células sob uma nova perspectiva, abrindo caminho para o atual estado da arte no campo da biologia celular.

O termo “senescência” remete ao adjetivo “senil”, uma vez que a célula permanece viva, mas não mais se divide. Foi inicialmente atribuída ao encurtamento telomérico e descrita como senescência replicativa (HAYFLICK e MOORHEAD, 1961; HARLEY *et al.*, 1990). Entretanto, a CS pode ser dividida em dois tipos: senescência replicativa, quando decorre de acúmulos de dano ao DNA e encurtamento telomérico, naturais durante o curso do envelhecimento celular; e senescência induzida, quando é estimulada por estressores a componentes celulares (KAMAL *et al.*, 2020).

2.3.1 Características morfofuncionais de células senescentes

A CS pode levar a mudanças de características nas células em que se manifesta. As células senescentes passam a exibir novas particularidades, que abrangem eventos morfológicos, moleculares e a expressão de um fenótipo característico (LAWLESS *et al.*, 2010).

Morfológicamente, há um notório remodelamento celular. As células senescentes reorganizam a composição de membrana plasmática e passam a ser

maiores, mais achatadas e com a exibição de prolongamentos citoplasmáticos (LAWLESS *et al.*, 2010). O núcleo igualmente aumenta de tamanho e passa a apresentar foci de histonas e foci de SAHF (MITSUI e SCHNEIDER, 1976; ZHANG *et al.*, 2005; FUNAMAYA e ISHIKAWA, 2007). O conteúdo lisossomal também aumenta e um fenótipo secretor característico (SASP) é expresso (GONZALEZ-GUALDA *et al.*, 2021). Assim, o novo aspecto assumido pelas células senescentes é conhecido como o resultado da expressão dos *hallmarks* da CS (HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2018) (Figura 2).

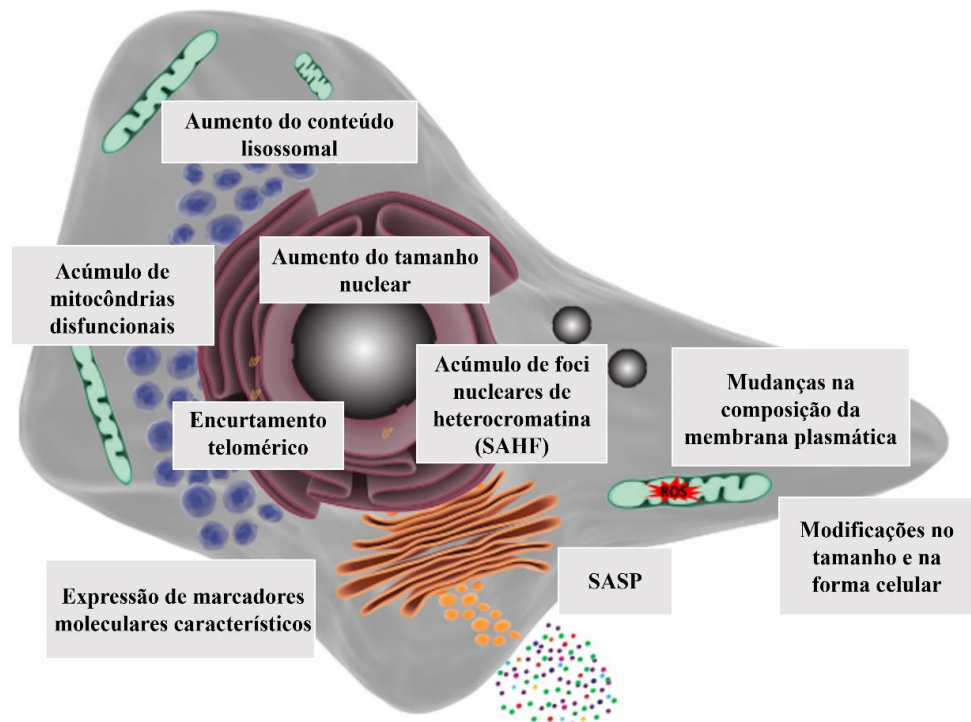


Figura 2 – Hallmarks da senescência celular. As mudanças nas vias moleculares e metabólicas durante o processo de CS resultam em alterações morfológicas nas células, expressas nos chamados Hallmarks da CS. Imagem modificada de: *Hallmarks of cellular senescence* (HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2018).

Molecularmente, um dos principais eventos característicos da CS ocorre na senescência replicativa. Nela, os telômeros, extremidades cromossômicas de 7.000 a 10.000 pares de base de DNA de fita dupla, perdem alguns pares de base a cada divisão celular. Os pares de base perdidos são refeitos pela enzima telomerase, uma DNA polimerase RNA-dependente que produz DNA usando RNA como molde. Entretanto, danos ao DNA e disfunção mitocondrial fazem com que as células parem de sintetizar a telomerase, consequentemente impedindo a reposição dos pares de base perdidos

(RHODES *et al.*, 2002; SOMAN *et al.*, 2022). Ainda, alterações no funcionamento metabólico e de vias são observadas em células senescentes. Entretanto, essas células permanecem metabolicamente ativas e influenciam seus microambientes.

Quando inserida em um contexto tecidual e orgânico, a CS tem papel funcional pleiotrópico antagônico. Ao passo que pode influenciar negativamente a homeostase (Figura 3) por causar toxicidade ao organismo com o passar da idade – manifestando-se como uma diminuição da capacidade do mesmo de se recuperar de agressões e com aumento da suscetibilidade a certas doenças –, ela também tem papel fisiológico benéfico bem definido (HE e SHARPLESS, 2017). A CS propicia uma incidência reduzida de câncer e outras doenças caracterizadas pelo excesso de proliferação celular, bem como aprimora a cicatrização de feridas e o controle de infecções, além de ser de extrema relevância durante a embriogênese e desenvolvimento embrionário (Figura 4) (HE e SHARPLESS, 2017). Frente ao exposto e levando em consideração o entendimento do processo de CS estudado há tantos anos, uma questão permanece em aberto na comunidade científica: por que a natureza reteria a CS se esse processo também é deletério para o organismo? Uma possível hipótese é que os efeitos positivos das células senescentes superariam os efeitos negativos (VELARDE e MENON, 2016).

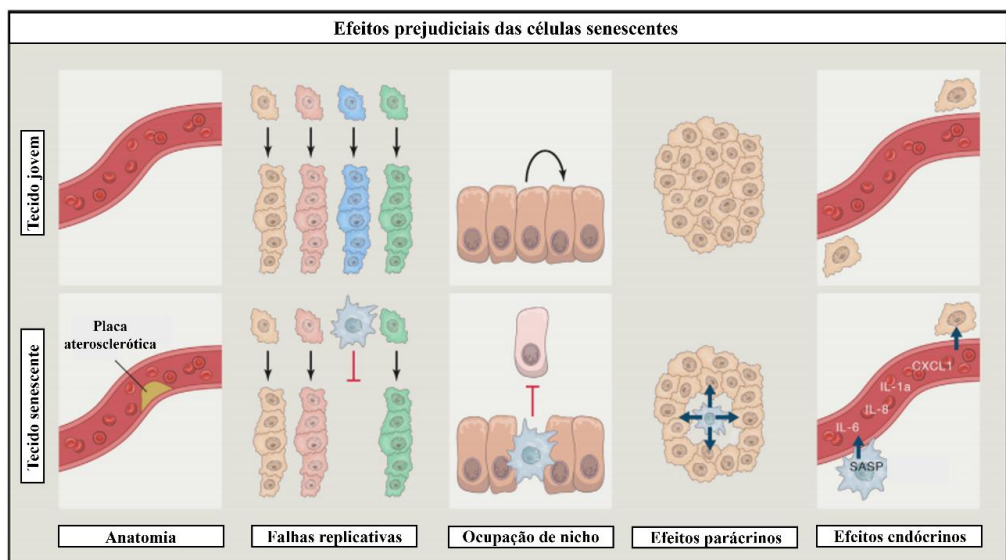


Figura 3 – Efeitos prejudiciais das células senescentes. As células senescentes podem entropor-se em diversas situações prejudiciais ao organismo. Como exemplificado: em barreiras anatômicas, como agregados celulares em placas ateroscleróticas (Painel 1); em falhas replicativas, por perda da capacidade de realizar mitoses (Painel 2); na ocupação de nichos espaciais de outras células (Painel 3); e na mediação de efeitos parácrinos (Painel 4) e endócrinos deletérios (Painel 5). Na

imagem, as células senescentes estão ilustradas em azul (cor fantasia). Imagem modificada de: *Senescence in health and disease* (HE e SHARPLESS, 2017).

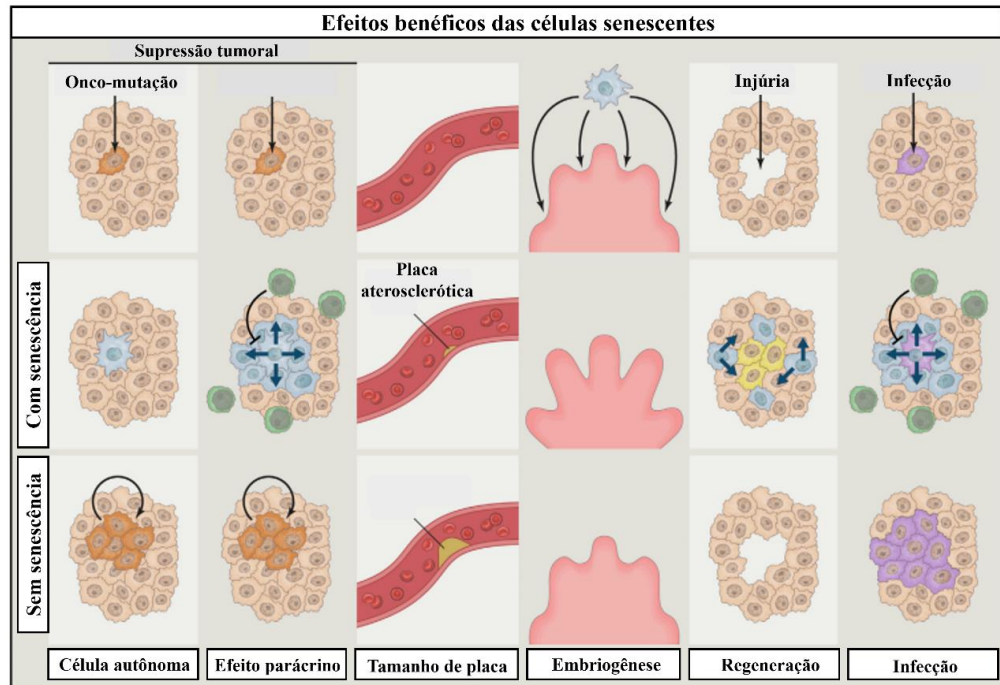


Figura 4 – Efeitos benéficos das células senescentes. Concomitantemente, as células senescentes estão relacionadas positivamente com o organismo. Como exemplificado: com a supressão tumoral, de uma maneira intrínseca à célula e com possível aumento da imunidade antitumoral local (Painéis 1 e 2); com a redução do tamanho das placas ateroscleróticas, por ativação do gene *CDKN2A* (Painel 3); na embriogênese, controlando a população celular (Painel 4); na regeneração de feridas (Painel 5) e no controle de infecções, por meio de efeitos parácrinos (Painel 6). Imagem modificada de: *Senescence in health and disease* (HE e SHARPLESS, 2017).

2.3.2 Indutores e vias de senescência celular

Como anteriormente citado, a CS pode resultar da perda de telômeros e do estresse celular. O estresse celular, por sua vez, pode ser induzido por uma gama de fatores intrínsecos e extrínsecos à célula, incluindo: ativação oncogênica, estresses oxidativo e genotóxico, disfunção mitocondrial, irradiação e ação de agentes quimioterápicos (KUILMAN *et al.*, 2010; HERRANZ e GIL, 2018). Em resposta a níveis críticos de danos de qualquer natureza, uma célula passa por diversos eventos moleculares durante a entrada em CS. Esses eventos moleculares podem ser desencadeados em paralelo ou podem causar a estagnação no ciclo celular de maneira

independente. As principais vias que estabelecem e mantêm a CS são mediadas pela proteína TP53 e pelo complexo p16-Rb (Figura 5; apresentadas em detalhes na seção 7.1). Ambas as vias são intimamente relacionadas, uma vez que interagem entre si e regulam-se mutuamente. Apesar disso, a propensão de uma célula a engajar-se em uma ou outra via é célula e espécie-específico (CAMPISI e D’ADDA DI FAGAGNA, 2007).

O processo de entrada em CS mediado por essas vias é entendido como o ramo intrínseco da CS. Embora a maioria das células senescentes se engajem com as vias mencionadas, há exemplos de células que entram em CS independentemente delas (CAMPISI e D’ADDA DI FAGAGNA, 2007). Nesse sentido, entra em voga, dentre outros, o ramo extrínseco da CS, que é mediado por SASP (RHINN *et al.*, 2019).

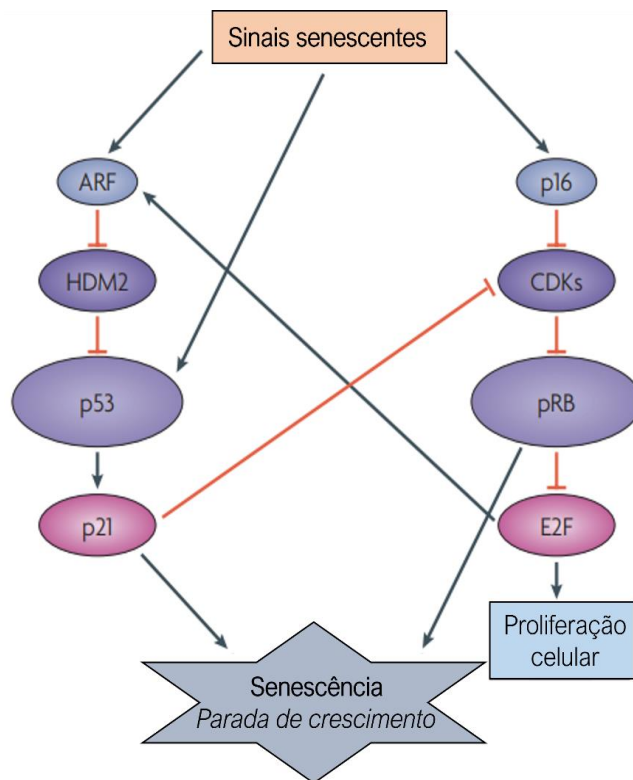


Figura 5 – Senescência celular mediada pelas vias TP53 e p16-Rb. Sinais indutores de CS geralmente envolvem as vias TP53 (na figura nomeado como p53) e/ou p16-Rb. A via mediada por TP53 pode ser induzida por DDR (não demonstrado na figura) ou p14^{ARF}. Quando induzida por p14^{ARF}, a ativação de TP53 ocorre através da inibição de HDM2, uma vez que este induz sua degradação. Uma vez estabilizado, TP53 aumenta a transcrição de *CDKN1A*, gene codificador da proteína p21, uma inibidora universal do ciclo celular. Na via mediada por p16-Rb, há inibição de CDKs, que possuem função inibitória sobre Rb (na figura nomeado como pRB). Com a função inibitória inativada, Rb liga-se a E2F e reprime sua atividade transcricional, inibindo assim a

progressão do ciclo celular. Imagem modificada de *Cellular senescence: when bad things happen to good cells* (CAMPISI e D'ADDA DI FAGAGNA, 2007).

2.3.3 Genes *CDKN1A* e *CDKN2A*

Os genes *CDKN1A* e *CDKN2A* possuem papel fundamental na CS por atuarem, respectivamente, na parada e na manutenção da parada do ciclo celular (HERNANDEZ-SEGURA *et al.*, 2018).

O gene *CDKN1A* se encontra no braço curto do cromossomo 6, mais especificamente em sua fita de sentido direto (Figura 7), e codifica uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina: p21. Esta proteína se liga e inibe a atividade dos complexos quinase 2 dependente de ciclina (CDK2) ou quinase 4 dependente de ciclina (CDK4) e, portanto, funciona como uma inibidora da progressão do ciclo celular na fase G1. A expressão de *CDKN1A* é rigidamente controlada pela proteína TP53, que medeia a parada do ciclo celular em resposta a uma variedade de estímulos estressores (ENGELAND, 2022). p21 também interage com o antígeno nuclear da célula em proliferação, um fator acessório da DNA polimerase, e desempenha um papel regulador na replicação do DNA na fase S e no reparo de danos ao DNA (ENGELAND, 2022).

O gene *CDKN2A*, por sua vez, se encontra na fita de sentido reverso do braço curto do cromossomo 9 (Figura 7) e possui diversos transcritos que diferem em seus primeiros éxons. Pelo menos três variantes de *splicing* alternativo que codificam proteínas distintas foram relatadas. As proteínas p16 e p14^{Arf} são codificadas pelo gene, por exemplo. Apesar das diferenças estruturais e funcionais, as proteínas codificadas por *CDKN2A* compartilham uma funcionalidade comum no controle do ciclo celular na fase G1 (LI *et al.*, 2011; GONZALEZ-GUALDA *et al.*, 2021).

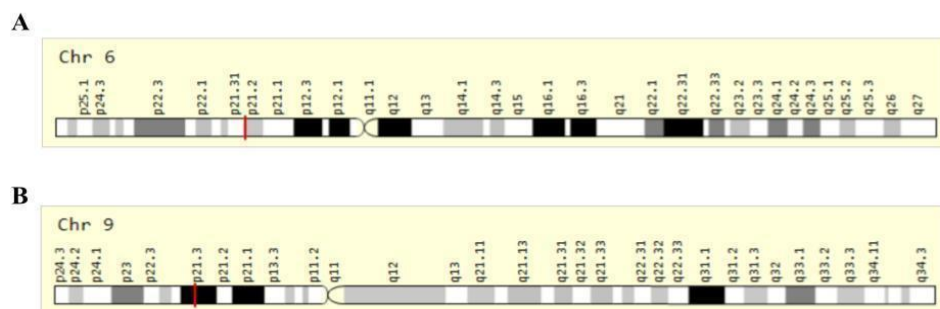


Figura 7 - Localização gênica de *CDKN1A* e *CDKN2A*. A: *CDKN1A*. B: *CDKN2A*. Imagens retiradas do site GeneCards (STELZER *et al.*, 2016; SAFRAN *et al.*, 2022), acesso em 19/08/2023.

2.3.4 Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP)

Uma célula secreta moléculas constantemente em seu ambiente extracelular circundante. O perfil das moléculas secretadas, por sua vez, pode ser alterado a depender do contexto orgânico em que essa célula está inserida. Nesse sentido, o secretoma de células senescentes foi estudado, caracterizado e resumido no que hoje chamamos de SASP.

O SASP é composto por moléculas solúveis, insolúveis e vesículas extracelulares. Vale ressaltar que apesar de um subconjunto de proteínas estarem elevadas em todos os secretomas de células senescentes, nem todo SASP é igual (BASISTY *et al.*, 2020). A plasticidade do SASP é caracterizada pela secreção de fatores em momentos diferentes dependendo do tipo de célula (GIROUD *et al.*, 2023) e está intimamente relacionada à sua regulação, tornando-o dinâmico e heterogêneo. A regulação do SASP envolve processos transcricionais, pós-transcricionais, epigenéticos e mecanismos translacionais, além do tráfego intracelular (GIROUD *et al.*, 2023).

Em termos funcionais, a secreção de SASP pode, entre outros aspectos, influenciar as células vizinhas à célula secretora a se comprometerem com o processo de CS (CS secundária) (BIRCH e GIL, 2020). Ainda, o SASP está presente em quase todas as atuações da SC (Figura 6) e vem sendo estudado como alvo terapêutico para as doenças por ela permeada, cita-se: câncer, aterosclerose, osteoporose, envelhecimento da pele, etc.

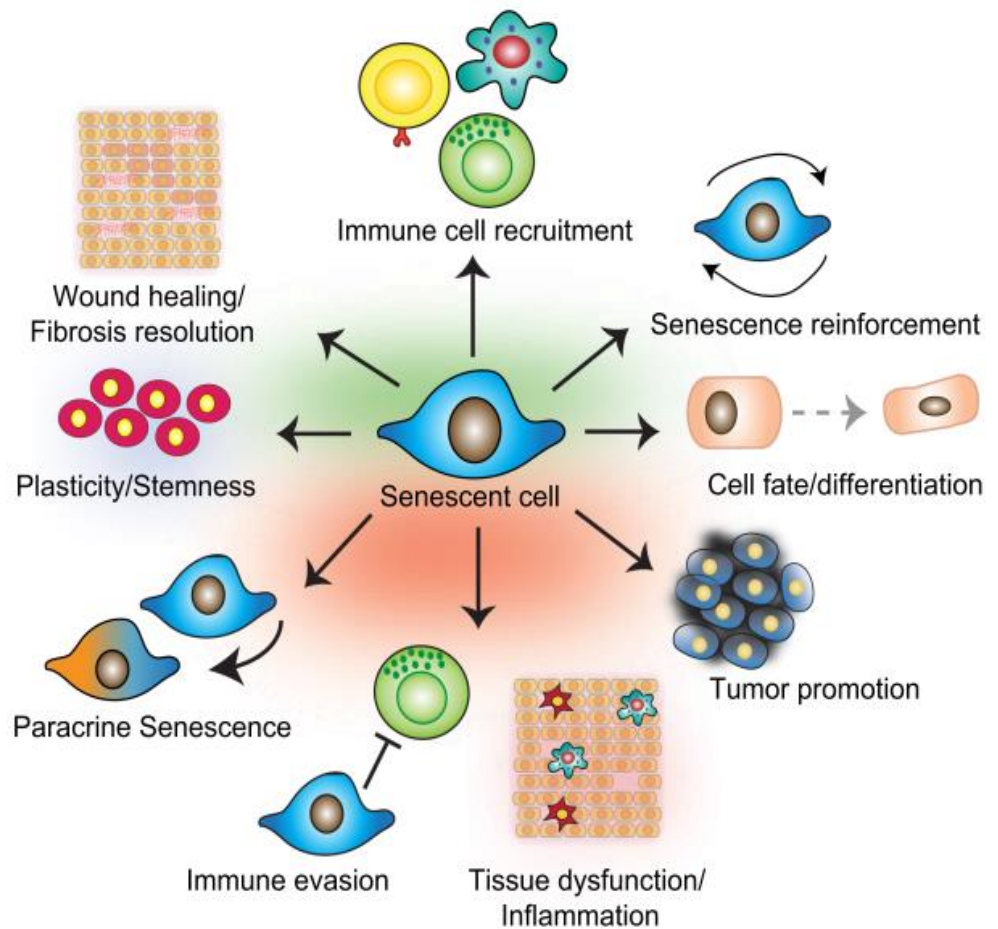


Figura 6 - Funções pleiotrópicas do SASP. Os efeitos exercidos por células senescentes (no meio) mediados pelo SASP envolvem aqueles considerados benéficos (parte superior, em verde) e aqueles que refletem alguma consequência prejudicial (parte inferior, em vermelho). Imagem retirada de *Senescence and the SASP: many therapeutic avenues* (BIRCH e GIL, 2020).

2.3.5 Senescência celular e reprodução humana

A CS está intimamente relacionada a diversos processos fisiológicos humanos, dentre eles a gestação. A presença de células senescentes e suas respectivas funções são reconhecidas durante todo o desenvolvimento. Dessa maneira, entende-se a CS como curso importante para a reprodução humana.

Diferentemente das vias clássicas que uma célula perpassa durante o processo de CS replicativa ou induzida, outro caminho parece ser seguido durante a embriogênese (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013). Na chamada senescência do desenvolvimento, a indução de p21, parte final das vias mediadas por TP53 e p16-Rb, é alcançada através das vias TGF- β /SMAD e PI3K/FoxO

(ARAVINTHAN, 2015; RHINN *et al.*, 2019). A saber, o TGF- β tem demonstrado orquestrar vários processos celulares, incluindo crescimento, diferenciação e migração celular e invasão e remodelação da matriz extracelular (TZAVLAKI e MOUSTAKAS, 2020). PI3K, por sua vez, é uma família de enzimas envolvidas em proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevivência e mobilidade celular, assim como FoxO, a quem ainda se atribui importância para o desenvolvimento embrionário.

Células senescentes são encontradas e exercem papéis tanto em tecidos reprodutivos quanto em embriões e fetos. Em centros de sinalização, as células senescentes contribuem para a especificação dos destinos celulares e padronização dos tecidos (RHINN *et al.*, 2019). Em estruturas embrionárias, surgem em relações tempo-espaço bem estabelecidas, realizando suas funções e posteriormente desaparecendo, demonstrando que a indução, a presença e a remoção dessas células são um método celular programado e rigidamente controlado (RHINN *et al.*, 2019).

Exemplos da atuação das células senescentes no contexto da gestação e do desenvolvimento são: 1) participação na fusão do sinciotrofoblasto através da ativação de inibidores da ciclina quinase, como p21 ou p16; 2) placentação adequada; 3) manutenção de um número celular adequado entre as diferentes populações celulares embrionárias; 4) eliminação de certas estruturas embrionárias, como as membranas interdigitais (VELARDE e MENON, 2016; CINDROVA-DAVIES *et al.*, 2018). Todos esses eventos são mediados pela CS e, muitas vezes, pela ação de fatores solúveis contidos no SASP.

Os fatores solúveis secretados por células senescentes circulantes são compartilhados, em sua maioria, com o perfil de fatores secretado pelos tecidos gestacionais – que incluem embrião, decídua, placenta, âmnio e córion (Figura 8) (MARQUEZ *et al.*, 2017). Assim, propõe-se que os componentes de SASP possam dar suporte ao desenvolvimento inicial do embrião, criando um ambiente que promova o adequado desenvolvimento da placenta e a remodelação vascular (MARQUEZ *et al.*, 2017).

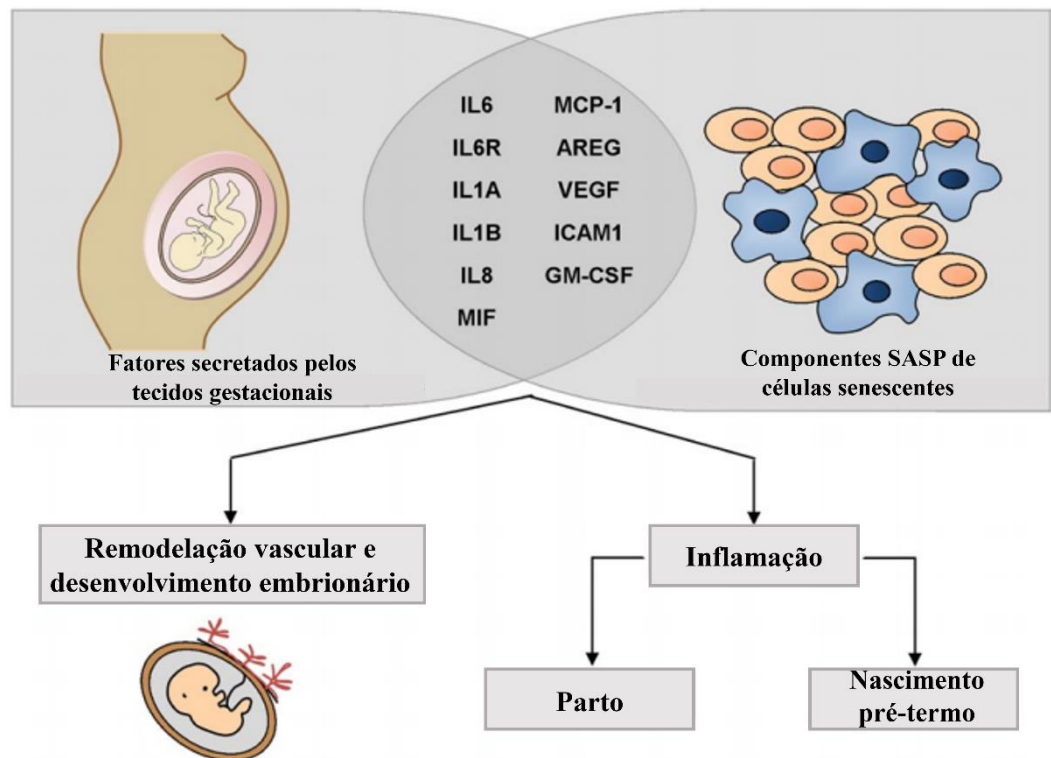


Figura 8 – Padrão secretório comum entre os tecidos gestacionais e as células senescentes. Os tecidos gestacionais e as células senescentes secretam fatores solúveis comuns durante a gestação. Tal fato corrobora a hipótese de que as células senescentes são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário e remodelação vascular e, posteriormente, para o parto. Imagem modificada de *The female reproduction and senescence nexus* (MARQUEZ *et al.*, 2017).

Entretanto, com o avanço da idade gestacional, as células senescentes presentes nas membranas fetais, na placenta e no útero passam a expressar níveis de SASP capazes de iniciar uma resposta de parto induzida por inflamação. Embora esse acontecimento seja fisiologicamente necessário, um número excessivo de células senescentes pode resultar em partos prematuros. Isso sugere que a regulação da presença de células senescentes e da secreção de SASP é importante para que o balanço necessário para o sucesso gestacional supere os desfechos reprodutivos adversos (MARQUEZ *et al.*, 2017; MENON, 2019).

2.3.6 Senescência celular e perdas gestacionais recorrentes

Um mecanismo celular que pode estar por trás de uma fração das RPL de causa idiopática é a CS, especialmente quando presente em tecidos reprodutivos. Células senescentes, como anteriormente citado, estão presentes no útero e nos tecidos fetais

e, apesar de não se dividirem, permanecem viáveis e funcionais, influenciando seus microambientes e secretando fatores sinalizadores.

Nesse sentido, o entendimento do processo de CS em falhas reprodutivas, em especial as RPL, parece ser interessante. Estudos recentes na área evidenciam relações entre os dois processos. Como anteriormente mencionado, Parvanov e colaboradores (2021) demonstraram que mulheres com histórico de RPL e com populações reduzidas de células p16-positivas no epitélio glandular e luminal do endométrio podem estar em maior risco de implantação malsucedida e perda gestacional espontânea. Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que a interação de determinados genótipos de *TP53* (Arg/Arg; rs1042522) e *HDM2* (TT; rs2279744) se mostrou associada às RPL, aumentando o risco para esta condição (FRAGA *et al.*, 2014). Ainda, Lucas e colaboradores (2020) demonstraram que uma resposta decidual pró-senescente está associada a RPL durante a janela pré-implantacional; e Tang e colaboradores (2021) que placentas de gestações que evoluíram para perda gestacional tem aumento de CS e de produção de espécies reativas de oxigênio.

Não obstante, diversos estudos já relacionaram *CDKN1A* e *CDKN2A* – genes clássicos no processo de CS – e as respectivas proteínas que eles codificam com RPL. Os níveis de mRNA de *CDKN1A*, por exemplo, se mostraram elevados em placentas e células deciduais de pacientes acometidas por RPL quando comparadas a controles (SHANG *et al.*, 2013; LV *et al.*, 2016). Do mesmo modo, uma maior expressão de mRNA de *CDKN1A* e *CDKN2A* e de genes que codificam proteínas pertencentes ao SASP foi observada em células estromais endometriais humanas (hESCs) de pacientes não receptivas à implantação embrionária em um estudo conduzido por Tomari e colaboradores (2020). Quanto às proteínas, Sun e colaboradores (2020) demonstraram que o acúmulo de p21 participa da patogênese das RPL regulando a proliferação e a diferenciação de células trofoblásticas, e Parvanov e colaboradores (2021) demonstraram que mulheres com histórico de RPL e com populações reduzidas de células p16-positivas no epitélio glandular e luminal do endométrio podem estar em maior risco de implantação malsucedida e perda gestacional espontânea.

Assim sendo, a literatura apresenta evidências da relação entre CS e RPL. Entretanto, mais estudos sobre o tema se fazem necessários para investigar com maiores detalhes a relação entre o processo celular e o fenótipo em questão, incluindo estudos com avaliação em genes codificantes de proteínas envolvidas com a CS.

3. MARCO CONCEITUAL

Como anteriormente mencionado, cerca de 50% dos eventos de RPL possuem causa definida. Nesses casos, a conduta clínica varia de acordo com a doença de base apresentada pela paciente. Entretanto, o tratamento para os eventos em si é, em um primeiro momento, fundamentado no uso de medicações, evacuação cirúrgica ou aguardo da conduta expectante do material de aborto.

Por ser uma condição reprodutiva adversa, complexa e que caracteriza um desafio para a medicina reprodutiva, a outra metade dos casos de RPL permanece inexplicada. Assim sendo, a continuidade dos estudos na área se faz fundamental tanto para responder aos casos idiopáticos quanto para prevenir novos episódios. Como exemplificado na Figura 9, a medicina baseada em evidências e individualizada veio para somar nessa conjuntura. Nesse sentido, a busca por novos alvos moleculares é fundamental. A CS pode ser um processo celular que permeia os casos de RPL por estar envolvida durante a gestação e o desenvolvimento embrionário, além de apresentar um secretoma comum àquele secretado pelos tecidos reprodutivos.

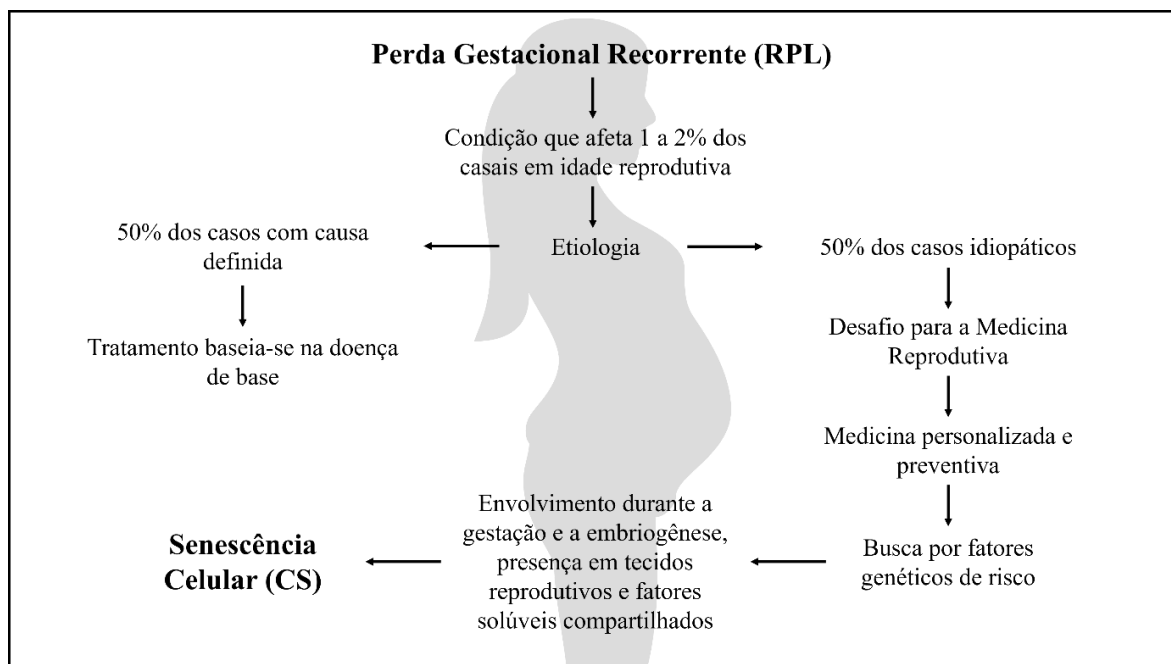


Figura 9 – Marco conceitual.

4. JUSTIFICATIVA

As RPL são encaradas como um desafio para a Medicina Reprodutiva. Quando encaixadas em um panorama socioeconômico, são responsáveis por danos físicos e psicológicos nos indivíduos acometidos e impactam diretamente os sistemas de saúde. Em termos de agravos físicos, diferentes

desfechos obstétricos prejudiciais estão relacionados com perdas gestacionais prévias. Parto prematuro, placentação anormal, restrição de crescimento fetal e complicações perinatais, possivelmente decorrentes de danos após repetidas curetagens e de alterações reprodutivas inerentes à mulher com diagnóstico de RPL, são exemplos (QUENBY *et al.*, 2021). Na esfera psicológica, tanto o aumento da frequência ou o agravamento de casos de estresse, ansiedade e/ou depressão quanto uma maior predisposição para suicídio são observados nos casais que experenciam perdas gestacionais (VOSS *et al.*, 2020; ISSAKHANOVA *et al.*, 2023). A falta de compreensão dos eventos por parte destes casais leva a um sentimento de culpa e impotência nos mesmos, impactando negativamente a busca por suporte e alternativas de prevenção e tratamento (KOERT *et al.*, 2019).

Em termos de saúde pública, as RPL também impactam financeiramente os indivíduos acometidos e os sistemas de saúde. Intrínseco a falta de estudos acerca do tema, as estimativas variam de acordo com cada país e envolvem tanto a exacerbação de procedimentos médicos – como cirurgias, tratamentos e atendimento psicológico – quanto a perda de produtividade no trabalho (QUENBY *et al.*, 2021). Para fins de exemplificação, uma conduta expectante do material de aborto pode custar de £380 (estudo norte-americano) a £1067 (estudo chinês), o que corresponde a R\$2.500 – R\$7.000. Caso a indicação for cirúrgica, geralmente curetagem, os custos podem variar de £455 (estudo da finlandês) a £2.242 (estudo espanhol), correspondendo a R\$2.800 – R\$14.000 (YOU *et al.*, 2005; NIINIMÄKI *et al.*, 2009; DALTON *et al.*, 2015; NAVA *et al.*, 2019). Cabe ressaltar que os poucos serviços de Reprodução Humana embutidos no Sistema Único de Saúde (SUS) não conseguem dar vazão ao crescente número de indivíduos que buscam por eles, restando a rede privada, muitas vezes financeiramente inacessível, como alternativa.

O número de casais que buscam por serviços de Reprodução Humana Assistida cresce a cada ano, indicando uma maior dificuldade na concepção espontânea. No Brasil, em 2019, houve crescimento de 2% nos ciclos de fertilização *in vitro* se comparado ao ano anterior (ANVISA, 2020). Tal fato fundamenta-se, em parte, na postergação da gestação pelas mulheres e ratifica a alocação das perdas gestacionais em um contexto muito além da dificuldade de engravidar e gestar por si só. As transformações experienciadas pela sociedade ao longo das últimas décadas impactam diretamente as ciências da saúde, a exemplo do cenário em que as RPL se encontram.

Apesar de diversas ferramentas estarem disponíveis para contornar condições como as RPL, faz-se necessário o pleno entendimento dos mecanismos para proposição de novos tratamentos. É sabido que os métodos atuais de investigação podem não ser capazes de elucidar em sua totalidade a causa das RPL. Entretanto, uma abordagem que vem se consolidando com o passar dos anos é a medicina personalizada, na qual o manejo da condição clínica se dá, entre outros, a partir das características genéticas do paciente. Nesse contexto, análises genéticas estudando genes candidatos para investigação de questões reprodutivas se fazem presentes. Apesar de atualmente a pesquisa por variantes gênicas abordar inúmeros genes de interesse reprodutivo, a investigação genética é

imensurável e pode ser aprimorada. Um potencial aprimoramento está no estudo de genes relacionados à CS.

Como descrito acima, a CS é fisiologicamente fundamental, inclusive durante a gravidez. Todavia, existem lacunas de conhecimento sobre o comportamento deste processo ao longo da gestação e em episódios de RPL. Nesse sentido, ao investigar a relação entre CS e RPL e esclarecer os mecanismos envolvidos, genes candidatos de valor preditivo dentro do contexto de CS poderão ser elencados e, futuramente, compor a lista de genes investigados pelas equipes assistentes em casos de RPL.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Avaliar a relação da senescência celular com as perdas gestacionais recorrentes através de ferramentas de bioinformática, biologia de sistemas e avaliação genética em uma amostra de mulheres com histórico de perdas gestacionais recorrentes e controles.

5.2 Objetivos secundários

- I. Revisar a presença e/ou participação da senescência celular ao longo de todo o processo reprodutivo através de revisão narrativa de literatura;
- II. Investigar genes envolvidos no processo de senescência celular através de pesquisa em banco de dados públicos e de revisão de literatura;
- III. Investigar genes envolvidos nas perdas gestacionais recorrentes através de pesquisa em banco de dados públicos e de revisão de literatura;
- IV. Identificar, dentre os genes envolvidos no processo de senescência celular, os que são comuns às perdas gestacionais recorrentes e/ou estão potencialmente envolvidos em processos reprodutivos através de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas;
- V. Selecionar, dentre os genes identificados, aqueles que possuem possível impacto na susceptibilidade às perdas gestacionais recorrentes;
- VI. Analisar e comparar a frequência das variantes nos genes selecionados em uma amostra de mulheres com perdas gestacionais recorrentes e de mulheres sem história prévia de perda gestacional ou infertilidade;

- VII. Analisar e comparar a frequência de variantes nos genes *CDKN1A* e *CDKN2A* em uma amostra de mulheres com perdas gestacionais recorrentes e de mulheres sem história prévia de perda gestacional ou infertilidade.

6. REFERÊNCIAS

ALLUMALLA, S.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S. **Definition of recurrent miscarriage and its impact on prevalence and management- a systematic review.** PROSPERO 2020 CRD42020186035. Disponível em: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42020186035. Acesso em 10/09/2023.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG). **ACOG Practice Bulletin Number 200: Early Pregnancy Loss.** *Obstet Gynecol*, v. 132, n. 5, p. e197-e207, 2018.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG). **ACOG Practice Bulletin Number 24: Management of Recurrent Pregnancy Loss.** *Int J Gynaecol Obstet*, v. 78, n. 2, p. 179-190, 2002.

ANDERSEN, A.M. N.; WOHLFAHRT, J; CHRISTENS, P.; OLSEN, J.; MELBYE, M. **Maternal age and fetal loss: population based register linkage study.** *BMJ*, v. 320, n. 7251, p. 1708-1712, 2000.

ANVISA. **13º Relatório do Sistema Nacional de Procução de Embriões – SisEmbrio.** 2020. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiOTVjMDYxOGMtMmNlYy00MjQ3LTg3Y2ltYTAxYTQ4NTkxYjFkIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWZjZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9&pageName=ReportSection770f72a0cca27de07030>. Acesso em 14/08/2023.

ARAVINTHAN, A. **Cellular senescence: a hitchhiker's guide.** *Human Cell*, v. 28, n. 2, p. 51-64, 2015.

ARIAS-SOSA, L. A.; ACOSTA, I. D.; LUCENA-QUEVEDO, E.; MORENO-ORTIZ, H.; ESTEBAN-PÉREZ, C.; FORERO-CASTRO, M. **Genetic and epigenetic variations associated with idiopathic recurrent pregnancy loss.** *J Assist Reprod Genet*, v. 35, n. 3, p. 355-366, 2018.

BASISTY, N.; KALE, A.; JEON, O. H.; KUEHNEMANN, C.; PAYNE, T.; RAO, C.; *et al.* **A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development.** *PLoS Biol*, v. 18, n. 1, p. e3000599, 2020.

BENDER, R. A.; CHRISTIANSEN, O. B.; ELSON, J.; KOLTE A. M.; LEWIS, S.; MIDDELDORP S.; *et al.* **Recurrent Pregnancy Loss - Guideline of European Society of Human Reproduction and Embryology.** *Hum Reprod Open*, v. 2023, n. 1, p. hoad002, 2023.

BERKAY, E. G.; ŞOROĞLU, C. V.; KALAYCI, T.; UYGUNER, Z. O.; AKÇAPINAR, G. B.; BAŞARAN, S. **A new enrichment approach for candidate gene detection in unexplained recurrent pregnancy loss and implantation failure.** Mol Genet Genomics, v. 298, n. 1, p. 253-272, 2023.

BIRCH, J.; GIL, J. **Senescence and the SASP: many therapeutic avenues.** Genes Dev, v. 34, n. 23-24, p. 1565-1576, 2020.

BREMM, J. M.; BOQUETT, J. A.; MICHELS, M. S.; KOWALSKI, T. W.; GOMES, F. G.; VIANNA, F. S. L.; *et al.* **Investigating the role of EGF-CFC gene family in recurrent pregnancy loss through bioinformatics and molecular approaches.** Syst Biol Reprod Med, p. 1-13, 2021.

BRIGHAM, S. A.; CONLON, C.; FARQUHARSON, R. G. **A longitudinal study of pregnancy outcome following idiopathic recurrent miscarriage.** Human Reprod, v. 14, n. 11, 2868-2871, 1999.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. **Cellular senescence: When bad things happen to good cells.** Nat Rev Mol Cell Biol, v. 8, n. 9, p. 729-740, 2007.

CHRISTIANSEN, O. B.; MATHIESEN, O.; LAURTISEN, J. G.; GRUNNET, N. **Idiopathic Recurrent Spontaneous Abortion: Evidence of a Familial Predisposition.** Acta Obstet Gynecol Scand, v. 69, n. 7-8, p. 597-601, 1990.

CINDROVA-DAVIES, T.; FOGARTY, N. M. E.; JONES, C. J. P.; KINGDOM, J.; BURTON, G. J. **Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas.** Placenta, v. 68, p. 15-22, 2018.

DALTON, V. K.; LIANG, A.; HUTTON, D. W.; ZOCHOWSKI, M. K.; FENDRICK, A. M. **Beyond usual care: the economic consequences of expanding treatment options in early pregnancy loss.** Am J Obstet Gynecol, v. 212, n. 2, p. 177.e1-177.e6, 2015.

DUTCH SOCIETY OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY (NVOG). **Guideline: Recurrent Miscarriage.** Utrecht, The Netherlands, 2007.

DUTRA, C. G.; FRAGA, L. R.; NACUL, A. P.; PASSOS, E. P.; GONÇALVES, R. O.; NUNES, O. L.; *et al.* **Lack of association between thrombophilic gene variants and recurrent pregnancy loss.** Human Fertil, v. 17, n. 2, p. 99-105, 2014.

ENGELAND, K. **Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling.** Cell Death Differ, v. 29, n. 5, p. 946-960, 2022.

- FORD, H. B.; SCHUST, D. J. **Recurrent Pregnancy Loss: Etiology, Diagnosis, and Therapy.** Rev Obstet Gynecol, v. 2, n. 2, p. 76-83, 2009.
- FRAGA, L. R.; DUTRA, C. G.; BOQUETT, J. A.; VIANNA, F. S. L.; GONÇALVES, R. O.; SANSEVERINO, M. T. V.; *et al.* **p53 signaling pathway polymorphisms associated to recurrent pregnancy loss.** Mol Biol Rep, v. 41, n. 3, p. 1871-1877, 2014.
- FUNAMAYA, R.; ISHIKAWA, F. **Cellular senescence and chromatin structure.** Chromosoma, v. 116, n. 5, p. 431-440, 2007.
- GIMENEZ, C. G.; REIG, J. A. **Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management.** Postgrad Med J, v. 91, n. 1073, p. 151-162, 2015.
- GIROUD, J.; BOURIEZ, I.; PAULUS, H.; POURTIER, A.; DEBACQ-CHAINIAUX, F.; PLUQUET, O. **Exploring the Communication of the SASP: Dynamic, Interactive, and Adaptive Effects on the Microenvironment.** Int J Mol Sci, v. 24, n. 13, p. 10788, 2023.
- GONZÁLEZ-GUALDA, E.; BAKER, A. G.; FRUK, L.; MUÑOZ-ESPÍN, D. **A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*.** FEBS J, v. 288, n. 1, p. 56-80, 2021.
- HARLEY, B. C.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. **Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.** Nature, v. 345, n. 6274, p. 458-460, 1990.
- HAYFLICK, L. **The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains.** Exp Cell Res, v. 65, p. 614-636, 1965.
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. **The serial cultivation of human diploid cell strains.** Exp Cell Res, v. 25, p. 585-621, 1961.
- HE, S.; SHARPLESS, N. E. **Senescence in Health and Disease.** Cell, v. 169, n. 6, p. 1000-1011, 2017.
- HENKEL, A.; SHAW, K. A. **Advances in the management of early pregnancy loss.** Curr Opin Obstet Gynecol, v. 30, n. 6, p. 419-424, 2018.
- HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. **Hallmarks of Cellular Senescence.** Trends Cell Biol, v. 28, n. 6, p. 436-453, 2018.
- HERRANZ, N.; GIL, J. **Mechanisms and functions of cellular senescence.** J Clin Invest, v. 128, n. 4, p. 1238-1246, 2018.

- HEUSER, C.; DALTON, J.; MACPHERSON, C.; BRANCH, D. W.; PORTER, T. F.; SILVER, R. M. **Idiopathic recurrent pregnancy loss recurs at similar gestational ages.** *Am J Obstet Gynecol*, v. 203, n. 4, p. 343.e1-343.e5, 2010.
- ISSAKHANOVA, A.; ISSANOV, A.; UKYBASSOVA, T.; KALDYGULOVA, L.; MARAT, A.; IMANKULOVA, B.; *et al.* **Depression, Anxiety, and Stress in Kazakhstani Women with Recurrent Pregnancy Loss: A Case-Control Study.** *J Clin Med*, v. 12, n. 2, p. 658-669, 2023.
- JAUNIAUX, E.; FARQUHARSON, R. G.; CHRISTIANSEN, O. B.; EXALTO, N. **Evidence based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage.** *Hum Reprod*, v. 21, n. 9, p. 2216-2222, 2006.
- KAMAL, N. S. M.; SAFUAN, S.; SHAMSUDDIN, S.; FOROOZANDEH, P. **Aging of the cells: insight into cellular senescence and detection methods.** *Eur J Cell Biol*, v. 99, n. 6, p. 151108, 2020.
- KOERT, E.; MALLING, G. M. H.; SYLVEST, S.; KROG, M. C.; KOLTE, A. M. SCHMIDT, L.; *et al.* **Recurrent pregnancy loss: couples' perspectives on their need for treatment, support and follow up.** *Human Reprod*, v. 34, n. 2, p. 291-296, 2019.
- KOLTE, A. M.; NIELSE, H. S.; MOLTKE, I.; DEGN, B.; PEDERSEN, B.; SUNDE, L.; *et al.* **A genome-wide scan in affected sibling pairs with idiopathic recurrent miscarriage suggests genetic linkage.** *Mol Hum Reprod*, v. 17, n. 6, p. 379-385, 2011.
- KUILMAN, T.; MICHALOGLOU, C.; MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. **The essence of senescence.** *Genes Dev*, v. 24, n. 22, p. 2463-2479, 2010.
- LARSEN, E. C.; CHRISTIANSEN, O. B.; KOLTE, A. M.; MACKLON, N. **New insights into mechanisms behind miscarriage.** *BMC Med*, v. 11, p. 154-164, 2013.
- LAWLESS, C.; WANG, C.; JURK, D.; MERZ, A.; VON ZGLINICKI, T.; PASSOS, J. F. **Quantitative assessment of markers for cell senescence.** *Exp Gerontol*, v. 45, n. 10, p. 772-778, 2010.
- LI, J.; POI, M. J.; TSAI, M. D. **Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16 INK4A and their relevance to cancer.** *Biochemistry*, v. 50, n. 25, p. 5566-5582, 2011.
- LINNAKAARI, R.; HELLE, N.; MENTULA, M.; BLOIGU, A.; GISSLER, M.; HEIKINHEIMO, O. *et al.* **Trends in the incidence, rate and treatment of miscarriage-nationwide register-study in Finland, 1998-2016.** *Hum Reprod*, v. 34, n. 11, p. 2120-2128, 2019.

LUCAS, E. S.; VRLJICAK, P.; MUTER, J.; DINIZ-DA-COSTA, M. M.; BRIGHTON, P. J.; KONG, C. S.; *et al.* **Recurrent pregnancy loss is associated with a pro-senescent decidual response during the peri-implantation window.** *Commun Biol*, v. 3, n. 1, p. 37-51, 2020.

LV, X.; CAI, Z.; LI, S. **Increased apoptosis rate of human decidual cells and cytotrophoblasts in patients with recurrent spontaneous abortion as a result of abnormal expression of CDKN1A and Bax.** *Exp Ther Med*, v. 12, n. 5, p. 2865-2868, 2016.

MARQUEZ, C. M. D.; IBANA, J. A.; VELARDE, M. C. **The female reproduction and senescence nexus.** *Am J Reprod Immunol*, v. 77, n. 5, 2017.

MENGHI, F.; BARTHEL, F. P.; YADAV, V.; TANG, M.; JI, B.; TANG, Z.; *et al.* **The Tandem Duplicator Phenotype Is a Prevalent Genome-wide Cancer Configuration Driven by Distinct Gene Mutations.** *Cancer Cell*, v. 34, n. 2, p. 197-210, 2018.

MENON, R. **Initiation of human parturition: signaling from senescent fetal tissues via extracellular vesicle mediated paracrine mechanism.** *Obstet Gynecol Sci*, v. 62, n. 4, p. 199-211, 2019.

MITSUMI, Y.; SCHNEIDER, E. L. **Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures.** *Exp Cell Res*, v. 100, n. 1, p. 147-152, 1976.

MORIN, S. J.; ECCLES, J.; ITURRIAGA, A.; ZIMMERMAN, R. S. **Translocations, Inversions and Other Chromosome Rearrangements.** *Fertil Sterility*, v. 107, n. 1, p. 19-26, 2017.

MUÑOZ-ESPÍN, D.; CAÑAMERO, M.; MARAVER, A.; GÓMEZ-LÓPEZ, G.; CONTRERAS, J.; MURILLO-CUESTA, S.; *et al.* **Programmed cell senescence during mammalian embryonic development.** *Cell*, v. 155, n. 5, p. 1104-1118, 2013.

NAVA, A. C.; PINO, Z. M. S.; HARO-PÉREZ, A. M.; HERNÁNDEZ, M. E. H.; SÁNCHEZ, M. J. D.; MANZANO, J. M. S. **Medical versus surgical treatment of first trimester spontaneous abortion: a cost-minimization analysis.** *PLoS One*, v. 14, n. 1, p. e0210449, 2019.

NIINIMÄKI, M.; KARINEN, P.; HARTIKAINEN A.L.; POUTA A. **Treating miscarriages: a randomised study of cost-effectiveness in medical or surgical choice.** *BJOG*, v. 116, n. 7, p. 984-990, 2009.

PANDAY, A.; WILLIS, N. A.; ELANGO, R.; MENGHI, F.; DUFFEY, E. E.; LIU, E. T.; *et al.* **FANCM Regulates Repair Pathway Choice at Stalled Replication forks.** *Mol Cell*, v. 81, n. 11, p. 2428-2444. 2021.

PARVANOV, D.; GANEVA, R.; VIDOLOVA, N.; STAMENOV, G. **Decreased number of p16-positive senescent cells in human endometrium as a marker of miscarriage.** *J Assist Reprod Genet*, v. 38, n. 8, p. 2087-2095, 2021.

PEREZA, N.; OSTOJIC, S.; KAPOVIC, M.; PETERLIN, B. **Systematic review and meta[1]analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion.** *Fertil Steril*, v. 107, n. 1, p. 150-159, 2017.

QUENBY, S.; GALLO, I. D.; SMITH, R. K. D.; PODESEK, M.; STEPHENSON, M. D.; FISHER, J. **Miscarriage matters: the epidemiological, physical, psychological, and economic costs of early pregnancy loss.** *Lancet*, v. 397, n. 10285, p. 1658-1667, 2021.

RHINN, M.; RITSCHKA, B.; KEYES, W. M. **Cellular senescence in development, regeneration and disease.** *Development*, v. 146, n. 20, 2019.

RHODES, D.; FAIRALL, L.; SIMONSSON, T.; COURT, R.; CHAPMAN, L. **Telomere architecture.** *EMBO Rep*, v. 3, n. 12, p. 1139-1145, 2002.

ROYAL COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS (RCOG). **Guideline 17: The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent Miscarriage.** Londres: RCOG Press, 2003.

ROYAL COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS (RCOG). **Guideline 17: The Investigation and Treatment of Couples with Recurrent First-trimester and Second-trimester Miscarriage.** Londres: RCOG Press, 2011.

SAFRAN, M.; ROSEN, N.; TWIK, M.; BARSHIR, R.; STEIN, T. I.; DAHARY, D.; *et al.* **The GeneCards Suite.** Singapura: Springer, 2021.

SARAVELLOS, S. H.; REGAN, L. **Unexplained Recurrent Pregnancy Loss.** *Obstet Gynecol Clin North Am*, v. 41, n. 1, p. 157-166, 2014.

SHANG, W.; SHU, M. M.; LIU, M.; WANG, A. M.; LV, L. B.; ZHAO, Y.; *et al.* **Elevated expressions of p53, CDKN1A, and Bax in placental villi from patients with recurrent spontaneous abortion.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 17, n. 24, p. 3376-3380, 2013.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. **Hayflick, his limit, and cellular ageing.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 1, n. 1, p. 72-76, 2000.

SOMAN, A.; WONG, S. Y.; KOROLEV, N.; SURYA, W.; LATTMANN, S.; VOGIRALA, V. K.; *et al.* **Columnar structure of human telomeric chromatin.** *Nature*, v. 609, n. 7929, p. 1048-1055, 2022.

STELZER, G.; ROSEN, R.; PLASCHKES, I.; ZIMMERMAN, S.; TWIK, M.; FISHILEVICH, S.; *et al.* **The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses.** *Curr Protoc Bioinformatics*, v. 54, p. 1.30.1-1.30.33, 2016.

STORER, M.; MAS, A.; ROBERT-MORENO, A.; PECORARO, M.; ORTELLS, M. C.; DI GIACOMO, V. *et al.* **Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning.** *Cell*, v. 155, n. 5, p. 1119-1130, 2013.

SUN, X.; TONG, X.; HAO, Y.; LI, C.; ZHANG, Y.; PAN, Y.; *et al.* **Abnormal Cullin1 neddylation-mediated p21 accumulation participates in the pathogenesis of recurrent spontaneous abortion by regulating trophoblast cell proliferation and differentiation.** *Mol Hum Reprod*, v. 26, n. 5, p. 327-339, 2020.

TANG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; FENG, H.; GAO, J.; LIU, H.; *et al.* **Senescent Changes and Endoplasmic Reticulum Stress May Be Involved in the Pathogenesis of Missed Miscarriage.** *Front Cell Dev Biol*, v. 9, 2021.

TOMARI, H.; KAWAMURA, T.; ASANOMA, K.; EGASHIRA, K.; KAWAMURA, K.; HONJO, K.; *et al.* **Contribution of senescence in human endometrial stromal cells during proliferative phase to embryo receptivity.** *Biol Reprod*, v. 103, n. 1, p. 104-113, 2020.

TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. **TGF- β Signaling.** *Biomolecules*, v. 10, n. 3, p. 487, 2020.

VAN DEN BOOGAARD, E.; KAANDORP, S. P.; FRANSSSEN, M. T. M.; MOL, B. W. J.; LESCHOT, N. J.; WOUTERS, C. H.; *et al.* **Consecutive or non-consecutive recurrent miscarriage: Is there any difference in carrier status?** *Human Reprod*, v. 25, n. 6, p. 1411-1414, 2010.

VELARDE, M. C.; MENON, R. **Positive and negative effects of cellular senescence during female reproductive aging and pregnancy.** *J Endocrinol*, v. 230, n. 2, p. R59-R76, 2016.

VOSS, P.; SCHICK, M.; LANGER, L.; AINSWORTH, A.; DIETZEN, B.; STROWITZKI, T.; *et al.* **Recurrent pregnancy loss: a shared stressor-couple-orientated psychological research findings.** *Fertil Steril*, v. 114, n. 6, p. 1288-1296, 2020.

WEINERT, B. T.; TIMIRAS, P. S. **Invited review: Theories of aging.** *J Appl Physiol* (1985), v. 95, n. 4, p. 1706-1716, 2003.

WILCOX, A. J.; WEINBERG, C. R.; O'CONNOR, J. F.; BAIRD, D. D.; SCHLATTERER, J. P.; CANFIELD, R. E.; *et al.* **Incidence of early loss of pregnancy.** *N Engl J Med*, v. 319, n. 4, p. 189-194, 1988.

YOU, J. H. S.; CHUNG, T. K. H. **Expectant, medical or surgical treatment for spontaneous abortion in first trimester of pregnancy: a cost analysis.** Hum Reprod, v. 20, n. 10, p.2873-2878, 2005.

ZHANG, R.; POUSTOVOITOV, M. V.; YE, X.; SANTOS, H. A.; CHEN, W.; DAGANZO, S. M.; *et al.* **Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA.** Dev Cell, v. 8, n. 1, p. 19-30, 2005.

7. ARTIGOS

7.1 Artigo de revisão

Suprimido.

7.2 Artigo original

Suprimido.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, demonstramos que a CS está altamente relacionada à reprodução e ao desenvolvimento, além de compor contextos de desfechos reprodutivos adversos. A revisão narrativa de literatura evidenciou que células senescentes e/ou suas moléculas secretadas estão presentes em todos os órgãos reprodutivos, apresentando funções complexas dependendo da condição fisiopatológica envolvida, a exemplo das RPL. Os resultados das análises *in silico* foram ao encontro dos achados da revisão narrativa e demonstraram que ambos são processos relacionados em termos de proteínas envolvidas. As análises genéticas revelaram que as variantes escolhidas parecem não oferecer suscetibilidade a RPL. Apesar de não termos encontrado associação positiva entre as variantes estudadas e o risco aumentado para RPL, propusemos algumas especulações sobre o assunto. A principal dificuldade encontrada ao longo do estudo da CS em RPL foi a inespecificidade dos processos, uma vez que a CS ocorre em vários contextos e é muito bem controlada em termos de tempo e espaço e que os eventos de RPL são passíveis de serem estudados apenas antes ou após sua ocorrência. Esperamos que a continuidade dos estudos em ambas as áreas propicie um melhor entendimento do processo celular e do fenótipo aqui investigados.

9. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, a continuidade do estudo da CS no contexto de RPL se faz de extrema relevância. Como anteriormente mencionado, os mecanismos moleculares por trás da relação entre CS e RPL ainda precisam ser melhor elucidados. Lacunas no conhecimento também se fazem presentes principalmente no que tange às moléculas contidas no SASP e compartilhadas com o perfil de secreção de tecidos gestacionais, sendo uma boa frente de investigação. Ainda, o uso de senoterapia para o manejo de casos de RPL engloba uma possível janela terapêutica para casos idiopáticos.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA) sob os seguintes números de registro: Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) 2022/0153 e Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 58396022.0.0000.5327.



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Projeto

2022/0153

Pesquisadores:**LUCAS ROSA FRAGA**

LAVINIA SCHULER FACCHINI

BRUNA DUARTE RENGEL

SANDRA LEISTNER SEGAL

THAYNE WOYCINCK KOWALSKI

LUIZA PRETTO

MARIA TERESA VIEIRA
SANSEVERINO

EDUARDA NABINGER

JOÃO MATHEUS BREMM

Número de Participantes: 541

Título: Senescência Celular em Tecidos Reprodutivos e seu Impacto na Gestação: Um Estudo de Bioinformática e Genética em Perdas Gestacionais Recorrentes

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

27/05/2022

