

The ADA*2 Allele of the Adenosine Deaminase Gene and Recurrent Spontaneous Abortions in Northwest of Iran

Bonyadi M^{*1}, Mohammadi A¹, Khalajkondori M¹, Taghavi S²

1. Center of Excellence for Biodiversity, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2. Maternal and Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics and Gynaecology, Alzahra Hospital, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

* *Corresponding Author.* Tel/Fax: +984133357622 E-mail: jabbarpour@tabrizu.ac.ir

Received: Feb 19, 2015

Accepted: May 26, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: Recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined by two or more consecutive miscarriages before 20 weeks of gestation. Adenosine deaminase (ADA) is an enzyme of purine salvage pathway and has two important isoenzymes ADA1 and ADA2. The adenosine deaminase G22A polymorphism (ADA*2) increases the level of adenosine. Adenosine may play a protective role against recurrent spontaneous abortions, since it regulates blood flow into the uterus and placenta. In consideration of the effect of decreased enzymatic activity of adenosine deaminase G22A polymorphism on adenosine levels we evaluated the protective effect of ADA*2 allele against recurrent spontaneous abortions in north-west of Iran.

Methods: A total of 100 women were recruited to form two groups. First one, with a history of recurrent spontaneous abortions (N=50), and the second one, without a history of abortions (N=50). Genomic DNA was extracted from peripheral blood with a commercial kit and PCR-RFLP analysis was used to identify the G22A genetic polymorphism. Fisher's exact test and odds ratio values were used to compare the proportions of adenosine deaminase genotypes and alleles between women with and without a history of recurrent spontaneous abortion ($p<0.05$).

Results: The frequency of homozygotes (AA) was 2% in control group, whereas no homozygote (AA) was found in the case group. The frequency of heterozygotes (AG) was 20% in control group and 8% in the case group ($p<0.05$). The frequency of homozygotes (GG) was 78% in control group and 92% in the case group ($p<0.05$). A significant increase in the frequency of AG genotype in controls ($p=0.014$, OR=0.348) relative to women with the history of RSA demonstrates the protective effect of AG genotype in controls.

Conclusion: The data suggest that women carrying the G22A polymorphism (ADA*2 allele) and AG genotype which is associated with the lower enzymatic activity are better protected against recurrent spontaneous abortions.

Keywords: Recurrent Spontaneous Abortions, Northwest of Iran, Adenosine Deaminase

بررسی پلی‌مورفیسم در الل 2*ADA از ژن آدنوزین دآمیناز با سقط‌های خودبخودی مکرر در زنان شمالغرب ایران

مرتضی جبارپور بنیادی^{۱*}، عاطفه محمدی^۱، محمد خلیج کندی^۱، سیمین تقوی^۲

۱. قطب علمی تنوع زیستی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. مرکز طب جنین، بیمارستان الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول. تلفکس: ۰۴۱۳۳۳۵۷۶۲۲ پست الکترونیک: jabbarpour@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: منظور از سقط مکرر خودبخودی، وقوع دو یا سه سقط متوالی خودبخودی، قبل از هفته بیستم بارداری است. آدنوزین دآمیناز در متابولیسم پورین‌ها نقش داشته و دارای دو ایزوآنزیم ADA1 و ADA2 است. پلی‌مورفیسم G22A (الل 2*ADA) موجب افزایش سطوح آدنوزین می‌شود. آدنوزین به دلیل افزایش جریان خون به رحم و جفت دارای نقش محافظتی در برابر سقط‌های مکرر خودبخودی است. با توجه به تاثیر فعالیت آنزیمی کاهش یافته این پلی‌مورفیسم بر روی سطوح آدنوزین، نقش پلی‌مورفیسم G22A (الل 2*ADA) ژن آدنوزین دآمیناز بر روی سقط‌های مکرر خودبخودی جمعیت شمالغرب ایران در این مطالعه بررسی شد.

روش کار: یک جمعیت ۱۰۰ نفری از زنان به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول ۵۰ نفر دارای سابقه سقط (حداقل دو بار) و گروه دوم شامل ۵۰ نفر با حداقل دو زایمان موفق و بدون سابقه سقط، مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج DNA از لکوسیت‌ها و با روش استاندارد استخراج DNA انجام شد. برای بررسی پلی‌مورفیسم G22A، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام و حضور یا عدم حضور این پلی‌مورفیسم توسط روش PCR-RFLP بررسی شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از آزمون مربع کای استفاده شده و ارزش ($p < 0.05$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی هموزیگوت‌ها (AA) در گروه کنترل ۲٪ مشاهده شد. این در حالی است که هیچ هموزیگوتی (AA) در گروه بیمار دیده نشد. فراوانی هتروزیگوت‌ها (AG) در گروه کنترل ۲۰٪ و در گروه بیمار ۸٪ گزارش شد ($p < 0.05$). فراوانی هموزیگوت‌ها (GG) در گروه کنترل ۷۸٪ و گروه بیمار ۹۲٪ گزارش شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل، به نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم G22A (الل 2*ADA) و ژنوتیپ AG (ADA*1/ADA*2) به واسطه کاهش فعالیت آدنوزین دآمینازی، دارای نقش محافظتی در برابر سقط‌های مکرر خودبخودی است.

واژه‌های کلیدی: سقط مکرر خودبخودی، شمالغرب ایران، آدنوزین دآمیناز

دریافت: ۹۳/۱۱/۳۰ پذیرش: ۹۴/۳/۵

مقدمه

سقط مکرر خودبخودی شامل دو یا سه سقط متوالی خودبخودی، قبل از هفته بیستم بارداری است و حدود ۱ درصد از زوجین را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱-۳]. دلایل متعددی برای وقوع سقط‌های مکرر خودبخودی وجود دارد. عوامل ایمونولوژیکی، آناتومیکی، اندوکرینی و ژنتیکی مهمترین عوامل در

این زمینه محسوب می‌شوند [۱، ۴، ۵]. عوامل دیگری از جمله وجود ناهنجاری‌های کروموزومی، هیپوتیروئیدی درمان نشده، دیابت قندی کنترل نشده، سندرم آنتی‌بادی آنتی فسفولیپید، ترومبوفیلی اکتسابی یا وراثتی، عفونت‌ها و عوامل محیطی نیز در این زمینه می‌توانند دخالت داشته باشند [۶]. با این وجود، بیش از ۴۰ درصد از موارد سقط‌های مکرر

شایان ذکر است افراد هر دو گروه از لحاظ نژادی یکسان بوده و متعلق به شمالغرب ایران بودند. به منظور نمونه‌گیری خون و انجام طرح (سال ۹۴-۱۳۹۳) از تمام افراد مورد مطالعه، رضایت نامه تدوین شده به عمل آمد. افراد شرکت‌کننده در گروه بیمار، از میان افراد مبتلا به سقط مکرر خودبخودی که به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تبریز (دکتر بنیادی) مراجعه داشتند، انتخاب شدند.

تعیین ژنوتیپ

برای بررسی پلی‌مورفیسم‌های مورد نظر، ۴cc خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA از افراد هر دو گروه دریافت شد. سپس با روش استاندارد استخراج DNA از لکوسیت‌های خون، DNA ژنومی استخراج شده و پس از آن تکثیر قطعه ژنی مورد نظر توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)^۱ و پرایمرهای اختصاصی (۱) انجام شد (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۱ میکرولیتر MgCl₂،

۲ میکرولیتر DMSO، ۱ میکرولیتر پرایمرهای

(5'GCCCGGCCCCGTTAAGAAGAGC3') و

(5'GGTCAAGTCAGGGGCAGAAGCAGA3')

۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۱۸ میکرولیتر DNA پلی‌مرز TaqI بود (مواد مصرفی تهیه‌شده از شرکت سیناژن) انجام گرفت. پس از دناتوره کردن در ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه، قطعات DNA به ترتیب زیر تکثیر شدند: تعداد ۳۵ سیکل (۹۴ °C، ۶۶ °C و ۷۲ °C). سپس یک مرحله طویل سازی در ۷۲ °C انجام گرفت.

تعیین ژنوتیپ با روش PCR-RFLP صورت گرفت. محصول اصلی PCR که ۳۹۷bp طول دارد، محلی برای برش آنزیم TaqI دارد و آنزیم می‌تواند دو قطعه (۱۵۲bp و ۲۴۵bp) ایجاد کند، ولی جایگزینی سبب حذف جایگاه اثر آنزیم شده و نتیجه آن ایجاد

خودبخودی، فاقد دلایل شناخته شده است [۵،۴،۲]. مطالعات صورت گرفته حاکی از این است که یکی از دلایل سقط‌های مکرر خودبخودی که فاقد دلایل شناخته شده‌اند، می‌تواند وجود برخی پلی‌مورفیسم‌ها در ژن‌های دخیل در روند حاملگی باشد. یکی از پلی‌مورفیسم‌های محافظتی در برابر سقط‌های مکرر خودبخودی، پلی‌مورفیسم G22A (20q11.33) ژن آدنوزین دآمیناز است. این پلی‌مورفیسم که حاصل جایگزینی G (ADA*1) توسط A (ADA*2) (در نوکلئوتید ۲۲ ی‌اگزون ۱ است، موجب جایگزینی آمینواسید (Asp) با آمینواسید (Asn) در موقعیت ۸ (Asp 8Asn) آنزیم می‌شود. افراد دارای ال ADA*2 (A22) در مقایسه با افراد هوموزیگوت (G22) ADA*1، سطوح پایین‌تری از آنزیم آدنوزین دآمیناز را بیان می‌کنند [۹-۷]. مطالعات نشان می‌دهد که حضور یک ال ADA*2 موجب کاهش ۲۰-۱۵ درصدی بیان آنزیم آدنوزین دآمیناز نسبت به ژنوتیپ هوموزیگوت ADA*1/ADA*1 می‌شود که این وضعیت موجب افزایش سطوح آدنوزین در حال گردش خواهد شد. افزایش حضور آدنوزین در رحم و جفت می‌تواند عاملی برای کاهش میزان از دست‌دادن زودهنگام زیگوت یا جنین باشد. در نتیجه، زنان حامل ال ADA*2 در برابر سقط مکرر خودبخودی محافظت می‌شوند [۱]. هدف از انجام این مطالعه، بررسی همراهی پلی‌مورفیسم G22A (ال ADA*2) با سقط‌های خودبخودی مکرر در جمعیت شمال غرب ایران است.

روش کار

بیماران

این مطالعه از نوع کنترل-بیمار بود. ۵۰ نفر با سابقه حداقل دو سقط خودبخودی به عنوان گروه بیمار و ۵۰ نفر دارای حداقل دو تولد موفق و بدون هیچ سابقه سقط به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند.

^۱Polymerase Chain Reaction

یافته‌ها

در این مطالعه، پلی‌مورفیسم (ADA (G22A در ۵۰ فرد که حداقل دو تولد موفق داشتند و فاقد سابقه سقط بودند و ۵۰ فرد مبتلا به سقط مکرر خودبخودی، با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از فراوانی الی و ژنوتیپی برای پلی‌مورفیسم ژن ADA در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی، الی و بررسی سطح معنی‌داری برای پلی‌مورفیسم ADA(G22A) در گروه بیمار و شاهد

ژنوتیپ‌ها	شاهد (n=50)	بیمار (n=50)	OR	p-value
GG	۳۹ (٪۷۸)	۴۶ (٪۹۲)	۳/۲۴۴	۰/۰۰۶
AG	۱۰ (٪۲۰)	۴ (٪۸)	۰/۳۴۸	۰/۰۱۴
AA	۱ (٪۲)	۰	۰/۰۰۰	۰/۱
الی				
G	٪۸۸	٪۹۶	۳/۲۷۳	۰/۰۳۷
A	٪۱۲	٪۴	۰/۰۰۳۶	۰/۰۳۷

در گروه بیماران، وقوع پلی‌مورفیسم هموزیگوت GG در ۴۶ نفر (٪۹۲) و هتروزیگوت AG در ۴ نفر (٪۸) مشاهده شد. اما هیچ هموزیگوت AA یی مشاهده نشد. در گروه شاهد نیز هموزیگوت GG در ۳۹ نفر (٪۷۸) و AG در ۱۰ نفر (٪۲۰) و AA در ۱ نفر (٪۲) مشاهده شد. میزان پلی‌مورفیسم AG در گروه کنترل به طور واضحی بیش‌تر از گروه بیمار بود ($p=۰/۰۱۴$).

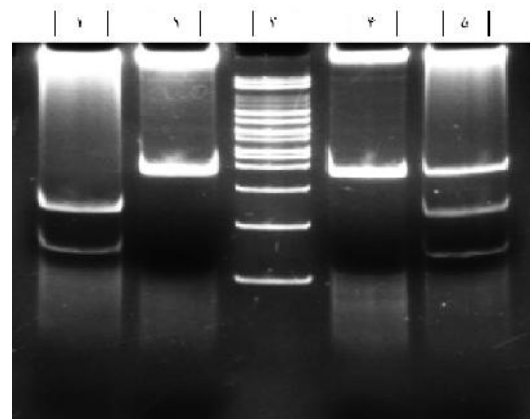
در مطالعه حاضر، فراوانی الی 22A در جمعیت شاهد نسبت به گروه بیمار، افزایش معنی‌داری ($p=۰/۰۳۷$) دارد و میزان خطر نسبی برای آن در جمعیت ۰/۳۰۶ می‌باشد. این نتایج در مورد ژنوتیپ AG با فراوانی ۲۰ درصد در گروه شاهد و ۸ درصد در گروه بیمار ($p=۰/۰۱۴$) دارای میزان خطر نسبی ۰/۳۴۸ نیز صدق می‌کند.

شایان ذکر است که در این مطالعه علاوه بر پی بردن به نقش محافظتی ژنوتیپ AG در برابر سقط‌های مکرر خودبخودی به تأثیر ژنوتیپ GG در ایجاد

یک قطعه ۳۹۷bp است. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، الکتروفورز شده و پس از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، زیر نور UV بررسی شد. محصولات PCR، قبل و بعد از اثر آنزیم، با الکتروفورز ژل آکریل (استفاده از ژل آکریل به جای آگارز به دلیل عدم وضوح باند ۱۵۲ bp در ژل آگارز بود) از هم جدا شد و طول دقیق آنها مورد مقایسه قرار گرفت (شکل ۱).

جدول ۱. آنزیم محدود الاثر و محصولات PCR و RFLP ی پلی‌مورفیسم G22A ژن ADA

پلی‌مورفیسم	آنزیم محدود الاثر	الی	محصول RFLP (bp)
ADA (G22A)	TaqI	ADA*2	۳۹۷
		ADA*1	۲۴۵، ۱۵۲



شکل ۱. پروفایل الکتروفورز قطعه ۳۹۷ bp آگزون ۱ ژن ADA پس از هضم با آنزیم TaqI که نشان‌دهنده ژنوتیپ‌های (۱) ADA*1/1، (۲) ADA*1/2، (۳) مارکر ۱۰۰ bp، (۴) محصول PCR و (۵) ADA*2/2 می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

توزیع ژنوتیپ‌های هر موتاسیون، فرکانس هموزیگوت و هتروزیگوت در هر دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون مربع کای مورد سنجش قرار گرفت. p -value و نسبت خطر^۱ برای هر گروه محاسبه شد.

^۱ Odds Ratio

حساسیت به سقط مکرر خودبخودی نیز پی برده شد.

بحث

آدنوزین در رابطه با محافظت از حاملگی‌ها نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. زیرا آدنوزین وظیفه تنظیم جریان خون و تراکم پلاکت‌ها را بر عهده داشته و یک متسع کننده رگ بالقوه محسوب می‌شود. به علاوه آدنوزین افزایش یافته می‌تواند موجب پیوستگی عروق و بنابراین افزایش جریان خون جفتی و رحمی گردد. بنابراین حضور آن در رحم و جفت می‌تواند عاملی برای کاهش میزان از دست دادن زود هنگام زیگوت یا جنین باشد. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که حضور یک ال ADA*2 موجب کاهش فعالیت ۲۰-۱۵ درصدی آنزیم ADA نسبت به ژنوتیپ هموزیگوت ADA*1/*1 می‌شود که این وضعیت با توجه به نقش آدنوزین دآمیناز در تبدیل آدنوزین به اینوزین و کاهش این تبدیلات که نتیجه وجود پلی مورفیسم G22A است، موجب افزایش سطوح آدنوزین در حال گردش شده و یک نقش محافظتی در برابر سقطهای مکرر خودبخودی ایجاد می‌کند. مطالعات متعددی در رابطه با نقش محافظتی این پلی مورفیسم در برابر سقطهای مکرر خودبخودی صورت گرفته است. فراوانی ال ADA*2 در زنان سفیدپوست اروپایی که سابقه سقطهای مکرر خودبخودی دارند، نسبت به زنانی که فاقد سابقه سقطهای مکرر خودبخودی هستند کمتر است، که این وضعیت نشاندهنده اثر محافظتی این ال در برابر سقطهای مکرر خودبخودی و نرخ باروری بالاتر در میان زنان دارای ال ADA*2 می‌باشد [۱]. در زنان برزیلی ال ADA*2 همراه با خطر کم سقطهای مکرر خودبخودی همراه است. اما این همراهی وابسته به سن بالای مادری است. نسبت حاملان ال ADA*2 در بین زنان دارای سقطهای مکرر خودبخودی نسبت به زنان باردار سالم از

جمعیت رم کمتر است. این مشاهدات تاثیر حفاظتی ال ADA*2 در برابر توسعه آنتی بادی‌های خودی در سقطهای مکرر خودبخودی را نشان داد. به نظر می‌رسد که چنین اثری توسط میان کنش با گروه‌های خونی ABO واسطه‌گری می‌شود [۱۰]. اخیراً نیکوترا^۱ و همکاران به تاثیر مشترک ACPI و پلی مورفیسم‌های ADA در رابطه با محافظت/استعداد به سقطهای مکرر خودبخودی پی برده‌اند [۱۱]. تا کنون چندین مطالعه در رابطه با فراوانی کم حاملان ADA*2 در زوجین دارای مشکلات باروری، زنان دارای تفاوت چشمگیر در طول دوره حاملگی، زنان دارای وزن کم نوزاد در زمان تولد گزارش شده است [۱۲]. گزارشی نیز در رابطه با همراهی پلی مورفیسم G22A با بیماری روماتوئید آرتریت و دیابت نوع ۱ و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی صورت گرفته است [۱۳،۹]. در مطالعه حاضر، فراوانی ال ADA*2 در زنان شاهد ۱۲ درصد و در زنان بیمار ۴ درصد بود که نشاندهنده این است که ال ADA*2 در جمعیت شاهد نسبت به گروه بیمار، افزایش معنی‌داری ($p=0/037$) دارد. این ارتباط در مورد ژنوتیپ AG با فراوانی ۲۰ درصد در گروه شاهد و ۸ درصد در گروه بیمار ($p=0/014$) نیز صدق می‌کند. با توجه به این نتایج معنی‌دار، ارتباط بین پلی مورفیسم G22A ژن آدنوزین دآمیناز و محافظت در برابر سقطهای مکرر خودبخودی در جمعیت شمالغرب ایران نیز تأیید می‌شود. همان‌طور که گفته شد در مطالعات پیشین در رابطه با نقش ژنوتیپ AG در محافظت از بارداری‌ها نتایج معناداری حاصل شد. این در حالی است که نتایج معناداری در رابطه با نقش ژنوتیپ GG در افزایش استعداد به سقط گزارش نشده بود. در مطالعه حاضر به طور غیرمنتظره‌ای علاوه بر نقش ژنوتیپ AG در محافظت از بارداری‌ها به نتایج معناداری در رابطه با

¹ Nicotra

عروق، طبیعی است افزایش میزان آن می‌تواند با افزایش خون رسانی به جفت و رحم همراه بوده و به نوعی در رابطه با بارداری‌ها نقش محافظتی از خود ایفا نماید. نتایج حاصل از مطالعه حاضر، وجود ال (ADA*2)22A و ژنوتیپ AG (ADA*1/ADA*2) را به عنوان فاکتور موثر حفاظتی جمعیت شمالغرب ایران در برابر سقط مکرر خودبخودی معرفی می‌کند.

تشکر و قدردانی

از شرکت داوطلبانه گروه بیمار و کنترل در این طرح تحقیقاتی نهایت تشکر و قدردانی را بعمل می‌آید. قطب علمی تنوع زیستی (دانشگاه تبریز) تامین بودجه این طرح را بر عهده داشته است.

نقش ژنوتیپ GG ($p=0/006$) در افزایش استعداد به سقط مکرر خودبخودی در جمعیت شمالغرب ایران نیز دست یافتیم.

نتیجه گیری

عملکرد آنزیمی ADA از طریق تنظیم میزان آدنوزین درون سلولی و به تبع آن تنظیم جریان خون جفتی و رحمی در دوران بارداری، در رابطه با محافظت یا استعداد به سقط نقش ایفا می‌کند. به عبارت دیگر، وجود پلی‌مورفیسم G22A (ال (ADA*2) که فعالیت آنزیمی کمتری نسبت به ال ADA*1 دارد، با کاهش تبدیل آدنوزین به اینوزین، موجب افزایش سطوح آدنوزین می‌شود، بنابراین آدنوزین درون سلولی به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد. با توجه به نقش‌های آدنوزین از جمله اتساع

References

1. Nunes DP, Spegorin LC, Mattos CC, Oliani AH, Vaz-Oliani DC, Mattos LC. The ADA*2 allele of the adenosine deaminase gene (20q13. 11) and recurrent spontaneous abortions: an age-dependent association. Clinics (Sao Paulo). 2011. Jul; 66(11):1929-33.
2. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlanian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. Am J Reprod Immunol. 2012 Feb; 67(4): 341-7.
3. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. Lancet. 2006. Aug; 368(9535):601-11.
4. ChoudhurySh, Knapp L. Human reproductive failure I: immunological factors. Hum Reprod Update. 2001 Mar-Apr;7(2):113-34.
5. Shen Y, Wang C, Hong D, Zeng B, Fang C, Yuan C, et al. The relationship between polymorphisms in the promoter region of Tim-3 and unexplained recurrent spontaneous abortion in Han Chinese women. Reprod Biol Endocrinol. 2013 Nov; 11: 104.
6. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. Rev Obstet Gynecol. 2009. Spring; 2(2): 76-83.
7. Dutra GP, Ottoni GL, Lara DR, Bogo MR. Lower frequency of the low activity adenosine deaminase allelic variant (ADA1*2) in schizophrenic patients. Rev Bras Psiquiatr. 2010 Sept; 32(3):275-8.
8. Bottini N, De Luca D, Saccucci P, Fiumara A, Elia M, Porfirio MC, et al. Autism : evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. Neurogenetics. 2001 Nov; 3(2):111-3.
9. Safranow K, Rzeuski R, Binczak-Kuleta A, Czyzycka E, Skowronek J, Jakubowska K, et al. ADA*2 allele of the adenosine deaminase gene may protect against coronary artery disease. Cardiology. 2007 Feb;108(4):275-81.
10. Nicotra M, Bottini N, Grasso M, Gimelfarb A, Lucarini N, Cosmi E, et al. Adenosine deaminase and human reproduction: a comparative study of fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. Am J Reprod Immunol. 1998 Oct; 39(4):266-70.
11. Daher S, Mattar R, Gueuvoghlanian-Silva BY, Torloni MR. Genetic polymorphisms and recurrent spontaneous abortions: an overview of current knowledge. Am J Reprod Immunol. 2012 Jul; 67:341-47.

12. Bottini E, Carapella E, Cataldi L, Nicotra M, Lucarelli P, Lucarini N, et al. Adenosine deaminase polymorphism. Associations at clinical level suggest a role in cell functions and immune reactions. *J Med Genet.* 1981 Nov;18: 331-4.
13. Camargo U, Toledo RA, Cintra JR, Nunes DP, Acayaba de Toledo R, Brandão de Mattos CC, et al. Lack of association of the G22A polymorphism of the ADA gene in patients with ankylosing spondylitis. *Genet Mol Res.* 2012 May; 11(2):1178-84.