GENETICA - OBSTETRICA

POLIMORFISMOS -308 G>A Y -238 G>A DEL GEN TNF-α EN ABORTO RECURRENTE

Sara Anabel Alonso Barragán[1,2]
Bianca Ethel Gutiérrez Amavizca[1,2]
Ingrid de María Salazar Dávalos[3]
Mario Alberto Aceves Aceves[3]
Nory Omayra Dávalos[1,3]
Ingrid Patricia Dávalos Rodríguez[1,2]

SUMMARY

Recurrent abortion (RA) is the loss of two or more pregnancies before 20 weeks of gestation. The RA can be attributed to several causes such as endocrine, genetic, anatomical and immunological factors, among others. Although various etiological factors are well established, in 50 % of cases of RA cause is unknown. Previous investigations have associated some cytokines to RA. Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) is a proinflammatory cytokine related in previous studies to RA, and involvement in early stage of pregnancy. -308 G>A (rs1800629) and -238 G>A (rs361525) polymorphisms have been described in the promoter region of TNF-α gene. The present work is a review from previous reports of the association of the -308 G>A and -238 G>A polymorphisms in the promoter region of TNF-α gen and RA.

Keywords: recurrent abortion; polymorphisms, TNF-α

INTRODUCCION

El aborto recurrente (AR) es la presentación de dos o más abortos espontáneos consecutivos o no, antes de las 20 semanas de gestación (6,1), otros autores consideran antes de las 22 semanas de gestación o peso menor a 500 g. (19). Se estima que la incidencia del AR en parejas sanas en edad fértil es del 1-3 % (29,19,31). El AR se ha clasificado en tres categorías de acuerdo a su historia reproductiva: primario (cuando no se ha producido un embarazo exitoso), secundario (cuando se ha presentado más de dos AR después de un producto

[1] Doctorado en Genética Humana, CUCS, Universidad de Guadalajara, México
[2] División de Genética, CIBO-IMSS, Guadalajara, México
[3] Facultad de Medicina, CUCS, Instituto de Genética Humana, Universidad de Guadalajara, México

Autor correspondiente
Dra. en C. Ingrid Patricia Dávalos Rodríguez
Sierra Mojada 800. Col. Independencia. CP. 44340, Guadalajara, Jalisco, México.
Tel: +52 33 36189410. Email: ingriddavalos@hotmail.com

nacido vivo) y terciario (cuando se han producido tres AR no consecutivos) (31). También se puede clasificar el AR de acuerdo a la edad gestacional: temprano (cuando se produce antes de la semana 12 de gestación) o tardío (cuando se presenta entre las 12 y 21 semanas de gestación) (18). Se han realizado numerosos estudios sobre la contribución de varios polimorfismos de la región promotora del gen *TNF-α*, como factor genético de riesgo para la presentación del AR, con resultados controversiales.

ETIOLOGIA

El AR es una condición heterogénea. Entre las causas de AR se encuentran: factores uterinos, inmunológicos, endocrinológicos, infecciosos, ambientales, nutricionales, metabólicos, cambios en la integridad del ADN espermático, factores de estilo de vida, trombofilia en la madre y anormalidades cromosómicas en los padres (18). Sin embargo, el 50-60% de las parejas con AR quedan sin diagnóstico etiológico (1,18,33). El factor inmunológico ha sido considerado con un papel importante en AR, especialmente después de haber obtenido un embarazo exitoso, ya que pudiera existir inmunización materna ante los antígenos recibidos por vía paterna, también se ha considerado la respuesta inflamatoria sistémica, el rompimiento de la tolerancia a auto-antígenos y antígenos fetales y falla del sistema inmunológico, entre la unidad feto y el sistema inmunológico de la madre (4,9,7,10,25). Estudios previos relacionan algunas citocinas a AR (26). Se ha considerado la participación de genes que regulan el desarrollo de una inmunidad celular aumentada, así como anormalidades autoinmunes, coagulación, angiogénesis, tono vascular y apoptosis (37,19) Las citocinas se clasifican en pro-inflamatorias (Th1) y anti-inflamatorias (Th2). La inmunidad tipo-Th2 se asocia a embarazo normal y la reactividad inmune tipo-Th1 con aumento de Th1 se ha asociado a AR (28, 4, 26, 7, 18). Un balance correcto entre inmunidad Th1 y Th2 resulta en un embarazo exitoso y la expresión de Th1 y Th2 intracelular se sugiere alterada en AR (19) así como la sobre-expresión de citocinas (28,30).

Las células Th1, los fagocitos, las células NK y estimuladores de antígeno secretan el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) (32). TNF-α es una citocina pleiotrópica involucrada en inflamación y respuesta inmune, se activa ante la presencia de un agente agresor y se ha demostrado que está presente en las primeras etapas del embarazo (32). El TNF-α es una citocina pro-inflamatoria multifuncional secretada predominantemente por monocitos/macrófagos que participa en diferentes procesos biológicos dentro de los cuales se encuentra la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo de lípidos, coagulación, resistencia a la insulina y función endotelial (19). TNF- α se ha identificado en ovarios, oviducto, útero y placenta y es expresada en tejido embrionario. Se ha considerado que predispone a pérdida fetal y como posible mediador de procesos embriopáticos (4,34,7). La asociación con AR de etiología desconocida se ha basado en aumento de los niveles séricos de TNF-α en (12). El gen TNF-α, está localizado en la región clase III del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HMC) (21), en el cromosoma 6p21.3 y codifica para la secreción de TNF-α (21). El gen TNF-α tiene una estructura de 3.6 kb y contiene 4 exones; el primer exón se encarga de codificar una proteína precursora de 233 aminoácidos, mientras que los últimos tres exones codifican para cada uno de los monómeros que conforman la proteína activa, que representa más del 80% de la proteína secretada, además el gen *TNF-α* posee tres intrones cuya función aun es desconocida y contiene regiones no traducidas 5´ y 3´ (5´UTR y 3´UTR) (21).

TNF-α es una proteína de 233 aminoácidos, tiene una secuencia de 76 residuos de largo (35), y es una molécula soluble de 17 kDa (21). El gen TNF-α y su ARNm se expresan en células epiteliales, estromales y linfoide en el endometrio. La concentración de TNF-α en el endometrio presenta variaciones a lo largo del ciclo menstrual, con aumento progresivo en la fase secretora tardía (32). El gen TNF-α contiene diversos polimorfismos de un solo nucleótido distribuidos a través de su estructura, algunos polimorfismos en la región promotora son: -308 G>A (rs1800629), -238 G>A (rs361525), -857 C>T (rs1799724), -863 C>A (rs180030), y -1031 T>C (rs1799964) (15). Los polimorfismos en la región promotora del gen TNF-α localizados en los nucleótidos -308 G>A y -238 G>A, ambos con cambio de G→A han sido asociados a AR. Estudios in vitro han mostrado aumento de producción de TNF-α posterior a estimulación con lipopolisacáridos (36), estos polimorfismos pudieran influir en el aumento sobre los niveles de expresión y de producción endógena de TNF-α. sin embargo las consecuencias funcionales de los polimorfismos del gen TNF-α aún son controversiales (20). Estudio previo reporta asociación de los polimorfismos con expresión aumentada de RNA mensajero y concentraciones elevadas de TNF-α (22). Se han reportado diversos estudios en diferentes poblaciones sobre los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A y su posible asociación con AR. Las frecuencias alélicas reportadas en estudios previos se muestran en tablas 1 y 2. Se han propuesto algunos mecanismos probables de la participación de TNF-α en AR, tales como la participación de monocitos maternos activados cerca de la barrera placentaria pudieran inducir daño focal sugiriendo una ruta de infiltración materna leucocitaria en el estroma fetal (13), por activación de las células NK o macrófagos (28), por inhibición del desarrollo embrionario y fetal con proliferación de líneas trofoblásticas humanas (4) y por invasión trofoblástica y placentaria (17), entre otras. Se ha sugerido que las citocinas Th1 promueven procesos trombóticos/ inflamatorios en los vasos sanguíneos uteroplacentarios maternos por activación de las células procoagulantes vasculares endoteliales (8). Los niveles circulantes de TNF-α son más altos en los pacientes con aborto espontáneo en comparación con pacientes con un embarazo exitoso (4). Existen diversas investigaciones de polimorfismos del gen TNF-α que han demostrado que la expresión de TNF-α en la placenta esta aumentada en pacientes con AR, sin embargo no son concluyentes (20, 14). Algunos estudios consideran los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A como polimorfismos funcionales, relacionados a la expresión de los niveles de la proteína TNF-α (4, 22), sin embargo otros estudios los consideran sin consecuencias funcionales (20), y aún no se ha dilucidado si los polimorfismos confieren susceptibilidad a enfermedad (29,32). Los resultados de estudios de asociación de los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A de la región promotora del gen TNF-α con AR en diferentes poblaciones son controversiales. Algunos estudios han encontrado asociación (14,19,23,39) y en otros estudios no se ha reportado (3,5,11,24,26,27,30).

DISCUSION

El AR es una entidad heterogénea. TNF-α es una citocina proinflamatoria producida por varios tipos de células y afecta crecimiento, diferenciación, función y supervivencia celular (2). In vitro se ha demostrado que la producción endógena de TNF-α puede ser influenciada por polimorfismos en la región promotora del gen TNF-α (36),

sin embargo las consecuencias funcionales de los polimorfismos del gen TNF-α aún son controversiales (20) TNF-α se ha asociado a varias enfermedades infecciosas, autoinmunes, neurológicas, respiratorias, entre otras (19). La asociación de los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A de la región promotora del gen *TNF-α* con AR ha sido estudiada en diversas poblaciones, aunque continua siendo controversial. Los resultados del meta- análisis realizado en 2012 (38), que incluyo 12 estudios, reportó que particularmente el polimorfismo -308G/A no se asocia significativamente a riesgo de AR, sin embargo, refieren que para el polimorfismo -238 G>A se requiere considerar la heterogeneidad, tamaño de muestra, calidad de controles, estratificación, etnicidad, inclusión de mas estudios, para así poder dar una conclusión sólida y que la falta de asociación no excluye la posibilidad de que los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A sean importantes en la patogénesis de aborto. Los polimorfismos pudieran ser reguladores de la producción de TNF-α a nivel genético y la producción de citocinas regulada por otros factores (38). Por lo anterior, consideramos relevante la continuación de investigaciones respecto a la asociación de las variantes en la región promotora del gen *TNF-α* en AR. Adicionalmente, incluir otras citocinas que participan en el resultado exitoso o no de un embarazo y así, el identificar la contribución de factores genéticos en AR permitiría identificar pacientes en riesgo.

CONCLUSION

El AR es una condición multifactorial, en la cual contribuyen factores genéticos y ambientales. El AR representa una complicación obstétrica con repercusiones en la salud, sociales y psicológicas en las pacientes. Se ha reportado que en un 50% de parejas con AR no se define la etiología. Estudios sobre factores genéticos de riesgo en AR son necesarios, en particular el papel del gen *TNF-α* en el equilibrio proinflamatorio-antiinflamatorio en el complejo materno fetal. Los resultados diferentes en estudios previos de asociación de los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A de la región promotora de TNF-α, pudieran deberse por un lado al origen étnico, tipo y diseño de estudio, tamaño de muestra, así como a la interacción con otros genes, influencia de genes modificadores, factores ambientales, interacción genes-ambiente, entre otros. Por lo anterior, consideramos valiosa la continuidad de estudios en diferentes poblaciones para identificar posibles factores genéticos de riesgo en pacientes con AR de etiología desconocida.

RESUMEN

El aborto recurrente (AR) es la pérdida de dos o más embarazos antes de la semana 20 semanas de gestación. Los AR se pueden atribuir a diversas causas tales como endócrinas, genéticas, factores anatómicos e inmunológicos, entre otros. A pesar de que varios factores etiológicos ya están bien establecidos, en el 50% de los casos de AR se desconoce la causa. Investigaciones previas han asociado algunas citocinas a AR. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citocina proinflamatoria y se ha relacionado en estudios previos a AR, así como su implicación en la etapa temprana del embarazo. Los polimorfismos -308 G>A (rs1800629) y -238 G>A (rs361525) se han descrito en la región promotora del gen *TNF-α*. En el presente trabajo se realiza una revisión de estudios previos de asociación de los polimorfismos -308 G>A y -238 G>A en la región promotora del gen del *TNF-α* con AR.

Palabras Clave: aborto recurrente; polimorfismos; TNF-α

Tabla 1.
Frecuencias alélicas del polimorfismo -308 G>A del gen TNF- α en estudios de casos AR y controles

Autor	País	n (alelos)	G n (%)	A n(%)
Babbage et al., 2001 (3)	Gran Bretaña	Casos 43 (86) Control 73 (146)	72(83) 128(87.7)	14(17) 18(12.3)
Baxter et al., 2001 (5)	Gran Bretaña	Casos 76 (152) Control 138 (276)	124(81.6) 226(81.9)	28(18.4) 50(18.1)
Reid et al., 2001 (30)	Gran Bretaña	Casos 40(80) Control 43 (86)	62(77.5) 71(82.6)	18(22.5) 15(17.4)
Daher et al., 2003 (11)	Brasil	Casos 48 (96) Control 108 (216)	83(86.5) 196(90.7)	13(13.5) 20(9.3)
Pietrowski et al., 2004 (24)	Austria	Casos 168 (336) Control 212 (424)	299(89) 375(88.4)	37(11) 49(11.6)
Prigoshin et al., 2004 (26)	Argentina	Casos 41(82) Control 54 (108)	76(92.7) 103(95.4)	6(7.3) 5(4.6)
Quintero et al., 2005 (27)	México	Casos 122 (244) Control 214 (428)	234(95.9) 394(92.1)	10(4.1) 34(7.9)
Zammiti et al., 2008 (39)	Tunisia	Casos 350 (700) Control 200 (400)	641(91.5) 363(90.7)	59(8.4) 37(9.2)
Liu et al., 2010 (19)	China	Casos 132 (264) Control 152 (304)	242(91.7) 289(95.1)	22(8.3) 15(4.9)
Palmirotta et al., 2010 (23)	Italia	Casos 100 (200) Control 100 (200)	187(94) 173(87)	13(6) 27(15)
Kaur A. y KaurA., 2011 (16)	India	Casos 50 (100) Control 50 (100)	84(84) 89(89)	16(16) 11(11)
Gupta et al., 2012 (14)	India	Casos 300 (600) Control 500 (1000)	520(86.7) 920(92)	80(13.3) 80(8)

Tabla 2.
Frecuencias alélicas del polimorfismo -238 G>A del gen TNF-α, en estudios de casos AR y controles

Autor	País	n (alelos)	G n (%)	A n(%)
Baxter et al., 2001 (5)	Gran Bretaña	Casos 76 (152) Control 138 (276)	149(98) 264(96)	3(2) 12(4)
Zammiti et al., 2008 (39)	Tunisia	Casos 350 (700) Control 200 (400)	580(82.9) 358(89.5)	120(17.1) 42(10.5)
Liu et al., 2010 (19)	China	Casos 132 (264) Control 152 (304)	260(98.5) 287(94.4)	4(1.5) 17(5.6)
Palmirotta et al., 2010 (23)	Italia	Casos 100 (200) Control 100 (200)	184(92) 194(97)	16(8) 6(3)
Gupta et al., 2012 (14)	India	Casos 200 (400) Control 300 (400)	305(99) 421(70.2)	95(1) 179(29.8)

BIBLIOGRAFIA

1. Alijotas-Reig J, Garrido-Gimenez C. Current concepts and new trends in the diagnosis and management of recurrent miscarriage. Obstet Gynecol Surv. 2013; 68(6):445-66.
2. Anderson GM, Nalara MT, De Write M, Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment for cancer. Curr Opin Pharmacol. 2004; 43:4-20
3. Babbage SJ, Arkwright PD, Vince GS, Perrey C, Pravica V, Quenby S, Bates M, Hutchinson IV. Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol. 2001;51(1):21-7.
4. Bates MD, Quenby S, Takakuwa K, Johnson PM, Vince GS. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss. Hum Reprod. 2002; 17(9):2439-44.
5. Baxter N, Sumiya M, Cheng S, Erlich H, Regan L, Simons A, Summerfield JA. Recurrent miscarriage and variant alleles of mannose binding lectin, tumour necrosis factor and lymphotoxin alpha genes. Clin Exp Immunol. 2001; 126(3):529-34.
6. Branch D.W., Gibson M., Silver R.M. Clinical practice. Recurrent miscarriage. Engl J Med. 2010; 363(18):1740-7.
7. Calleja-Agius J, Jauniaux E, Pizzey AR, Muttukrishna S. Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure. Hum Reprod. 2012; 27(2):349-57.
8. Clark DA, Chaouat G, Arck PC, Mittruecker HW, Levy GA. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. J Immunol. 1998; 160(2):545-9..
9. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Inflammation and miscarriage. Semin Fetal Neonatal Med. 2006; 11(5):302-8.
10. Christiansen OB. Mol Immunol. 2013; 55(1):8-15.
11. Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, DeLima MG. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol. 2003; 58(1):69-77.
12. El-Far M, El-Sayed H, El-Monwally AE, Hashem IA, Bakry N. Serum levels of TNF-alpha and antioxidant enzymes and placenta TNF-alpha expression in unexplained recurrent spontaneous miscarriage. J Physiol Biochem. 2009; 65(2):175-81.
13. Garcia-Lloret MI, Winkler-Lowen B, Guilbert LJ. Monocytes adhering by LFA-1 to placental syncytiotrophoblasts induce local apoptosis via release of TNF-alpha. A model for hematogenous initiation of placental inflammations. J Leukoc Biol. 2000; 68(6):903-8.
14. Gupta R, Prakash S, Parveen F, Agrawal S. Association of CTLA-4 and TNF-α polymorphism with recurrent miscarriage among North Indian women. Cytokine. 2012; 60(2):456-62.
15. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. Eur J Clin Invest. 1998; 28(1):59-66.
16. Kaur A, Kaur A. Recurrent pregnancy loss: TNF-α and IL-10 polymorphisms. J Hum Reprod Sci. 2011; 4(2):91-4.
17. Kwak-Kim JY, Gilman-Sachs A, Kim CE. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. Chem Immunol Allergy. 2005; 88:64-79.
18. Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. BMC Med. 2013;26;11:154.:
19. Liu C, Wang J, Zhou S, Wang B, Ma X. Association between -238 but not -308 polymorphism of Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)v and unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) in Chinese population. Reprod Biol Endocrinol. 2010; 8:114.
20. Mekinian A, Tamouza R, Pavy S, Gestermann N, Ittah M, Mariette X, Miceli-Richard C. Functional study of TNF-α promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis. Eur Cytokine Netw. 2011; 22(2):88-102.
21. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D, Goeddel DV, Gray PW. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. Nucleic Acids Res. 1985; 13(17):6361-73.
22. Oregón-Romero E, Vázquez-Del Mercado M, Ruiz-Quezada SL, Navarro-Hernández RE, Rangel-Villalobos H, Martínez-Bonilla G, Bernard-Medina AG, Armendáriz-Borunda J, García-Bañuelos J, Muñoz-Valle JF Tumor necrosis factor alpha-308 and -238 polymorphisms in rheumatoid arthritis. Association with messenger RNA expression and sTNF-alpha. J Investig Med. 2008; 56(7):937-43.

23. Palmirotta R, La Farina F, Ferroni P, Ludovici G, Nigro C, Savonarola A, Raparelli V, Riondino S, Rampini MR, Guadagni F, Basili S. TNFA gene promoter polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Italian women. Reprod Sci. 2010; 17(7):659-66.
24. Pietrowski D, Bettendorf H, Keck C, Bürkle B, Unfried G, Riener EK, Hefler LA, Tempfer C. Lack of association of TNFalpha gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss in Caucasian women. J Reprod Immunol. 2004; 61(1):51-58.
25. Piosik ZM, Goegebeur Y, Klitkou L, Steffensen R, Christiansen OB Plasma TNF-α levels are higher in early pregnancy in patients with secondary compared with primary recurrent miscarriage. Am J Reprod Immunol. 2013; 70(5):347-58.
26. Prigoshin N, Tambutti M, Larriba J, Gogorza S, Testa R. Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. Am J Reprod Immunol. 2004; 52(1):36-41.
27. Quintero-Ramos A, Valdez-Vélázquez LL, Hernández G, Baltazar LM, Padilla-Gutiérrez JR, Valle Y, Rodarte K, Ortiz R, Ortiz-Aranda M, Olivares N, Rivas F. Assessment of five thrombophilic genetic polymorphisms among couples with habitual abortion]. Gac Med Mex. 2006; 142(2):95-8.
28. Raghupathy R, Kalinka J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. Front Biosci.2008;13:985-94
29. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. Lancet. 2006; 368(9535):601-11.
30. Reid JG, Simpson NA, Walker RG, Economidou O, Shillito J, Gooi HC, Duffy SR, Walker JJ. The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol. 2001; 45(1):35-40.
31. Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: challenges, current knowledge, future directions. Front Genet. 2012; 3: 34.
32. Saini V, Arora S, Yadav A, Bhattacharjee J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. Clin Chim Acta. 2011; 412(9-10):702-8.
33. Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, Scholz C, Würfel W, Thaler CJ, Makrigiannakis A. Recurrent miscarriage: current concepts in diagnosis and treatment. J Reprod Immunol. 2010; 85(1):25-32.
34. Toder V, Fein A, Carp H, Torchinsky A. TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit?. J Assist Reprod Genet. 2003; 20(2):73-81.
35. Wang AM, Creasey AA, Ladner MB, Lin LS, Strickler J, Van Arsdell JN, Yamamoto R, Mark DF. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. Science. 1985; 228(4696):149-54.
36. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(7):3195-9
37. Wold AS, Arici A. Natural Killer cells and reproductive failure. Curr Opin Obstet Gynecol, 2005; 17(3);237-41.
38. Zhang B, Liu T, Wang Z. Association of tumor necrosis factor-α gene promoter polymorphisms (-308G/A, -238G/A) with recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. Hum Immunol. 2012;73(5):574-9.
39. Zammiti W, Mtiraoui N, Khairi H, Gris JC, Almawi WY, Mahjoub T. Associations between tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha polymorphisms and idiopathic recurrent miscarriage. Reproduction. 2008; 135(3):397-403.