

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Andrezza Cristina Cancian Hortolani

Polimorfismos do gene *TGF- β 1* na Pré-eclâmpsia

Uberaba
2017

Andrezza Cristina Cancian Hortolani

Polimorfismos do gene *TGF- β 1* na pré-eclâmpsia.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Co-orientadora: Me. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Uberaba

2017

Andrezza Cristina Cancian Hortolani

Polimorfismos do gene *TGF-β1* na pré-eclâmpsia.

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Humana, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Co-orientadora: Me. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

03 de Agosto de 2017.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dra. Sueli Riul da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dra. Erika Cristina Pavarino
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Dedico essa dissertação a toda a minha família, meu porto seguro. Ao meu noivo, que sempre me incentivou, a minha família mineira pelo carinho e amor e aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada.

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha mãe, Lilian, meus avós, Elizia e Álvaro, meus tios, Jefferson e Emerson e a minha tia Luci, vocês são meus melhores exemplos de vida, são pessoas que me espelho a cada dia para me tornar melhor. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por me apoiarem em todas as situações, por estarem ao meu lado em cada conquista e por entenderem a dificuldade e a saudade da distância. Só cheguei até o fim graças a vocês.

Agradeço ao meu noivo, Gustavo, pelo amor, carinho, compreensão e muita paciência nessa fase. Obrigada por cada telefonema, cada palavra de incentivo, por tornar minha vida mais leve e por não me deixar desistir. Obrigada por ser meu companheiro de vida e por caminhar ao meu lado.

Agradeço minha cunhada, Luana e meus sogros, Silvania e Gastão, por todo carinho e amor a mim dedicados em tantos anos, por compreenderem cada fase da minha vida e por ajudarem sempre na minha jornada. Agradeço por serem pessoas tão exemplares e por diminuírem a distância da minha família.

Agradeço a minha orientadora Marly pela dedicação, paciência e por me abrir as portas do laboratório por todos esses anos, dando-me a oportunidade de conquistar mais um sonho.

Agradeço a minha co-orientadora e amiga Sarah, por me passar todo o seu conhecimento, por todo o apoio nas fases mais complicadas, por me incentivar e acreditar em mim sempre e por ser uma grande amiga.

Agradeço as professoras Roseane e Alessandra pelos conhecimentos compartilhados e pela dedicação de todos os dias.

Agradeço a Profa. Mariângela por ser sempre tão prestativa e por me auxiliar nas análises estatísticas do nosso trabalho.

Agradeço a Dra. Marina e a toda sua equipe da Medicina Fetal da UFTM por serem tão solícitos e por nos auxiliar com as participantes do trabalho e seus diagnósticos.

Agradeço aos amigos do laboratório, Ricardo, Gustavo, Christiane e Elaine pela amizade, conversas, choros, risadas, cafés, caronas e por ser um dos motivos do qual gosto tanto de ir ao laboratório.

Agradeço a minha amiga Mariana, por termos enfrentado essa fase juntas. Obrigada pelo apoio, risadas, áudios e desabafos.

E, por fim, aos amigos mais verdadeiros que fiz durante minha caminhada no laboratório, vocês foram essenciais em todos os momentos, sempre com uma palavra amiga e sempre

dispostos a ajudar e a compartilhar o conhecimento. Fiz verdadeiros amigos que levarei pra vida.

Agradeço a Fapemig e a Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma desordem da gestação humana, caracterizada por hipertensão (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg) e proteinúria (> 300 mg/24horas ou $\geq 1+$ de proteína detectada no exame de urina tipo I), que ocorre após a 20ª semana de gravidez. É responsável por 5 a 8% das complicações que ocorrem durante a gravidez, sendo 10 a 18% em países subdesenvolvidos. Alguns estudos mostram que o fator genético é responsável por 50% dos casos de PE. O Fator de Crescimento Transformante Beta-1 (*TGF- β 1*) pode contribuir para o surgimento dos sinais clínicos de PE pelo fato de influenciar a placentação superficial inadequada, levar a uma disfunção endotelial e auxiliar no surgimento de hipertensão e proteinúria, que são os sinais clínicos mais conhecidos dessa patologia. Por isso, este estudo tem como objetivo investigar os polimorfismos do gene *TGF- β 1*, posições -509 (C/T) e -800 (G/A), em uma população brasileira, na região de Uberaba, Minas Gerais. Participaram desse estudo 257 mulheres, sendo 88 com PE e 169 do grupo controle. Todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a uma entrevista sobre dados clínicos e demográficos. Os polimorfismos do gene *TGF- β 1*, posições C-509T e G-800A, foram investigados por PCR em tempo real. Não houve associação genotípica do polimorfismo do gene *TGF- β 1*, posição C-509T ($\chi^2=0,312$; $p=0,855$) e alélica ($\chi^2=0,154$; $p=0,403$) e o desenvolvimento da PE. Para o polimorfismo do gene *TGF- β 1*, posição G-800A, não houve associação entre os genótipos ($\chi^2=0,744$; $p=0,689$) e nem para a presença do alelo polimórfico A ($\chi^2=0,394$; $p=0,374$) e o desenvolvimento da PE. Na análise de regressão logística, a recorrência familiar foi estatisticamente significativa, onde mulheres que relataram histórico familiar de PE possuem dezessete vezes mais risco de desenvolver a doença em relação a mulheres sem histórico familiar. Também foi observado que a primiparidade confere um risco de dezenove vezes de desenvolver PE em relação a mulheres que possuem mais de duas gestações. Portanto, esse estudo sugere que os polimorfismos avaliados não predispõem ao desenvolvimento da PE nessa população. Entretanto, necessita-se de mais estudos genéticos para auxiliar na compreensão do desenvolvimento da PE.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, Polimorfismos Genéticos, Fator de Crescimento Transformante Beta-1.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a human pregnancy disorder characterized by hypertension (systolic blood pressure ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg) and proteinuria (> 300 mg / 24 hours or $\geq 1+$ protein detected in the urine-type I test that occurs after 20 weeks of pregnancy). It is responsible for 5 to 8% of the complications that occur during pregnancy, reaching 10 to 18% when compared to underdeveloped countries. Some studies show that the genetic factor is responsible for 50% of PE cases. Transforming Growth Factor Beta-1 (TGF- β 1) may contribute to the appearance of clinical signs of PE by influencing inadequate surface placentation, leading to endothelial dysfunction and assisting in the onset of hypertension and proteinuria, which are the most known signs of this pathology. Therefore, this study aims to investigate TGF- β 1 gene polymorphisms, positions -509 (C / T) and -800 (G / A), in a Brazilian population, in the region of Uberaba, Minas Gerais. 257 women were included, 88 with PE and 169 from control group. All participants signed the Informed Consent Form (TCLE) and answered an interview about clinical and demographic data. TGF- β 1 gene polymorphisms, positions C-509T and G-800A, were investigated by real-time PCR. There was no genotypic association of TGF- β 1, C-509T ($\chi^2= 0.312$, $p = 0.855$) and allelic polymorphism ($\chi^2= 0.154$, $p = 0.403$) and the development of PE. In the logistic regression analysis, family recurrence was statistically significant, where women who reported a family history of PE had seven times the risk of developing the disease in relation to women with no family history. . It has also been observed that first pregnancy confers an eight-fold risk of developing PE in relation to women who have more than two pregnancies. Therefore, this study suggests that the polymorphisms evaluated do not predispose to the development of PE in this population. Research needs to be done to confirm the data obtained here, as well as large-scale genome studies and functional studies.

Key-words: Preeclampsia, Genetic Polymorphisms, *TGF- β 1*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Artérias uterinas maternas após a invasão por células do citotrofoblasto. A) Artérias não invadidas (Não grávida); B) Invasão trofoblástica reduzida, resultando na inadequada transformação das artérias espiraladas (Pré-eclâmpsia); C) Invasão trofoblástica normal, com a completa remodelação das artérias espiraladas (Gravidez normal). 17
- Figura 2** Localização do gene *TGF-β1* no cromossomo 19. 24
- Figura 3** Loci polimórficos do gene *TGF-β1*. Cada locus (A a G) é mostrado em relação ao promotor, as setas indicam o início da transcrição, os retângulos indicam os éxons, os retângulos brancos indicam os pré-pró-peptídios, os retângulos pretos indicam os pró-peptídeos e os retângulos cinzentos indicam a sequência madura. Nas caixas sombreadas são indicados os SNPs. 26
- Quadro 1:** Reagentes para a preparação da solução B(1x) e Solução C 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização sociodemográfica e clínica das participantes do estudo. Uberaba, 2017.	34
Tabela 2	Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo C-509T no gene <i>TGF-β1</i> , em mulheres com PE e grupo controle. Uberaba, MG-2017.	35
Tabela 3	Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo G-800A no gene <i>TGF-β1</i> , em mulheres com PE e grupo controle. Uberaba, MG-2017.	35
Tabela 4	Análise da associação do polimorfismo C-509T com PE, ajustado para a idade. Uberaba, MG-2017.	36
Tabela 5	Análise da associação do polimorfismo G-800A com PE, ajustado para a idade. Uberaba, MG-2017.	36
Tabela 6	Prevalência dos haplótipos dos polimorfismos C-509T e G-800A do gene <i>TGF-β1</i> nas mulheres com Pré-eclâmpsia (PE) e Controles (C). Uberaba, MG-2017.	37
Tabela 7	Análise da regressão logística entre os grupos PE e C. Uberaba, MG-2017.	37

LISTA DE SIGLAS

PE - Pré-eclâmpsia

PAS - Pressão arterial sistólica

PAD - Pressão arterial diastólica

RCIU - Restrição de crescimento intra-uterina

E - Eclâmpsia

HELLP - *Haemolysis, Elevated Enzymes Liver and Low Platelets*

VEGF A - Fator de crescimento do endotélio vascular A

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

IL-10 - Interleucina-10

IL-6 - Interleucina-6

TVP - Trofoblasto viloso placentário

uNK - Natural *killer* uterinas

CD - Células Dendríticas

Treg - T reguladora

ROS - Espécie Reativa de Oxigênio

ET-1- Endotelina-1

AT1-AA - Autoanticorpo antagonista do receptor do tipo I de angiotensina II

TGF- β 1 - Fator de Crescimento Transformante Beta 1

LAP - Pró-peptídeo Associado à Latência

C - Controle

HC-UFTM - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

RPM - Rotação por minuto

AB - *Applied Biosystem*

EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

χ^2 - Qui-Quadrado

OR - *Odds Ratio*

IC - Intervalo de confiança

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SOP - Síndrome do Ovário Policístico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1.1 Aspectos gerais e Classificação da Pré-eclâmpsia	14
2.1.2 Fatores de risco para Pré-eclâmpsia	15
2.1.3 Gestação normal e Pré-eclâmpsia	16
2.1.4 Complicações materno-fetais na Pré-eclâmpsia	17
2.1.5 Genética da Pré-eclâmpsia	18
2.1.6 O papel do sistema imunológico na gestação normal e com Pré-eclâmpsia	20
2.1.7 Fator de Crescimento Transformante Beta 1	23
2.2 JUSTIFICATIVA	28
2.3 OBJETIVOS	29
2.4 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.4.1 Caracterização das amostras	30
2.4.2 Lise celular e Extração de DNA	30
2.4.3 Genótipagem das amostras	31
2.4.4 Análise estatística	32
2.2.5 Aspectos éticos	32
2.5 RESULTADOS	34
2.5.1 Caracterização das amostras	34
2.5.2 Polimorfismo do gene <i>TGF-β1</i>, posição C-509T	34
2.5.3 Polimorfismo do gene <i>TGF-β1</i>, posição G-800^a	35
2.5.4 Associação do polimorfismo C-509T e G-800A com Pré-eclâmpsia	36
2.5.5 Análise do haplótipo do gene <i>TGF-β1</i> para os polimorfismos C-5009T e G-800^a	36
2.5.6 Regressão logística	37
2.6 DISCUSSÃO	38
3 CONCLUSÃO	43
4 REFERÊNCIAS	44
5 ANEXO A E APÊNDICES A e B	55

1 INTRODUÇÃO

A Pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação humana e a segunda principal causa de morbi-mortalidade materna, resultando em torno de 75 mil mortes maternas/ano e, em torno de 500 mil mortes fetais e neonatais/ano devido às consequências da PE (KHAN et al., 2006). É caracterizada por hipertensão após a vigésima semana de gestação e proteinúria (MILNE et al., 2005). Na ausência de proteinúria pode ser confirmada através de outros sinais e sintomas como trombocitopenia, níveis elevados de aminotransferases séricas, edema pulmonar, distúrbios cerebrais e visuais (ACHARYA et al., 2013).

A PE pode ser dividida em precoce e tardia, de acordo com a idade gestacional em que se manifesta e, em PE leve e grave em relação à sintomatologia (ACOG, 2013; DHARIWAL; LYNDE 2017).

A PE pode evoluir para a Eclâmpsia (E), caracterizada por uma atividade convulsiva tônico-clônica generalizada e/ou coma, na ausência de doenças neurológicas associadas (WALKER, 2000).

Vários fatores de risco estão associados com o desenvolvimento da PE, como por exemplo, extremos de idade reprodutiva (<15 e >35 anos), doenças crônicas autoimunes, primiparidade, obesidade e histórico familiar ou pessoal de PE (NISSAISORAKARN; SHARIF; JIM, 2016).

Diversas complicações materno-fetais são observadas em decorrência da PE. Para o feto, parto prematuro e restrição de crescimento intrauterino (RCIU) são frequentes. Dentre as complicações maternas, as mais frequentes estão associadas à lesão de órgãos-alvo, como rins, fígado e sistema nervoso central (MUTTER; KARUMANCHI, 2008).

Atualmente, o desenvolvimento da PE é entendido como o resultado de interações entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos, que levam a falha na invasão trofoblástica normal e ao remodelamento das artérias uterinas espiraladas, resultando em disfunção endotelial, infarto placentário e trombose intervilosa (PEGORARO et al., 2004; SIBAI, 2003). Esse processo conduz subsequentemente a uma hipóxia que provoca a liberação de citocinas solúveis (PAULI; REPKE, 2015).

O Fator de Crescimento Transformante-Beta 1 (TGF- β 1) é uma citocina multifuncional, que controla a proliferação e diferenciação de vários tipos celulares, incluindo as células do citotrofoblasto (CLARK; COKER, 1998; SIMPSON et al., 2002). Também influencia o crescimento e desenvolvimento embrionários e a apoptose das células endoteliais. É considerado como um dos reguladores no monitoramento da quantidade de células T

reguladoras (Tregs) FOXP3⁺, que desempenham um papel-chave na manutenção da tolerância materna fetal. Na gestação normal, o número de células Tregs circulantes está aumentado, o que não é visto em mulheres com complicações durante a gestação, como é o caso da PE (HSU; NANAN, 2014; LI; SHEN; TAH, 2014).

Considerando que a PE é um dos problemas mais importantes da prática obstétrica e de impacto epidemiológico com altas taxas de morbi-mortalidade materno fetal, torna-se importante analisar polimorfismos no gene *TGF-β1*, devido a sua natureza. Desse modo, espera-se contribuir para o melhor entendimento do papel de fatores genéticos e dos mecanismos moleculares envolvidos na etiologia da PE.

Assim, para avaliar o papel dos polimorfismos do gene *TGF-β1* posições C-509T e G-800A no desenvolvimento da PE na região de Uberaba, Minas Gerais, foram selecionadas 88 mulheres, que apresentavam PE durante a gestação, atendidas no Ambulatório Maria da Glória e/ou Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). O grupo controle foi constituído por 169 mulheres, que não apresentavam nenhuma intercorrência. O DNA genômico foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio e as amostras genotipadas por discriminação alélica através de PCR em Tempo Real.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Aspectos gerais e classificação da Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez humana, que ocorre, preferencialmente, na primeira gestação (PERAÇOLI; PARPINELLI, 2005).

É caracterizada por hipertensão (pressão arterial sistólica (PAS) \geq 140mmHg e pressão arterial diastólica (PAD) \geq 90mmHg, aferidas em duas ocasiões com intervalos de no mínimo 4 horas) e proteinúria ($>$ 300mg/24horas ou \geq 1+ de proteína detectada no exame de urina tipo I) após a vigésima semana de gravidez (ACOG, 2013). Em caso de ausência de proteinúria o diagnóstico pode ser feito através de exames laboratoriais que comprovem os seguintes parâmetros: trombocitopenia (contagem de plaquetas $<$ 100.000), insuficiência renal (creatinina sérica $>$ 1.1 mmg/dL ou duplicação da creatinina sérica na ausência de outra doença renal), alteração da função hepática (aumento na concentração de transaminases hepáticas para duas vezes a concentração normal), edema pulmonar, problemas cerebrais (convulsões) e visuais (estocomas) (NISSAISORAKARN; SHARIF; JIM, 2016).

Em relação ao início da PE o diagnóstico pode ser classificado em precoce ou tardio (STAFF et al., 2013). Em 80% dos casos o início é precoce e os sinais clínicos aparecem até a 34^o semana de gestação, sendo responsável pelas maiores taxas de morbi-mortalidade materna e fetal (VON DADELSZEN; MAGEE; ROBERTS, 2003). O mecanismo envolvido é a incompleta remodelação das artérias uterinas espiraladas que culminam com a invasão inadequada do trofoblasto, promovendo o estresse oxidativo elevado e causando hipoperfusão da placenta, que reduz os nutrientes enviados para o feto, que leva a restrição de crescimento intra uterino (RCIU) (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; STEEGERS, et al., 2010; VALENZUELA, et al., 2011).

A PE de início tardio surge a partir da 34^a semana de gestação, com o aparecimento da disfunção endotelial sistêmica, que é responsável pelas manifestações clínicas da doença (VALENZUELA, et al 2011). As artérias espiraladas se apresentam com o diâmetro levemente alterado, no entanto, sem modificações superficiais, levando, em alguns casos a hipoperfusão da placenta, mas com a ausência de RCIU (HUPPERTZ, 2008; SOHLBERG, et al., 2014).

Considerando a gravidade dos sintomas, a PE pode ser classificada em grave ou leve. A PE grave está associada à PAS \geq 160mmHg ou PAD \geq 110mmHg, proteinúria \geq 5000

mg/24 horas ou 3+ de proteína na urina tipo I. Cerca de 70% das gestantes desenvolvem lesão de órgão alvo (KNIGHT, 2007; ROJAS-SUAREZ; VIGIL DE GRACIA, 2012), com comprometimento da função renal (testes renais estão duas vezes maior que o normal), dor epigástrica (no quadrante superior direita devido à distensão da cápsula do fígado), distúrbios cerebrais e visuais, edema pulmonar, desprendimento placentário, trombocitopenia (<100.000) e creatinina aumentada (1.1mg/dL). Em relação ao feto, ocorre um aumento na mortalidade fetal intrauterina, com uma taxa estimada de 21 mortes a cada 1000 nascidos vivos (DHARIWAL; LYNDE, 2017; SIMPSON et al., 2002).

A PE leve é caracterizada pela PAS ≥ 140 mmHg e PAD ≥ 90 mmHg e proteinúria < 5000 mg/24horas ou uma cruz na urina tipo I. Nesse caso não existem evidências de lesão de órgãos-alvos, podendo ocorrer apenas uma discreta elevação nos níveis das transaminases hepáticas (DHARIWAL; LYNDE, 2017; SINGH, 2013).

A PE pode evoluir para um quadro grave, denominado Eclâmpsia (E), que é definido como a ocorrência de convulsões tônico-clônicas e atinge cerca de 1 a 2% das pacientes com PE. Embora seja difícil prever essa situação, em 79% dos casos os sinais e sintomas como cefaléia (56% dos casos), escotomas visuais (23% dos casos), dor epigástrica (17% dos casos), hipertensão (48% dos casos) e proteinúria (38% dos casos) estarão presentes na semana anterior ao diagnóstico (KNIGHT, 2007; SIBAI, 2003). Outra complicação é o desenvolvimento da Síndrome HELLP (**H**aemolysis, **E**levated **E**nzymes **L**iver and **L**ow **P**latelets), onde há a presença de hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia (ACHARYA et al., 2013).

2.1.2 Fatores de risco para Pré-eclâmpsia

Fatores de risco que predispoem o surgimento de PE englobam os extremos da vida reprodutiva, primiparidade, tempo prolongado entre as gestações, aumento do índice de massa corporal, história familiar de PE, hipertensão pré-existente, obesidade, síndrome metabólica, *diabetes mellitus*, trombofilia pré-existente e tabagismo (BERRY; ATTA, 2016; DUCKITT; HARRINGTON, 2005; SIBAI, 2003). O risco de uma gestante desenvolver essa doença é de aproximadamente 3%, podendo aumentar dependendo da idade da mulher (maior de 35 anos) e dos fatores de risco (LEE et al., 2011).

A contribuição paterna no desenvolvimento da doença também pode ser considerada. A exposição prolongada aos antígenos paternos através do fluido seminal induz a tolerância imunológica ao aloenxerto fetal, protegendo esse feto de uma possível rejeição e reduzindo a probabilidade de desenvolver PE (SAFTLAS et al., 2014). Com isso, relações sexuais mais

duradouras e com menor espaço de tempo conferem um papel protetor, explicado pela tolerância da mucosa materna aos antígenos paternos (SHARKEY et al., 2007).

Mulheres que fazem uso de anticoncepcionais de barreira têm sido associadas com taxas crescentes de PE. Esse fato foi relatado por Hernández-Valencia e colaboradores (2000), em que foram analisadas 73 gestantes com PE e 70 gestantes normais e os resultados indicaram um risco aumentado em 2,5 vezes para o desenvolvimento da doença, verificando a hipótese de que a exposição a antígenos paternos possui um papel protetor contra a PE.

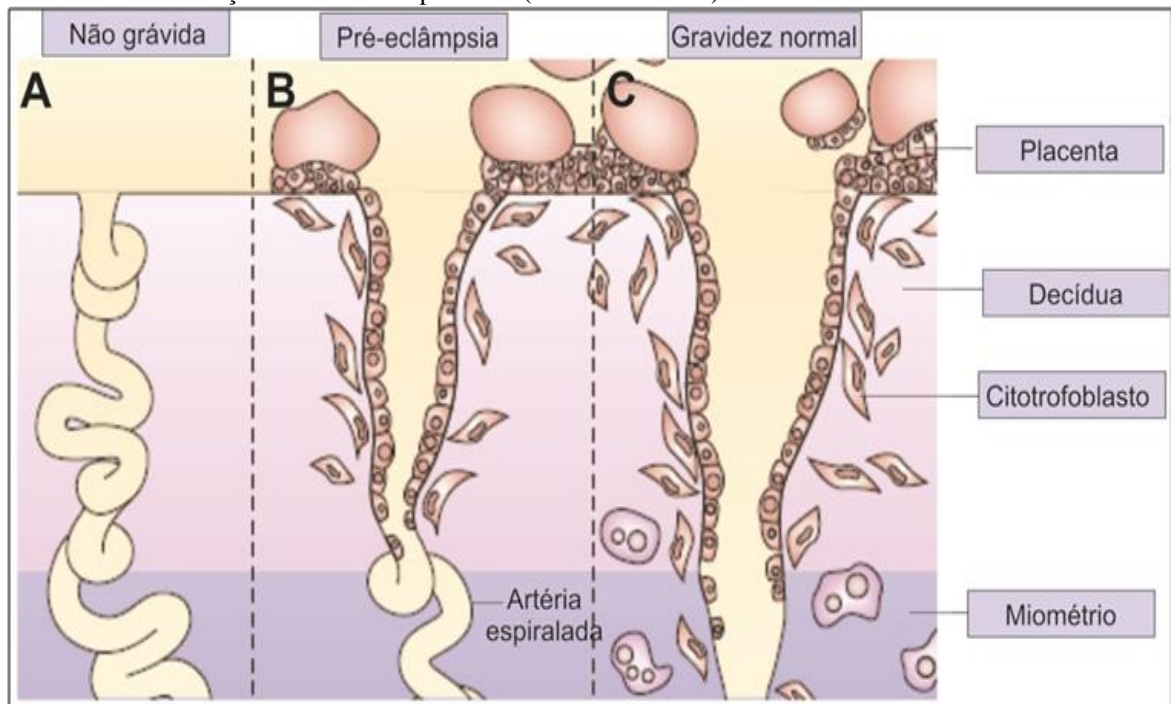
A idade paterna também parece ser um fator de risco importante nesses casos (> 45 ou < 25 anos) (KATSI et al., 2015). Os mecanismos quanto a esse fator de risco ainda não foram totalmente esclarecidos, mas sugere-se que danos prolongados ao DNA, alterações na exposição ao espermatozoide e a senescência espermática, possa produzir uma inatividade de toda uma rede de sinais envolvidos na etiologia da PE (GARCÍA-ORTIZ et al., 2011).

2.1.3 Gestação normal e Pré-eclâmpsia

A implantação citotrofoblástica de células endovasculares fetais no endométrio uterino e no miométrio durante a fase de desenvolvimento embriológico conhecido como placentação, ocorre entre a 8^a e 18^a semanas de gestação. Posteriormente, os citotrofblastos invadem e remodelam as artérias espiraladas uterinas para que ocorra um aumento no fluxo sanguíneo e, assim, atender as demandas de oxigênio e nutrientes para o crescimento fetal (THAN et al., 2014).

Nas placentas de gestantes com PE, por razões ainda desconhecidas, essa invasão trofoblástica ocorre inadequadamente e tem como resultado, vasos tortuosos, com paredes espessas, incompletamente remodeladas, propensas a espasmos entre a musculatura lisa. A consequência para isso é a hipóxia placentária, o estresse oxidativo e imediata hipoperfusão fetal intermitente. A resposta da placenta é a expressão e a secreção de fatores anti-angiogênicos e pró-inflamatórios, que podem induzir a hipertensão sistêmica e a proteinúria (THAN et al., 2014). A placentação normal e em PE são observadas na Figura 1.

Figura 1: Artérias uterinas maternas após a invasão por células do citotrofoblasto. A) Artérias não invadidas (Não grávida); B) Invasão trofoblástica reduzida, resultando na inadequada transformação das artérias espiraladas (Pré-eclâmpsia); C) Invasão trofoblástica normal, com a completa remodelação das artérias espiraladas (Gravidez normal).



Fonte: Adaptado de Moffett King, 2002.

O fluxo interviloso, observado por volta da 7^a ou 8^a semanas de gestação, são canais que ligam as artérias espiraladas e as lacunas nas paredes do blastocisto implantado (BURTON; JAUNIAUX; WATSON, 1999). Esse fluxo inicia-se nas regiões laterais do blastocisto, enquanto que a invasão trofoblástica e a remodelação das artérias espiraladas iniciam-se no centro. Com isso, pode ocorrer o estresse oxidativo, levando a uma extensa regressão coriônica e uma placenta pequena, o que contribui para a RCIU e/ou PE precoce (BURTON; JAUNIAUX, 2004).

A resposta excessiva ou atípica do sistema imune materno ao trofoblasto e decidualização prejudicada, são causas relacionadas com aparecimento da PE (BROSENS, et al., 2009; JAUNIAUX; POSTON; BURTON, 2006). Assim, torna-se a única doença caracterizada pela falha de interação entre dois organismos (materno-fetal) (HAIG, 1996).

2.1.4 Complicações materno-fetais na Pré-eclâmpsia

As gestações com PE podem causar complicações tanto para o feto quanto para a mãe. Em relação às complicações fetais, a RCIU é frequentemente observada, tendo esses recém-nascidos em média 5% menos peso do que o esperado em uma gestação normal. Essa redução é ainda mais grave quando comparado com PE de início precoce, podendo chegar a 23%

(ODEGARD et al., 2000). Outra consequência é a prematuridade, sendo responsável pela maioria dos casos de morbi-mortalidade neonatal e o risco de natimorto aumenta em sete vezes em relação à gestação normotensa (DAVIES; BELL; BHATTACHARYA, 2016; GOLDENBERG et al., 2008; HARMON et al., 2015). Esse fato pode estar relacionado com a síndrome do desconforto respiratório infantil, hemorragia intraventricular, sepse e displasia broncopulmonar (SAIGAL; DOYLE, 2008).

Em relação às complicações maternas, a inflamação excessiva e a disfunção endotelial causada pela PE levam ao comprometimento de órgãos alvo, como o sistema nervoso central fígado, rins, sistema vascular e sistema de coagulação (STEEGERS, 2010). Essas complicações não ocorrem apenas durante a gestação. Estudos apontam que mulheres que tiveram PE possuem um risco aumentado em 30% de desenvolver hipertensão e 25% em desenvolver síndrome metabólica após dois a três anos de apresentarem a doença (LYKKE; PAIDAS; LANGHOFF-ROOS, 2009).

2.1.5 Genética da Pré-eclâmpsia

Quando se relaciona a PE com fatores genéticos, um pequeno grupo de famílias segue um padrão de herança mendeliano, consistente com uma variante monogênica deletéria rara ou uma mutação com alta penetrância. No entanto, para a população em geral, essa condição representa uma desordem genética complexa decorrente de um resultado de numerosas variantes comuns em loci diferentes que, quando vistos sozinhos possuem efeitos pequenos, mas contribuem coletivamente para a suscetibilidade a doença (REDMAN; SARGENT, 2005).

Estudos relatam que a contribuição genética para PE é de 50%. Para auxiliar no entendimento de como essa doença se desenvolve, famílias suecas foram estudadas por onze anos usando o seu registro de nascimento, onde foram obtidas informações sobre 244.564 gêmeos. Foram relatados que 35% dos casos de PE foram atribuídas a efeitos genéticos por parte materna e 20% atribuídos a efeitos genéticos fetais (com igual contribuição dos efeitos genéticos maternos e paternos) (CNATTINGIUS et al., 2004).

A predisposição familiar para PE também varia de acordo com a distribuição geográfica, socioeconômica e racial. Mulheres que possuem parentesco de primeiro grau com histórico de PE possuem um risco aumentado em cinco vezes no desenvolvimento da doença, no entanto, quando o parentesco é de segundo grau, esse risco é de apenas duas vezes (MARSHALL GRAVES, 1998; ROS et al., 2000).

Genes relacionados com processos angiogênicos, como o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A (*VEGF A*) e genes relacionados ao sistema imune como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNF- α*), Interleucina-10 (*IL-10*), Interleucina-6 (*IL-6*) surgem como candidatos no desenvolvimento de PE (BORZYCHOWSKI et al., 2005; CHAN et al., 2002; FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997; HARAM et al., 2014; PISSETTI et al., 2014).

O *TNF- α* é uma citocina multifuncional que é produzida durante a gestação por células trofoblásticas, a qual exerce uma gama de ações pró-inflamatórias (CHAN et al., 2002) e sua liberação pode contribuir para a disfunção endotelial observada na PE (BORZYCHOWSKI et al., 2005). O polimorfismo do gene *TNF- α* , posição G-308A, tem sido um dos alvos de estudo nessa doença, pois pode influenciar o risco de RCIU grave através do aumento da produção de *TNF- α* na interface materna-fetal em mulheres com o alelo polimórfico A, o que pode resultar na invasão prejudicada do trofoblasto e reduzida perfusão placentária (MOLVAREC et al., 2008). Alguns trabalhos já foram realizados com esse polimorfismo em relação a PE, no entanto, os resultados foram contraditórios (BOMBELL; McGUIRE, 2008; PINHEIRO et al., 2015; VURAL et al., 2010).

A *IL-10* é uma potente citocina anti-inflamatória e um potente regulador positivo da produção, diferenciação e ativação de células B e na produção de autoanticorpos que atuam como um fator inibitório da produção de citocinas Th1 (TAGA; TOSATO, 1992). A *IL-10* também desempenha função no equilíbrio do meio anti-inflamatório e pró-inflamatório na interface materna-fetal, reduz a disfunção vascular mediada pela inflamação na interface fetal (DIDION et al., 2009) e é um inibidor da invasão do citotrofoblasto na parede uterina (ROTH; FISHER, 1999).

A regulação negativa da expressão de *IL-10* tecidual pode afetar o ambiente imune Th2 materno na interface materno-fetal (KALKUNTE et al., 2011) e a produção de *IL-10* pode estar diminuída no tecido placentário de pacientes com PE, podendo contribuir na indução de fatores vasoativos (WILCZYSKI et al., 2003). O polimorfismo G-1082A está localizado em um sítio de ligação ao fator de transcrição desse gene, podendo afetar a produção desta citocina (GUZOWSKI et al., 2005; SOWMYA et al., 2014). Mulheres com o genótipo AA possuem um risco aumentado em 3,28 vezes em desenvolver PE, sugerindo que o alelo polimórfico está associado a um risco elevado (VURAL et al., 2010). Entretanto, outros estudos não demonstraram associação entre esse polimorfismo e o desenvolvimento da doença (PINHEIRO et al., 2015; PISSETTI et al., 2014; VURAL et al., 2010).

A *IL-6* é uma citocina secretada principalmente por granulócitos, neutrófilos e macrófagos e são os principais mediadores de resposta inflamatória aguda. Estimula os

linfócitos T, induz a diferenciação terminal dos linfócitos B e induz a produção de células C reativas (PAPANICOLAOU et al., 1998). A ativação dos neutrófilos e a superprodução de citocinas pela placenta em resposta a isquemia local, provavelmente desempenharam um papel importante no desenvolvimento de danos endoteliais associados a PE (BENYO; MILES; CONRAD, 1997; CLARK; COKER 1998).

A IL-6 pode induzir também a síntese de prostaglandinas por tecidos intrauterinos, sugerindo um possível papel fisiológico no trabalho de parto. Além disso, é considerada uma citocina do tipo Th2, mas pode desempenhar funções do tipo Th1 dependendo da condição biológica em que se encontra (DAHER et al., 2004). Na PE, os fagócitos das células endoteliais fagocitam o trofoblasto necrótico provocando a ativação dessas células endoteliais e a posterior liberação de IL-6, o que aumenta o seu nível sérico circulante (CHEN et al., 2003). O polimorfismo G-174C localizado na região promotora do gene *IL-6* está associado com a produção da citocina. O genótipo CC está relacionado com níveis menores da citocina, enquanto que o CG ou GG apresentam uma produção normal. No entanto os resultados encontrados entre o aumento dos níveis de IL-6 e a suscetibilidade a PE são contraditórios (PINHEIRO et al., 2015).

Outros genes também atuam na PE, não somente relacionados ao sistema imunológico, mas através de processos angiogênicos, como é o caso do *VEGF A*. Este gene atua na regulação da vasculogênese, angiogênese e permeabilidade vascular, o que induz a proliferação, migração e formação de células endoteliais. No período gestacional está relacionado com a proliferação do trofoblasto, desenvolvimento da vasculatura embrionária e crescimento de células do sangue materno e fetal no útero (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O polimorfismo G405C desse gene está relacionado com o aumento dos níveis séricos de *VEGF A* e foi observado que o genótipo CC está associado ao risco de desenvolvimento de PE, bem como Síndrome HELLP (HARAM et al., 2014). O polimorfismo C-2578A mostrou associação onde a presença do alelo A foi mais frequente no grupo controle, sugerindo proteção ao desenvolvimento de PE (CUNHA et al, 2011).

2.1.6 O papel do sistema imunológico na gestação normal e com Pré-eclâmpsia

Inúmeros mecanismos fetais, maternos e placentários trabalham juntos para que o feto seja protegido do reconhecimento imunológico e para que não ocorra a sua rejeição pelo sistema imunológico materno. No período da placentação, o útero sofre várias modificações. Primeiramente ocorre a diferenciação do compartimento estromal do endométrio em decídua. Em seguida, o trofoblasto viloso placentário (TVP) de origem fetal atravessa o epitélio uterino

e invade a decídua e o terço inferior do miométrio. Finalmente, o trofoblasto se diferencia penetrando e remodelando as artérias uterinas, substituindo o endotélio e, parcialmente a camada muscular desses vasos. Com isso, observa-se que a gestação é a única situação em que a mãe e o feto coexistem pacificamente (MINCHEVA-NILSSON; BARANOV, 2014).

O processo de invasão do trofoblasto e a remodelação das artérias espiraladas uterinas durante a gestação normal dependem da regulação adequada do sistema imunológico materno. Durante a invasão do trofoblasto, a decídua, que constitui a parte materna da placenta e reveste todo o útero, contém um número considerável de células imunes que são necessárias para que ocorra a migração adequada das células do trofoblasto (HARMON et al., 2016).

Em uma gestação bem-sucedida, ocorrem interações complexas entre o trofoblasto fetal e as células imunes deciduais maternas, permitindo que o feto desenvolva-se no útero, enquanto o sistema imunológico da mãe permanece intacto. As células natural *killer* uterinas (uNK), células dendríticas (CD), células T e macrófagos contribuem na modulação do ambiente uterino para a sustentação da gestação. Essas células em conjunto com a placenta fornecem um suporte hormonal, nutricional e de oxigênio para o feto, tendo um importante papel imunomodulador (MINCHEVA-NILSSON; BARANOV, 2014).

O desenvolvimento correto da decídua e da placenta no primeiro trimestre é considerado crítico para a manutenção da gestação. Portanto, qualquer alteração que ocorra na secreção das glândulas uterinas, na decidualização das células do estroma e na função das células uNK podem causar complicações graves para a gravidez, tais como a PE e RCIU (GIULIANE et al., 2014).

As células T reguladoras (Treg) e as citocinas controlam adequadamente a função das células pró-inflamatórias para que essa invasão ocorra de forma adequada (TILBURGS et al., 2008). Além disso, as CD promovem um estado dominante no sistema imune através da resposta Th2 no útero e induz na placenta a imunotolerância da mãe com o feto. O equilíbrio no número dessas células e a produção de fatores angiogênicos são importantes para uma gestação saudável e, qualquer desequilíbrio nessa resposta imune local pode desencadear uma malformação e a diminuição da vascularização da placenta, sendo fatores de risco para PE e outras complicações durante a gestação (LALA; CHAKRABORTY, 2003; REDMAN; SARGENT, 2010; VEENSTRA; HEINEMAN; FASS, 2003).

Em comparação com as gestações normotensas, as gestações com PE estão associadas com uma resposta imune e um ambiente celular imunológico ativado inadequadamente. A isquemia placentária que decorre da invasão insuficiente do trofoblasto na PE tem levado a

um desequilíbrio na função imune que leva a inflamação crônica (CORNELIUS et al., 2013; IRANI et al., 2010; REDMAN; SARGENT, 2010).

Acredita-se que esse desequilíbrio contribua para a fisiopatologia geral associada a PE, que inclui a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DHILLION et al., 2012), aumento da expressão da endotelina-1 (ET-1) e autoanticorpos antagonistas do receptor do tipo I de angiotensina II (AT1-AA). Foi observada, também, uma atividade aumentada do Fator de Crescimento Transformante Beta 1 (TGF- β 1) em resposta a essa angiotensina II que levam ao desenvolvimento de hipertensão durante a gestação (HARMON et al., 2016; MORENO et al., 2008; TURKAY et al., 2008; YAYAMA et al., 2008; YOSHIJI et al., 2007).

As células Treg são um subconjunto especializado de linfócitos T que são cruciais para mediar à tolerância imunológica contra antígenos que são estranhos e para prevenir respostas imunes patológicas (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; BILATE; LAFAILLE, 2012; SAKAGUSHI et al., 2008; WING; SAKAGUSHI, 2010; WOOD; SAKAGUSHI, 2003).

Estas células podem ser identificadas de forma fácil pela expressão de marcadores de superfície celular CD4 e CD25 e FoxP3⁺ (VENKATESHA et al., 2006). Durante a gestação normal as Treg aumentam seus níveis no início da gestação, atingem seu pico durante o segundo trimestre e depois voltam para seu valor normal (QUINN et al., 2011). Os picos de Treg coincidem com importantes processos como o remodelamento vascular e a invasão do trofoblasto, que são cruciais para uma gestação saudável. Em PE, as Treg e a secreção de IL-10 e TGF- β 1 estarão reduzidos, fazendo com que a estimulação e proliferação de células T inflamatórias ocorram sem controle (ITO et al., 2008).

A evidência de que a diminuição nos níveis de Treg contribua para PE já foi vista em alguns estudos, assim como em gestantes que tiveram inúmeros abortos espontâneos (SASAKI et al., 2004). Foi demonstrado que essas células estão reduzidas na circulação e na decídua de mulheres com PE e, essa diminuição é diretamente proporcional à sua gravidade. (SASAKI et al., 2007).

Alguns dados publicados indicam que as citocinas maternas do tipo Th2 estão associadas ao sucesso da gravidez, enquanto que as citocinas maternas do tipo Th1 anormalmente elevadas são incompatíveis com resultados de uma gestação normal (BORZYCHOWSKI et al., 2005; MATTHIESENA et al., 2005; WILCZYSKI et al., 2002). Portanto, nos primeiros dias da imunologia reprodutiva, o paradigma proposto era Th1/Th2, quando se relacionava PE com uma gestação normotensa (SAITO; SAKAI, 2003).

Entretanto, o paradigma Th1/Th2 já foi comprovado como incompleto para explicar completamente as mudanças funcionais e moleculares observadas durante a gravidez normal/PE. Estudos recentes descreveram várias outras células imunológicas envolvidas neste processo, expandindo o paradigma Th1/Th2 para Th1/Th2/Treg/Th17, introduzindo Treg como reguladores de linfócitos Th17 e outros tipos de células imunes envolvidos na tolerância materno-fetal (LARESGOITI-SERVITJE; GOMES-LOPES; OLSON, 2010; SAITO, 2010).

Nesse novo paradigma, as células Treg são responsáveis por mediar a tolerância materna ao feto e a resposta Th17 induzir alterações inflamatórias sistêmicas exageradas, disfunção endotelial vascular e rejeição ao aloenxerto fetal (CROME; WANG; LEVINGS, 2010; YANG et al., 2004). As teorias da inflamação crônica, da disfunção endotelial, da angiogênese e da inadaptação do sistema imune, estão inter-relacionadas e a diferenciação desequilibrada das células Treg e Th17 pode explicar a fisiopatologia da PE, expandindo, assim, o antigo paradigma (SAITO et al., 2010).

A citocina TGF- β 1 está relacionada com esse paradigma expandido Th1/Th2/Th17/Treg, pois está associada com os mecanismos das células Treg e Th17 (SAITO et al., 2010).

2.1.7 Fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1)

O TGF- β é uma família de citocinas homodiméricas e multifuncionais de 25KDa segregadas numa forma latente por vários tipos de células, incluindo células mononucleares de sangue periférico e células Treg (ROBERTSON et al., 2002). Influencia numerosos processos fisiológicos como a hematopoiese, angiogênese, inflamação, miogênese, osteogênese, reparação e remodelação de tecidos (MASSAGUÉ, 1990; RIZZINO, 1988; ROBERTS; SPORN, 1990), modulação do crescimento e diferenciação celular e imunorregulação e formação da matriz extracelular (BOWEN et al., 2002; MAITRA et al., 2009). É um regulador bifuncional que tanto inibe quanto estimula a proliferação celular e a perturbação da sua sinalização tem sido encontrada na patogênese de doenças do tecido conjuntivo, fibrose e câncer (ROBERTS et al., 1981).

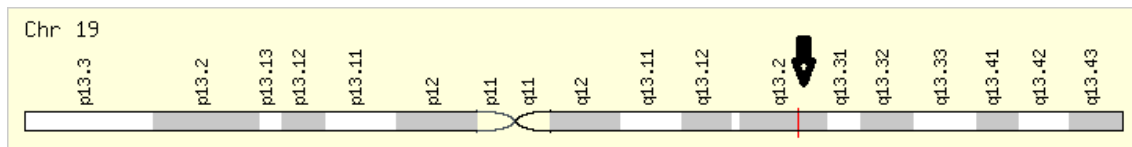
O gene *TGF- β* possui três isoformas: *TGF- β 1*, *TGF- β 2* e *TGF- β 3*, que são codificadas por genes e cromossomos distintos (MASSAGUÉ, 1990). Com isso, os membros da família do *TGF- β* e suas isoformas utilizam de mecanismos comuns para suas vias de sinalização. Os principais componentes para essa sinalização são as proteínas SMADs, que transmitem o sinal para o gene (MASSAGUÉ, 1998; MASSAGUÉ; WOTTON, 2000). Para que essa sinalização

ocorra, os ligantes de *TGF-β* se ligam aos receptores e incidem sobre as SMADs para, assim, fazer a ativação do gene (IMAMURA et al, 1997; NAKAO et al., 1997).

Uma das isoformas conhecidas do gene *TGF-β*, o *TGF-β1*, é sintetizado por plaquetas, macrófagos, monócitos, linfócitos, fibroblastos, células epiteliais (KATO et al., 1999) e células dendríticas (KRZEMIEN; KNAPCZYK, 2005).

O gene *TGF-β1* está localizado no cromossomo 19q13 e contém sete éxons e seis íntrons (CLARK; COKER, 1998) (Figura 2). É liberado na circulação através de um precursor inativo contendo pró-peptídeo associado à latência (LAP) que estão unidos através de uma ligação não covalente podendo ser armazenado nos grânulos das plaquetas ou na superfície celular (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000).

Figura 2 – Localização do gene *TGF-β1* no cromossomo 19



Fonte: www.genecards.com

Esta citocina está presente na forma inativa com uma meia-vida de 90 minutos no sangue periférico, sendo que a meia-vida ativa é de apenas poucos minutos. Assim, a LAP mascara os epítomos de *TGF-β1* e faz com que a sua forma ativa seja imperceptível no sangue e nos tecidos (MAREK et al., 2002).

As possíveis consequências da presença do *TGF-β1* no organismo é que ele exerce sua influência em inúmeros processos fisiológicos e fisiopatológicos, por isso sendo chamado de uma citocina multifuncional. São exemplos dessa influência a participação no desenvolvimento fetal, o controle e diferenciação do crescimento celular, a indução da fibrose, a supressão do sistema imune, a angiogênese, o desenvolvimento de tumores e processos inflamatórios (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000; GENC et al., 2010; GRESSNER et al., 2002; KAJDANIUK et al., 2011).

O gene *TGF-β1* está expresso no ovário e no útero nos períodos pré e pós-implantação, principalmente em áreas submetidas a eventos morfogênicos. Com isso, sugere-se que essa molécula possa desempenhar um papel na função reprodutiva, com efeitos que vão desde a migração de células germinativas durante a embriogênese, modulação da função ovariana, implantação e desenvolvimento embrionário, desenvolvimento placentário e imunorregulação da gestação (GODIN; WYLIE, 1991; SHULL et al., 1994).

O gene *TGF-β1* é considerado um dos reguladores do monitoramento do número de células Treg FoxP3⁺, que desempenham um importante papel na manutenção da autoproteção, respostas imunes fisiológicas e, medeiam a tolerância materna aos antígenos paternos do feto (CLARK; COKER, 1998; LI; SHEN; TAN, 2014; SIMPSON et al., 2002). Além disso, na placenta, tanto o RNA mensageiro quanto a proteína do TGF-β1 são detectadas durante a gestação (BOWEN et al., 2002) e podem contribuir para a regulação da resposta imune materna contra o aloenxerto fetal (LUDVIKSSON; SEEGERS; RESNICK, 2000; POWER et al., 2002). O gene *TGF-β1* tem o potencial de alterar o equilíbrio entre o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto invasivo, do qual depende o desenvolvimento normal da gestação (CANIGGIA et al., 1996; GRAHAM; LALA, 1991; LALA; CHAKRABORTY, 2003).

O *TGF-β1* também está relacionado com a indução e proliferação das células Treg e com a inibição das células Th17, demonstrando, assim, que o aumento da razão entre Treg/Th17 é mediado por ele (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; CHEN et al., 2003; TOLDI et al., 2011).

Como o *TGF-β1* influencia no crescimento e desenvolvimento embrionário, na apoptose das células endoteliais e na regulação da invasão, proliferação e diferenciação do trofoblasto, foi recentemente proposto como um gene candidato para PE, por estar relacionado numa possível ativação de uma via endotelial (CHEN et al., 2003) ou através da regulação da inflamação sistêmica (CLARK; COKER, 1998; LI; SHEN; TAN, 2014; SIMPSON et al., 2002; TOLDI et al., 2011).

Alguns estudos observaram que os níveis séricos de TGF-β1 encontram-se aumentados na circulação em casos de PE (FEIZOLLAHZADEH et al., 2012; PERAÇOLI et al., 2008; WANG et al., 2010). Esse aumento pode auxiliar no surgimento dos sinais clínicos da doença de várias formas, pois o *TGF-β1* pode contribuir para a placentação superficial com inibição de crescimento celular (MOUSTAKA; HELDIN, 2005). Também está envolvido no surgimento da hipertensão grave em PE devido ao estímulo e liberação de renina através de células justaglomerulares (ANTONIPILLIAI et al., 1993) e tem a capacidade de estimular a angiotensina II (BORDER; NOBLE, 1998).

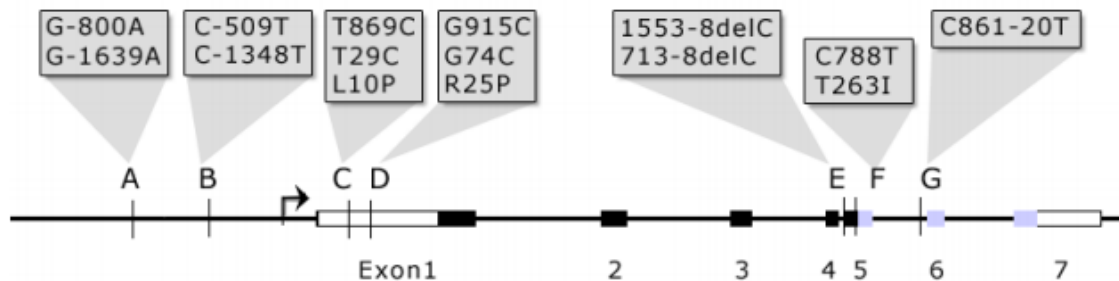
Além disso, o gene *TGF-β1* está relacionado com a disfunção endotelial por estimular a produção de ET-1, que é um peptídeo vasoativo e está envolvido com a proteinúria na PE, pois causa o acúmulo e a inibição da degradação da matriz extracelular que leva sua deposição nas células renais e consequente degradação (DOCHERTY et al., 2002).

Um estudo feito com ratos transgênicos observou que níveis elevados de TGF-β1 na circulação podem causar fibrose e perda progressiva da função renal. Diante disso, o gene

TGF-β1 pode contribuir para o início da patologia de PE, podendo afetar tanto a parte da hipertensão quanto a função das células renais (BORDER; NOBEL, 1998).

Diante desses fatos apresentados, o gene *TGF-β1* torna-se um candidato em potencial para contribuir com o desenvolvimento de PE. Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar o papel dos polimorfismos desse gene e a suscetibilidade a PE (STONEK et al, 2007). Os polimorfismos mais comumente estudados são: C-509T (rs1800469), G-800A (rs1800468) e 869 T/C (rs1800470) (Figura 3).

Figura 3 – Loci polimórficos do gene *TGF-β1*. Cada locus (A a G) é mostrado em relação ao promotor, as setas indicam o início da transcrição, os retângulos indicam os éxons, os retângulos brancos indicam os pré-pró-peptídios, os retângulos pretos indicam os pró-peptídeos e os retângulos cinzentos indicam a sequência madura. Nas caixas sombreadas são indicados os SNPs.



Fonte: Tzakas et al., 2005.

Estudos demonstraram que o polimorfismo T869C está relacionado com risco elevado de desenvolvimento da hipertensão, no entanto a forma como essa alteração afeta a forma ativa do *TGF-β1* ainda não foi completamente esclarecida (NIU, 2011; YAN-YAN, 2011).

Os polimorfismos G-800A e o C-509T, possuem a função de regular os níveis de expressão da proteína e são capazes de desencadear alterações nos sítios de *splicing* (LOEYS et al., 2006), devido a troca das bases dessas duas variantes no início da transcrição do gene (GRAINGER et al., 1999).

Alguns estudos já demonstram que os polimorfismos que se localizam na região promotora do gene *TGF-β1*, como são os casos do C-509T e G-800A, estão relacionados com a regulação transcricional alterada e, assim podem influenciar na suscetibilidade a PE. Uma das hipóteses em relação ao polimorfismo G-800A seria que a presença do alelo polimórfico interrompe um consenso de ligação da proteína de ligação ao fator de transcrição nuclear CRE, que faz com que ocorra uma menor produção de *TGF-β1* total na circulação (SYRRIS et al., 1998). O polimorfismo C-509T parece estar associado a uma atividade transcricional aumentada (LUEDECKING; SEEGERS; RESNICK 2000), elevando os níveis circulantes de *TGF-β1* (GRAINGER et al., 1999; SYRRIS et al., 1998).

Um estudo feito na Índia avaliou a relação da PE com os polimorfismos C-509T e T869C (DEEPTHI et al., 2015) e os dados encontrados foram conflitantes. Já Feizollahzadeh e colaboradores (2012) investigaram a relação entre os polimorfismos C-509T e G-800A com PE em mulheres iranianas, no entanto não foi encontrada associação entre os polimorfismos estudados e o risco de desenvolvimento de PE.

Considerando que a PE é um dos principais problemas obstétricos e de impacto epidemiológico com altas taxas de morbi-mortalidade fetal e que o gene *TGF-β1* está envolvido no novo paradigma da gestação Th1/Th2/Treg/Th17 atuando na placentação, no crescimento e desenvolvimento embrionário e na regulação da invasão, proliferação e diferenciação do trofoblasto, torna-se um candidato relevante para o estudo da origem da PE. Portanto, o estudo de polimorfismos nesse gene pode colaborar com o melhor entendimento da doença e de sua evolução, possibilitando a identificação de mulheres predispostas ao desenvolvimento de PE.

2.2 JUSTIFICATIVA

Embora o número de trabalhos encontrados na literatura sobre genes e polimorfismos referentes à Pré-eclâmpsia seja grande, o conhecimento que se tem a respeito da contribuição de fatores genéticos no desenvolvimento dessa doença está longe de ser completo. Devido a PE possuir caráter multifatorial, uma das principais dificuldades na investigação consiste na ausência de uma etiologia bem definida.

O estudo com genes que estão envolvidos com o novo paradigma da gestação Th1/Th2/Th17/Treg, que atuam na placentação, apoptose das células endoteliais, regulação da invasão, proliferação e diferenciação do trofoblasto e com a manutenção da gestação são importantes para auxiliar na compreensão da etiopatogênese da PE.

O gene *TGF-β1* está relacionado com esse novo paradigma imunológico da gestação, pois está associado com os mecanismos das células Treg FoxP3⁺, que promovem a tolerância imunológica materna a antígenos paternos. Além disso, esse gene contribui com a placentação superficial, surgimento da hipertensão grave e da proteinúria, que são características principais dessa doença.

Os polimorfismos C-509T e G-800A estão relacionados com a regulação transcricional alterada do gene e, assim podem influenciar na suscetibilidade a doença. Nesse contexto, torna-se importante avaliar a contribuição dos polimorfismos do gene *TGF-β1* na PE.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivos gerais:

1- Analisar a presença dos polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1* no desenvolvimento da PE.

2.3.2 Objetivos específicos:

1- Investigar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1*, em mulheres com gestação normal e com PE.

2- Analisar o efeito dos fatores de risco e a presença dos alelos polimórficos do gene *TGF-β1* na PE.

3- Comparar a frequência dos haplótipos dos polimorfismos C-509T e G-800A no gene *TGF-β1*.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Caracterização das amostras

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle, em que foram selecionadas 257 mulheres, sendo 88 diagnosticadas com PE e 169 do grupo controle (C), das quais não tiveram nenhum tipo de intercorrência, sem histórico de hipertensão arterial, diabetes ou hipotireoidismo.

As mulheres foram selecionadas no Ambulatório Maria da Glória e/ou Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). Mulheres que não possuíam informações completas sobre os dados avaliados e as que apresentavam hipertensão arterial crônica ou outras doenças crônicas foram excluídas desse trabalho.

Foram coletados 10 mL de sangue periférico de cada participante, por venopunção, em tubos de coleta a vácuo e estéril (BD Vacutainer®), com EDTA. Os tubos foram levados diretamente para o Laboratório de Citogenética e Genética Molecular Humana da Disciplina de Genética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), onde o material foi processado e armazenado em freezer.

2.4.2 Lise celular e Extração de DNA

Para a obtenção da camada leucocitária, o sangue de todas as participantes foi colocado em tubos cônicos de 50mL. Em seguida adicionou-se a solução de lise celular (solução A - TE 20:5; Tris HCl 1M; EDTA 0,5M pH=8,0) até completar 30mL. As amostras foram agitadas em vórtex e centrifugadas a 3500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos a 10°C. Os sobrenadantes foram desprezados e o procedimento foi repetido três vezes até a obtenção da camada leucocitária livre de hemácias. O *pellet* de leucócitos foi armazenado com TE 20:5 para posterior extração do DNA genômico pelo método de fenol clorofórmio (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS, 1989).

Nas amostras que estavam armazenadas no freezer foi acrescentado 250uL de solução C e foram incubadas em banho maria a 56°C por 3 horas ou 37°C por 24 horas ou até a completa dissolução do *pellet*. Os reagentes utilizados na preparação da solução B e C são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1: Reagentes para a preparação da solução B(1x) e Solução C

Solução B (estoque 1x)		Solução C	
EDTA 0,5M	1Ml	Solução B	125UI
NaCl ₂	500uL	SDS 10%	62.5UI
Tris-HCl 1M (pH 8,0)	500uL	Água ultrapura	62.5UI
Água ultrapura	48mL	Proteinase K	0.001g

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Após essa etapa, acrescentou-se 1mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos foram agitados por 15 minutos e centrifugados a 3.500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Após essa centrifugação, a fase superior mais clara foi recolhida e transferida para um tubo de 15mL. Em seguida, adicionou-se 1mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e o tubo foi agitado lentamente por aproximadamente 15 minutos. Foi novamente centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos, recolhida a fase superior em outro tubo de 15mL e acrescentado 40uL de acetato de sódio 0,2M. O DNA foi precipitado com 2mL de etanol 100% gelado. O DNA precipitado foi transferido para um microtubo de 2mL com etanol 70% e os tubos centrifugados por 10 minutos, a 15000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e os tubos ficaram secando *overnight*. Quando os tubos estavam secos, o DNA foi ressuscitado com TE 20:1.

2.4.3 Genotipagem das amostras

Para a genotipagem dos polimorfismos propostos, C-509T e G-800A, do gene *TGF-β1*, foi utilizado as sondas da TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As sondas e os iniciadores foram desenhados pela *Applied Biosystems* (AB) (ID dos ensaios: C __8708473_10; C__8708474_20). Durante o processo de genotipagem, o alelo selvagem observado foi marcado com a sonda FAM e o alelo mutante com a sonda VIC.

As reações de PCR foram feitas nas seguintes condições: 10ng de DNA, 1,5uL de TaqMan Universal Master Mix (AB) (2x), 0,1uL de sonda (10x) e água ultrapura para um volume final de 5mL. Todas as reações tiveram um controle negativo. As reações foram feitas no aparelho StepOnePlus (AB), com os ciclos programados da seguinte maneira: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação, com 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em

cada ciclo o aparelho analisou a fluorescência emitida dos alelos selvagem e mutante, marcados como FAM e VIC em tempo real.

2.4.4 Análise Estatística

Para as variáveis quantitativas, utilizaram-se medidas de posição e centralidade (média) e medidas de dispersão e variabilidade (desvio padrão).

As variáveis categóricas foram analisadas através do software SPSS (IBM, Armonk, NY, USA). Para comparar as distribuições das frequências alélicas e genótípicas entre os grupos (grupo de estudo e grupo controle) e para verificar se as distribuições genótípicas seguiam o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi utilizado o teste de Qui-Quadrado (χ^2). O poder estatístico apresentou 80% para detecção de associação, utilizando o software G POWER 3.1.

Para a análise do modelo de herança e dos haplótipos foi utilizado o programa SNPStat (disponível em: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web). O modelo de herança, os efeitos dos polimorfismos foram avaliados por: 1- Codominância (homozigoto tipo selvagem \times heterozigótico \times homozigoto polimórfico); 2-Dominância (homozigoto tipo selvagem \times heterozigótico + homozigoto polimórfico); 3- Recessivo (homozigoto polimórfico \times homozigoto tipo selvagem + heterozigótico) e 4- Sobredominância (homozigoto tipo selvagem + homozigoto polimórfico \times heterozigoto). O modelo de haplótipo do gene *TGF- β 1* foi inferido usando o programa SNPStats, verificando a frequência populacional estimada.

O modelo de regressão logística múltipla foi utilizado para determinar o efeito das variáveis analisadas e o desenvolvido da PE. Os modelos incluíram os seguintes dados: hábito tabagista (referência: não fumante), histórico familiar de PE (referência: não), primiparidade (referência: não), presença do alelo polimórfico T e A (referência: não). Os resultados do modelo de regressão logística foram apresentados em *Odds Ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC-95%). O nível de significância considerado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

2.2.5 Aspectos éticos

Para a coleta de dados sociodemográficos e clínicos, as participantes foram entrevistadas em situação de privacidade, ocasião em que foram obtidas informações relativas a idade, pressão arterial sistêmica, histórico familiar de PE e tabagismo (Apêndice A).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) (Projeto aprovado pelo CEP/UFTM protocolo nº CAAE 44460115.1.0000.5154) (Anexo A). O estudo foi explicado para todas as participantes e o

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado por elas (Apêndices B, C, D e E)

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Caracterização da amostra

O grupo de estudo foi constituído por 257 mulheres, sendo 88 mulheres com PE e 169 do grupo C, atendidas no Ambulatório Maria da Glória e/ou HC-UFTM, na região de Uberaba, Minas Gerais. O grupo C foi constituído por mulheres que não tiveram nenhuma intercorrência durante a gestação e sem histórico de hipertensão arterial.

Os dados sociodemográficos e clínicos coletados durante a entrevista podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização sociodemográfica e clínica das participantes do estudo. Uberaba, 2017.

Dados	Pré-eclâmpsia	Controles
Idade Materna Média (anos)	27,5 ± 6,6	31,8 ± 7,8
Número de gestações	2,1 ± 1,18	2,8 ± 1,3
PAS média (mmHg)	155,4 ± 22,4	114,3 ± 11,6
PAD média (mmHg)	102,6 ± 14,6	75,6 ± 13,6
Tabagismo (%)	12,5%	14,2%
Histórico familiar de PE (%)	27,3%	5,3%

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

PAS= Pressão Arterial Sistólica

PAD= Pressão Arterial Diastólica

Observa-se que a idade média materna, número de gestações e tabagismo foram maiores no grupo controle. No entanto, a história familiar de PE foi mais frequente no grupo de estudo.

2.5.2 Polimorfismo do gene *TGF-β1*, posição C-509T

Para o polimorfismo C-509T, foram analisadas 240 mulheres, sendo 82 (34,2%) do grupo PE e 158 (65,8%) controle.

A Tabela 2 mostra as frequências genotípicas e alelicas do polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1* dos grupos de estudo e controle. A frequência genotípica não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($\chi^2=0,744$; $p=0,689$).

O grupo de estudo e o grupo controle, encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (PE: $\chi^2= 0,10$ e $p=0,75$; C: $\chi^2= 0,24$ e $p=0,62$).

Tabela 2 – Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo C-509T no gene *TGF-β1*, em mulheres com PE e grupo controle. Uberaba, MG-2017.

	PE n (%)	Controle n (%)	χ^2	P
Genótipos				
CC	28 (34,1)	58 (36,7)	0,312	0,855
CT	41 (50,0)	73 (46,2)		
TT	13 (15,9)	27 (17,1)		
Frequência Alélica				
C	0,6	0,6		
T	0,4	0,4		

Fonte: Elaborada pela autora, 2017

Considerando a presença do alelo polimórfico T, não se observou diferença estatisticamente significativa entre o grupo com PE e o grupo C ($\chi^2=0,154$; $p=0,403$; OR (95%) IC=1,119 (0,639-1,957)).

2.5.3 Polimorfismo do gene *TGF-β1*, posição G-800A

Para o polimorfismo G-800A, foram analisadas 257 mulheres, sendo 88 (34,16%) amostras do grupo PE e 169 (65,83%) do grupo C e foram genotipadas por PCR-Tempo Real.

A Tabela 2 mostra as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo G-800A do gene *TGF-β1* nos grupos de estudo e controle. A frequência genotípica não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($\chi^2=0,744$; $p=0,689$).

Tanto para o grupo de estudo como controle, encontram-se em EHW (PE: $\chi^2=0,048$ e $p=0,82$; C: $\chi^2=3,12$ e $p=0,082$).

Tabela 3 – Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo G-800A no gene *TGF-β1*, em mulheres com PE e grupo controle. Uberaba, MG-2017.

	PE n (%)	Controle n (%)	χ^2	P
Genótipo				
AA	0 (0)	1 (0,6)	0,744	0,689
GA	4 (4,5)	10 (6,0)		
GG	84 (95,5)	158 (93,4)		
Frequência alélica				
G	0,98	0,96		
A	0,02	0,04		

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Considerando a presença do alelo polimórfico A, não se observou diferença estatisticamente significativa entre o grupo com PE e o grupo C ($\chi^2=0,394$; $p=0,374$; OR (95%) IC= 0,688 (0,212–2,227)).

2.5.4 Associação dos polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1*, com Pré-Eclâmpsia

As Tabelas 4 e 5 apresentam as análises de associação dos dois polimorfismos avaliados nesse estudo pelo programa SNPStat. Foram analisadas 257 mulheres, 88 com PE e 169 controles. Não foi observada associação entre os polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1* e os modelos de herança estudados.

Tabela 4- Análise de associação do polimorfismo C-509T com PE, ajustado para a idade. Uberaba, MG-2017.

Modelo	Genótipo	Caso n(%)	Controle n(%)	OR (IC=95%)	P
Codominância	C/C	28 (34,6%)	56 (34,4%)	1,00	0,93
	C/T	40 (49,4%)	72 (46,8%)	0,90 (0,50-1,63)	
	T/T	13 (16,1%)	26 (16,9)	1,00 (0,45-2,24)	
Dominância	C/C	28 (34,6%)	56 (36,4%)	1,00	0,78
	C/T-T/T	53 (65,4%)	98 (63,6%)	0,92 (0,53-1,62)	
Recessivo	C/C-C/T	68 (84%)	128 (83,1%)	1,00	0,87
	T/T	13 (16,1%)	26 (16,9%)	1,06 (0,51-2,20)	
Sobredominância	C/C-T/T	41 (50,60%)	82 (53,2%)	1,00	0,70
	C/T	40 (49,4%)	72 (46,8%)	0,90 (0,53-1,54)	

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Tabela 5- Análise de associação do polimorfismo G-800A com PE, ajustado para a idade. Uberaba, MG-2017.

Modelo	Genótipo	Caso n(%)	Controle n(%)	OR (IC=95%)	p
Codominância	G/G	84 (95,5%)	158 (93,5)	1,00	0,59
	G/A	4 (4,5%)	10 (5,9%)	1,33 (0,40-4,37)	
	A/A	0 (0,%)	1 (0,6%)	NA (0,00-NA)	
Dominância	G/G	84 (95,5%)	158 (93,5%)	1,00	0,52
	G/A-A/A	4 (4,5%)	11 (6,5%)	1,46 (0,45-4,73)	
Recessivo	G/G-G/A	88 (100%)	168 (99,4%)	1,00	0,36
	A/A	0 (0,0%)	1 (0,6%)	NA (0,00-NA)	
Sobredominância	G/G-A/A	84 (95,5%)	159 (94,1%)	1,00	0,64
	G/A	4 (4,5%)	10 (5,9%)	1,32 (0,40-4,34)	

Fonte: Elaborada pela autora, 2017

2.5.5 Análise do haplótipo do gene *TGF-β1* para os polimorfismos C-509T e G-800A

A Tabela 6 apresenta os haplótipos para os polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1*. Não foi observado associação dos haplótipos dos polimorfismos analisados entre os grupos estudados.

Tabela 6- Prevalência dos haplótipos dos polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1* das mulheres com Pré-eclâmpsia PE e Controles (C). Uberaba, MG-2017.

Haplótipo	Grupo PE	Grupo C	OR (IC-95%)	p
G-C	0.569	0.560	1,00	-
G-T	0.408	0.404	1,01 (0,68 – 1,50)	0,95
A-C	0.022	0.035	1,54 (0,50 – 4,73)	0,46
A-T	0	0	-	-

OR: Odds ratio; IC: intervalo de confiança
 Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

2.5.6 Regressão Logística

A análise de regressão logística foi feita entre os grupos PE e C para os seguintes parâmetros: tabagismo, primiparidade, recorrência familiar e presença dos alelos polimórficos T e A. Os resultados encontrados são observados na Tabela 7.

Tabela 7–Análise da regressão logística entre os grupos PE e C. Uberaba, MG-2017.

Variável analisada	PE n(%)	C n(%)	Odd Ratio	IC (95%)	p
Tabagismo					
Sim	10 (12.2)	23 (14.8)	1.82	0.318-0.680	0.496
Não	72 (87.8)	132 (85.2)			
Histórico familiar					
Sim	22 (26.8)	9 (5.8)	17.76	1,984-4.354	<0.0001
Não	60 (73.2)	146 (94.2)			
Primiparidade					
Sim	30 (36.6)	11 (7.1)	19.32	2.163-5.311	<0.0001
Não	52 (63.4)	144 (92.9)			
Polimorfismos					
C-509T					
CC	29 (35.4)	56 (36.1)	2.25	0.147-0.432	0.665
CT-TT	53 (64.6)	99 (63.9)			
G-800A					
GG	78 (95.1)	144 (92.9)	2,13	0.674-0.924	0.355
GA-AA	4 (4.9)	11 (7.1)			

OR: Odds ratio; IC: intervalo de confiança
 Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Na análise da regressão logística entre os grupos de PE e C, a recorrência familiar e a primiparidade foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

2.6 DISCUSSÃO

Diante do novo paradigma imunológico proposto para PE, Th1/Th2/Th17/Tregs, acredita-se que o desequilíbrio entre as células Th17 e Treg seja essencial para o desenvolvimento da inflamação sistêmica materna nessas pacientes (TOLDI et al., 2011), pois as células Treg induzem intolerância imunológica (SAKAGUCHI et al., 2008) enquanto que as células Th17 induzem inflamação e rejeição ao aloenxerto fetal (TOLDI et al., 2011). Na busca por entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento de PE, o gene *TGF-β1* parece ter um papel promissor, pois além de estar relacionado com este novo paradigma, seus níveis séricos circulantes estão aumentados no sangue de mulheres com PE, podendo contribuir para seus sinais clínicos (FEIZOLLAHZADEH et al., 2012).

Estudos tem buscado associação entre polimorfismos deste gene e o desenvolvimento da doença em diferentes populações. No presente trabalho, foram estudados os polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1* e a associação com a PE, em uma população brasileira.

O polimorfismo C-509T, localizado na região promotora do gene *TGF-β1*, está associado com uma atividade transcricional aumentada (LUEDECKING; SEEGERS; RESNICK, 2000).

O presente estudo não encontrou associação entre o polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1* e o desenvolvimento da PE. Esse resultado é semelhante a um estudo realizado no Irã (FEIZOLLAHZADEH et al., 2012), que analisou 282 mulheres, sendo 142 do grupo de PE e 140 controles e não observaram associação entre o polimorfismo C-509T e PE. Ressalta-se que embora o presente trabalho tenha analisado um número inferior de mulheres com essa doença, os resultados são semelhantes.

Feizollahzadeh e colaboradores (2012) observaram o genótipo CC mais frequente nas mulheres com PE e que possuíam níveis séricos de *TGF-β1* mais elevados, no entanto os resultados não foram estatisticamente significativos. Diferentemente, o presente trabalho teve o genótipo CT mais frequente em todos os grupos, no entanto não foi possível analisar os níveis séricos de *TGF-β1*, pois a dosagem desta citocina não foi realizada.

Um estudo realizado por Deepthi e colaboradores (2015), com 469 mulheres indianas, sendo 239 com PE e 230 controles, observou que a frequência genotípica do polimorfismo C-509T diferiu significativamente entre o grupo PE, quando subdividido em grave e leve, sendo observado o genótipo heterozigoto CT mais frequente no grupo de PE grave. Embora o presente trabalho não tenha realizado essa subdivisão em grave e leve, o genótipo heterozigoto foi mais frequente tanto no grupo de estudo quanto no grupo controle.

Em relação ao polimorfismo G-800A do gene *TGF-β1*, também não foi encontrada associação entre as frequências genotípicas e alélicas e o desenvolvimento de PE.

Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Feizollahzadeh e colaboradores (2012) e Aguilar-Duran e colaboradores (2014), que também não observaram associação entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo G-800A e a suscetibilidade a doença. Outro ponto em comum entre o presente estudo e os trabalhos realizados foi à baixa frequência do alelo A em todos os grupos analisados. No presente trabalho, o alelo polimórfico A foi observado apenas no grupo controle.

O polimorfismo G-800A causa redução na atividade transcricional do gene *TGF-β1*, (SYRRIS et al., 1998). Isso ocorre devido ao fato desse polimorfismo estar localizado dentro de uma sequência específica reconhecida pelo fator de transcrição CREB, que é uma proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP-cíclico (WISNIEWSKI et al., 2009).

O gene *TGF-β1* tem o potencial de alterar o equilíbrio entre o sinciciotrofoblasto e o citotrofoblasto invasivo, do qual depende o desenvolvimento normal da gestação (CANIGGIA et al., 1996; GRAHAM; LALA, 1991; LALA et al., 2003). A baixa frequência do alelo polimórfico A observada na população pode estar relacionada à redução dos níveis circulantes de *TGF-β1*, que provavelmente levam a sérios danos ao organismo, como a interferência em mecanismos angiogênicos vitais para o desenvolvimento da gestação normal. Portanto, pode-se pensar que a implantação fetal e a placentação ficariam prejudicadas.

Os polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1* também foram estudados em outras condições ginecológicas e obstétricas, como na Síndrome do Ovário Policístico (SOP), abortos de repetição e endometriose, pois está expresso no ovário e útero, podendo influenciar numerosos processos fisiopatológicos envolvidos com o sistema reprodutor feminino (AMANI et al., 2004; HSIEH et al., 2005; YANG et al., 2015).

Yang e colaboradores (2015) compararam 328 mulheres chinesas com SOP e 358 mulheres do grupo controle e não encontraram associação entre o polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1* e SOP. Já Amani e colaboradores (2004), analisaram 111 mulheres iranianas com abortos de repetição e 110 mulheres do grupo controle e não encontraram associação entre os polimorfismos do gene *TGF-β1*, posições C-509T e G-800A.

Hsieh e colaboradores (2005) compararam 150 mulheres taiwanesas com endometriose e 159 mulheres sem endometriose para o polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1* e observaram que tanto o genótipo TT quanto o alelo T conferiam maior suscetibilidade a endometriose.

No presente trabalho não foi encontrada associação entre o teste de modelo de herança (codominância, dominância, recessividade e sobredominância) e o polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1*. Nossos resultados diferem dos encontrados por Deepthi e colaboradores (2015), que analisou o polimorfismo C-509T do gene *TGF-β1*, com uma amostra de 469 mulheres indianas, sendo 239 do grupo com PE e 230 controles. Esses autores demonstraram associação entre o modelo sobredominante e observaram que o genótipo TT predispõe a PE, enquanto o genótipo CT parece ter um efeito protetor em relação ao desenvolvimento dessa doença. Esses resultados podem ter sido encontrados devido à amostra ser maior em relação ao presente estudo e pela população iraniana ser geneticamente homogênea, o que não é o caso da população brasileira.

Para o polimorfismo G-800A do gene *TGF-β1* não foram encontrados dados relativos a análise de modelos de herança que pudessem ser relacionados com os resultados obtidos no presente estudo. Mesmo esse estudo sendo pioneiro nesse tipo de análise, não foi encontrado associação estatisticamente significativa entre o modelo de herança e a suscetibilidade a PE.

No presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a frequência dos haplótipos dos polimorfismos do gene *TGF-β1*, C-509T e G-800A e a PE.

O termo haplótipo pode ser definido como a combinação de alelos de múltiplos loci localizados no mesmo cromossomo homólogo e podem ser herdados juntos (GRIFFITHS et al., 2013). Os haplótipos surgem como um atributo intrínseco da variação genética populacional (CLARK, 2004), além disso, as análises baseadas nesses haplótipos podem apresentar melhores resultados para verificar a suscetibilidade de doenças, como a PE, por múltiplos alelos quando comparados com a análise de apenas um SNP (MORRIS, KAPLAN, 2002).

Aguilar-Duran e colaboradores (2013) em um estudo mexicano analisaram os haplótipos de três polimorfismos do gene *TGF-β1*, C-509T, G-800A e T869C e, nesse caso, foi encontrado um desequilíbrio de ligação moderado. O haplótipo mais frequente foi 800G/509C/869C, no entanto esse resultado não foi associado com o desenvolvimento de PE. Já no trabalho feito por Jahan e colaboradores (2016), foi relatada uma associação significativa entre os haplótipos T-T e C-C dos polimorfismos C-509T e T869C do gene *TGF-β1*, em relação a mulheres com PE do sul da Índia.

O estudo feito por Deepthi e colaboradores (2015) analisaram os haplótipos dos polimorfismos C869T e C-509T e a predisposição ao desenvolvimento de PE e encontraram que os haplótipos C-C e T-T estão associados à suscetibilidade aumentada para essa doença. Os dois polimorfismos estudados são funcionais. O C-509T afeta a expressão do *TGF-β1* por

estar localizado na região promotora e o polimorfismo C869T, localizado no éxon 1, influencia na secreção do TGF- β 1, podendo causar elevação dos níveis séricos circulantes, sendo prejudicial a gestação normal. Ressalta-se que não existem trabalhos na literatura que relacionem apenas os dois polimorfismos estudados no presente trabalho e o desenvolvimento de PE.

A análise de regressão logística observou que mulheres com história familiar de PE possuíam um risco aumentado em dezessete vezes de desenvolver a doença quando comparadas com mulheres sem recorrência familiar. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados na Noruega e no Reino Unido onde filhas de mulheres que tiveram PE apresentaram duas vezes mais risco de desenvolver essa doença quando comparadas com mulheres sem histórico familiar. O estudo ainda observou que mulheres não nascidas de uma gestação com PE, mas que relatavam histórico familiar dessa doença possuíam um risco maior em relação às mulheres sem histórico familiar (AYORINDE, BHATTACHARYA, 2017; SKJAERVEN et al., 2005).

A presença de um componente hereditário no desenvolvimento de PE também foi observado por Mütze e colaboradores (2007), demonstrando que 25 a 31% das filhas de mulheres que tiveram PE desenvolvem essa patologia em sua gestação. Cnattingius e colaboradores (2004) sugeriram que 67% da suscetibilidade a PE é causada por fatores genéticos, enquanto 32% são de fatores diversos, reforçando a natureza multifatorial da PE.

A análise de regressão logística também demonstrou que mulheres primíparas apresentaram um risco aumentado em dezenove vezes de desenvolver PE quando comparadas as mulheres com mais de duas gestações. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Khader e colaboradores (2017), com mulheres da Jordânia selecionadas entre 2011 e 2012, onde foi observado um risco aumentado em duas vezes em desenvolver PE na primeira gestação do que em gestações posteriores.

Hernandez-Dias e colaboradores (2009) também demonstraram que mulheres múltíparas sem história de PE tinham apenas 1% de risco de desenvolver a doença, enquanto mulheres com PE em uma ou duas gestações consecutivas apresentaram de 15 a 30% de risco de recorrência, respectivamente. Esses dados reforçam a teoria de que a PE é uma doença de primeira gestação.

O risco aumentado de desenvolver PE na primeira gestação pode ser explicado pela imaturidade do sistema imunológico materno. O aumento da PE em primíparas pode ser justificado pela diminuição do tempo de exposição aos antígenos paternos, assim, o desenvolvimento da tolerância imunológica necessária ao aloenxerto fetal fica prejudicado,

ocorrendo a rejeição e, com isso, a suscetibilidade a PE torna-se aumentada (HERNANDEZ-DIAS et al., 2000; SAFTLAS et al., 2014). Fato que não é visto a partir da segunda gestação, pois as mulheres já estão expostas aos antígenos dos seus parceiros por um espaço de tempo mais longo e a proteção ao feto torna-se eficaz, reduzindo os casos de PE (SHARKEY et al., 2007).

O tabagismo também foi analisado na regressão logística, no entanto, não foi associado ao risco de desenvolver PE. O tabagismo materno durante a gestação é conhecido por aumentar o risco de baixo peso ao nascimento e prematuridade, que são fatores encontrados na doença (ZETTERSTROM et al., 2007). O estudo realizado por Mattsson e colaboradores (2015), com mulheres da Suécia, está de acordo com o presente estudo, pois não encontraram associação entre o tabagismo e as manifestações clínicas da PE.

Sabe-se que a PE é um transtorno complexo, com gravidade clínica variada, portanto é esperado que diversos genes estejam envolvidos nos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento dessa doença.

Trata-se do primeiro estudo que busca avaliar a contribuição dos polimorfismos C-509T e G-800A, do gene *TGF-β1* e o desenvolvimento de PE em uma população brasileira. Embora não tenha sido encontrada associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento de PE, deve-se considerar o fato da população ser heterogênea, o que não ocorre com populações vistas em outros estudos, como em mulheres do Reino Unido ou iranianas.

Portanto, são necessários mais estudos desse tipo com o intuito de avaliar o papel dos polimorfismos genéticos e a PE, para que assim se possa ter um melhor entendimento da doença e descobrir possíveis biomarcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico precoce dessas mulheres.

3 CONCLUSÃO

Não há associação entre os polimorfismos C-509T e G-800A do gene *TGF-β1* e PE na casuística estudada.

Não há associação entre as frequências dos haplótipos e os modelos de herança testados e a suscetibilidade a PE.

Há associação entre a recorrência familiar, com aumento de dezessete vezes, e a primiparidade, com aumento de dezenove vezes no risco de desenvolver PE.

4 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A; et al. Acute kidney injury in pregnancy-current status. **Adv Chronic Kidney Dis**, v.20(3), p.215-222, 2013.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V; et al. Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature immunology**, v.8, p.942-949, 2007.
- AGUILAR-DURAN, M; et al. Haplotype analysis of TGF- β 1 gene in a preeclamptic population of northern Mexico. **Pregnancy Hypertens**, v.4(1), p.14-18, 2014.
- ALUVIHARE, V.R, KALLIKOURDIS, M, BETZ, A.G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nat Immunol**, v.5(3), p.266-271, 2004
- AMANI, D; et al. The promoter region (-800, -509) polymorphisms of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) gene and recurrent spontaneous abortion. **J Reprod Immunol**, v.62(1-2), p.159-166, 2004.
- American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists task force on hypertension in pregnancy. **Obstet Gynecol**, v.122(5), p.1122, 2013.
- ANTONIPILLIAI, I; et al. Transforming growth factor-beta is a renin secretagogue at picomolar concentrations. **Am J Physiol**, v.265(4 Pt 2), p.537-41, 1993.
- AYORINDE, A.A; BHATTACHARYA, A. Inherited predisposition to preeclampsia: Analysis of the Aberdeen intergenerational cohort. **Pregnancy Hipertens**, v.8, p.37-41, 2017.
- BENYO, D.F, MILES, T.M, CONRAD, K.P. Hypoxia stimulates cytokine reproduction by villous explants from the human placenta. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82(5), p.1582-1588, 1997.
- BERRY, C; ATTA, M.G. Hypertensive disorders in pregnancy. **World J Nephrol**, v.6(5), p.418-28, 2016.
- BILATE, A.M; LAFAILLE, J.J. Induced CD4(+)Foxp3(+) regulatory T Cells in immune tolerance. **Annu Rev Immunol**, v.30, p.733-758, 2012.
- BLOBE, G.C; SHIEMANN, W.P; LODISH, H.F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N Engl J Med**, v.342, p.1350-1358, 2000.
- BOMBELL, S; McGUIRE, W. Tumor necrosis factor (-308A) polymorphism in pre-eclampsia: meta-analysis of 16 case-control studies. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v.48(6), p. 547-551, 2008.
- BORDER, W.A; NOBLE, N.A. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. **Hypertension**, v.31(1 Pt2), p.181, 1998.

- BORZYCHOWSKI, A.M; et al. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and preeclampsia may be mediated by natural killer cells. **Eur J Immunol**, v.35(10), p.3054-3063, 2005.
- BOWEN, J.M; et al. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. **Placenta**, v.23(4), p.239-56, 2002.
- BURTON, G.J; JAUNIAUX, E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. **J Soc Gynecol Investig**, v.11(6), p.342-52, 2004.
- BURTON, G.J; JAUNIAUX, E; WATSON, A.L. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited. **Am J Obstet Gynecol**, v.181(3), p.718-24, 1999.
- BROSENS, J.J; et al. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v.200(6), p.615, 2009.
- CANNIGIA, I; et al. Regulation of trophoblast differentiation by TGF- β 1 and TGF- β 3 via endoglin. **Placenta**, v.17, p.36, 1996.
- CHAN, J. C; et al. The central roles obesity-associated dyslipidaemia, endothelial activation and cytokines in the Metabolic Syndrome-an analysis by structural equation modeling. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, p.994-1008, 2002.
- CHEN, W; et al. Conversion of peripheral CD4+ CD252 naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF-b induction of transcription factor Foxp3. **J Exp Med**, v.198(12), p.1875-86, 2003.
- CLARK, A.G. The Role of Haplotypes in Candidate Gene Studies. **Genet Epidemiol**, v.27(4), p.321-33, 2004.
- CLARK, D.A; COKER, R. Transforming growth factor beta (TGF-beta). **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, p.293-298, 1998.
- CNATTINGIUS, S; et al. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. **Am J Med Genet A**, v.130A(4), p.365-371, 2004.
- CORNELIUS, D.C; et al. Administration of interleukin-17 soluble receptor C suppresses TH17 cells, oxidative stress, and hypertension in response to placental ischemia during pregnancy. **Hypertension**, v.62(6), p.1068-73, 2013.
- CROME, S.Q., WANG, A.Y., LEVINGS, M.K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clin Exp Immunol**, v.159(2), p.109-19, 2010.
- CUNHA, V.M.P et al. Polimorfismos genéticos do fator de crescimento do endotélio vascular na pré-eclampsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.33, p.158-163, 2011.

- DAHER, S; et al. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **J Reprod Immunol**, v.62, p.151-7, 2004.
- DAVIES, E.L; BELL, J.S; BHATTACHARYA, S. Preeclampsia and preterm delivery: a population-based case-control study. **Hypertens Pregnancy**, v.35(4), p.510-19, 2016.
- DEEPTHI, G; et al. TGFB1 Functional Gene Polymorphisms (C-509T and T869C) in the Maternal Susceptibility to Pre-eclampsia in South Indian Women. **Scand J Immunol**, v.82(4), p.390-7, 2015.
- DHARIWAL, N.K; LYNDE, G.C. Update in the Management of Patients with Preeclampsia. **Anesthesiol Clin**, v.35(1), p.95-106, 2017.
- DHILLION, P; et al. IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. **Am J Physiol Regul Integr**, v.303(4), p.353-358, 2012.
- DIDION, S.P.; et al. Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction. **Hypertension**, v.54(3), p.619-24, 2009.
- DOCHERTY, N.G; et al. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1): a potential recovery signal in the post-ischemic kidney. **Ren Fail**, v.24(4), p.391-406, 2002.
- DUCKITT, K; HARRINGTON, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. **BMJ**, v.330(7491), p.565, 2005.
- FEIZOLLAHZADEH, S; et al. Promoter region polymorphisms in the transforming growth factor beta-1 (TGFβ1) gene and serum TGFβ1 concentration in preeclamptic and control Iranian women. **J Reprod Immunol**, v.94(2), p.216-21, 2012.
- FERRARA, N; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**, v.18(1), p.4-25, 1997.
- GARCÍA-ORTIZ, L; et al. Probable association between preeclampsia/eclampsia and paternal age: a pilot study. **Ginecol Obstet Mex**, v.79(4), p.190-5, 2011.
- GATHIRAM P; MOODLEY J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. **Cardiovasc J Afr**, v.27(2), p.71-8, 2016.
- GENC, H; et al. Transforming growth factor β (TGF-β) levels in otherwise healthy subjects with impaired glucose tolerance. **Endokrynol Pol**, v.61, p.691-694, 2010.
- GIULIANI, E.; PARKIN, K.L.; LESSEY, B.A.; YOUNG, S.L. & FAZLEABAS, A.T. Characterization of uterine NK cells in women with infertility or recurrent pregnancy loss and associated endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v.72(3), p.262-9, 2014.
- GODIN, I; WYLIE, C.C. TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. **Development**, v.113, p.1451-7, 1991.

- GOLDENBERG, R.L; et al. Epidemiology and causes of preterm birth. **Lancet**, v.371, p.75-84, 2008.
- GRAHAM, C.H; LALA, P.K. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ. **J Cell Physiol**, v.148(2), p.228-34, 1991.
- GRAINGER, D.J; et al. Genetic control of the concentration of transforming growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**, v.8(1), p.93-97, 1999.
- GRESSNER, A.M; et al. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. **Front Biosci**, v.7, p.793-807, 2002.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à Genética**. Genética de Populações.10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 556-582 p.
- GUZOWSKI, D; et al. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin-10 by denaturing high performance liquid chromatography. **J Biomol Tech**, v.16(2), p.154-66, 2005.
- HAIG, D. Alteration of generations: genetic conflicts of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v.35(3), p.226-32, 1996.
- HARAM, K; et al. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. **J Pregnancy**, v.2, p.1-13, 2014.
- HARMON, A.C; et al. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. **Clin Sci Lond**, v.130(6), p.409–419, 2016.
- HARMON, Q.E; et al. Risk of fetal death with preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v.125(3), p.628-635, 2015.
- HERNANDEZ-DIAS, S; TOH, S; CNATTINGIUS, S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. **BMJ**, v.18(338), p.2255, 2009.
- HERNÁNDEZ-VALENCIA, M; et al. Barrier family planning methods as risk factor which predisposes to preeclampsia. **Ginecol Obstet Mex**, v.68, p.333–8, 2000.
- HSIEH, Y.Y; et al. Polymorphism for Transforming Growth Factor Beta 1-509 (TGF-B1-509): Association with Endometriosis. **Biochem Genet**, v.43(5-6), p.203-210, 2005.
- HSU, P; NANAN, R.K.H. Innate and adaptive immune interactions at the foetal-maternal interface in healthy human pregnancy and preeclampsia. **Front Immunol**, v.28, p.125, 2014.
- HUPPERTZ, B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. **Hypertension**, v.51(4), p.970-975, 2008.
- IMAMURA, T; et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. **Nature**, v.389(6651), p.622-6, 1997.

IRANI, R.A; et al. Autoantibody-mediated angiotensin receptor activation contributes to preeclampsia through tumor necrosis factor- α signaling. **Hypertension**, v.55(5), p. 1246–53, 2010.

ITO, T; et al. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. **Immunity**, v.28(6), p.870–80, 2008.

JAUNIAUX, E; POSTON, L; BURTON, G.J. Placental-related diseases of pregnancy: Involvement of oxidative stress and implications in human evolution. **Hum Reprod Update**, v.12(6), p.747-55, 2006.

KAJDANIUK, D; et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – part 1: in physiology and pathophysiology. **Endokrynol Pol**, v.62(5), p.444-45, 2011.

KALKUNTE, S; et al. Vascular IL-10: a protective role in preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v.88(2), p.165-9, 2011.

KATO, Y.; INOUE, H.; YOSHIOKA, U., et al. Effects of transforming growth factor β 1, interleukin-1b, tumor necrosis factor α and platelet-derived growth factor on the collagen synthesis and the proliferation of periacinal fibroblastoid cells isolated and cultured from rat pancreatic acini. **Pathophysiology**, v.3, p.175–179, 1999.

KATSI, V; et al. Preeclampsia: What Does the Father Have to Do with It? **Curr Hypertens Rep**, v.17(8), p.60, 2015.

KHADER, Y.S; et al. Preeclampsia in Jordan: incidence, risk factors, and its associated maternal and neonatal outcomes. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v.8, p.1-7, 2017.

KHAN, K.S; et al. WHO analysis of causes of maternal death: A systematic review. **Lancet**, v.367(9516), p.1066-74, 2006.

KNIGHT, M. Eclampsia in the United Kingdom 2005. **BJOG**, v.114, p.1072, 2007.

KRZEMIEN, S; KNAPCZYK, P. Current review on the role of transforming growth factor beta (TGF- β) in some pathological disorders. **Wiad Lek**, v.58(9-10), p.536-9, 2005.

LALA, P.K; CHAKRABORTY, C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. **Placenta**, v. 24(6), p.575–87, 2003.

LARESGOITI-SERVITJE, E; GOMEZ-LOPEZ, N; OLSON, D.M. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. **Hum Reprod Update**, v.16(5), p.510-24, 2010.

LEE, J.L; et al. Transforming growth factor- β 1 gene polymorphisms in Korean women with endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v.66, p.428-34, 2011.

LI, X; SHEN, L; TAN, H. Polymorphisms and plasma level of transforming growth factor- β 1 and risk for pre-eclampsia: a systematic review. **PLoS ONE**, v.9(5), p.1-8, 2014.

- LOEYS, B.L; et al. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. **N Engl J Med**, v.355(8), p.788-98, 2006.
- LUEDECKING, E.K; et al. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. **Hum Genet**, v.106(5), p.565-569, 2000.
- LUDVIKSSON, B.R; SEEGER, D; RESNICK, A.S. The effect of TGF-beta-1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2. **Eur J Immunol**, v.30(7), p.2101-11, 2000.
- LYKKE, J.A; PAIDAS, M.J; LANGHOFF-ROOS, J. Recurring Complications in Second Pregnancy. **Obstet Gynecol**, v.113 (6), p.1217-1224, 2009.
- MAITRA, U; et al. Differential regulation of Foxp3 and IL-17 expression in CD4 T helper cells by IRAK-1. **J Immunol**, v.182(9), p.5763-9, 2009.
- MAREK, A; et al. TGF- β (transforming growth factor- β) in chronic inflammatory conditions – a new diagnostic and prognostic marker? **Med Sci Monit**, v.8(7), p.145-151, 2002.
- MARSHALL GRAVES, J.A. Genomic imprinting, development and disease -- is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? **Reprod Fertil Dev**, v.10(1), p.23-9, 1998.
- MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, v.6, p. 597-641, 1990.
- MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annu Rev Biochem**, v.67, p.753-91, 1998.
- MASSAGUÉ, J.; WOTTON, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. **EMBO J**, v.19(8), p.1745-54, 2000.
- MATTHIESENA, L; et al. Immunology of preeclampsia. **Chemich Immunol Allerg**, v.89, p.49-61, 2005.
- MATTSSON, K; et al. Maternal Smoking during Pregnancy and Daughters' Preeclampsia Risk. **PLoS ONE**, v.10(12), p.1-13, 2015.
- MILNE, F; et al. The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): How to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. **BMJ**, v.330(7491), p.576-80, 2005.
- MINCHEVA-NILSSON, L; BARANOV, V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. **Am J Reprod Immunol**, v.72(5), p.440-57, 2014.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol**, v.2(9), p.656-63, 2002.
- MOLVAREC, A; et al. Association between tumor necrosis factor (TNF)-alpha G-308A gene polymorphism and preeclampsia complicated by severe fetal growth restriction. **Clin Chim Acta**, v.392(1-2), p.52-7, 2008.

- MORENO, M; et al. Atorvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammatory actions in the liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.296(2), p.147-56, 2008.
- MORRIS, R.W; KAPLAN, N.L. On the Advantage of Haplotype Analysis in the Presence of Multiple Diseases Susceptibility Alleles. **Genetic Epidemiology**, v.23(3), p.221-33, 2002.
- MOUSTAKA, A; HELDIN, C.H. Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci**, v.118, p.3573-84, 2005.
- MUTTER, W.P; KARUMANCHI, S.A. Molecular Mechanisms of Preeclampsia. **National Institute of Health**, v.75(1), p.1-8, 2008.
- MÜTZE, S; RUFNIK-SHÖNEBORN, S; ZERRES, K; RATH, W. Genes and the preeclampsia syndrome. **J Perinat Med**, v. 36(1), p.154-158, 2007.
- NAKAO, A; et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. **Nature**, v.389(6651), p.631-5, 1997.
- NIU, W. Evaluation of Transforming Growth Factor Beta-1 Gene 869T/C Polymorphism with Hypertension: A Meta-Analysis. **Int J Hypertens**, 2011.
- NISSAISORAKARN, P; SHARIF, S; JIM, B. Hypertension in Pregnancy: Defining Blood Pressure Goals and the Value of Biomarkers for Preeclampsia. **Curr Cardiol Rep**, v.18(12), p.131, 2016.
- ODEGARD, R.A; et al. Preeclampsia and fetal growth. **Obstet Gynecol**, v.96(6), p.950-5, 2000.
- PAPANICOLAOU, D.A; et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. **Ann Intern Med**, v.128(2), p.127-37, 1998.
- PAULI, J.M; REPKE, J.T. Preeclampsia Short-term and Long-term Implications. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v.42(2), p.299-313, 2015.
- PEGORARO, R.J; CHIKOSI, A; ROM, L; ROBERTS, C; MOODLEY, J. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in black South Africans and the association with preeclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.83(5), 2004.
- PERAÇOLI, J.C; PARPINELLI, M.A. Síndromes Hipertensivas da gestação: identificação de casos graves. **Ver Bras Ginecol Obstet**, v.27, p.627-34, 2005.
- PERAÇOLI, M.T; et al. Platelet aggregation and TGF-beta(1) plasma levels in pregnant women with preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v.79(1), p.79-84, 2008.
- PINHEIRO, M.B; et al. Severe preeclampsia: association of genes polymorphisms and maternal cytokines production in Brazilian population. **Cytokine**, v.71(2), p.232-7, 2015.

PISSETTI, C.W; et al. Protective role of the G allele of the polymorphism in the Interleukin 10 gene (-1082G/A) against the development of preeclampsia. **Rev Bras Ginecol Obst**, v.36(10), p.456-60, 2014.

POWER, L.L; et al. Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth. **J Reprod Immunol**, v.56(1-2), p.19-28, 2002.

QUINN, K.H; et al. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells. **J Reprod Immunol**, v.91(1-2), p.76–82, 2011.

REDMAN, C.W; SARGENT, I.L. Latest advances in understanding preeclampsia. **Science**, v.308(5728), p.1592-4, 2005.

REDMAN, C.W; SARGENT, I.L. Immunology of pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v.63, p.534–543, 2010.

RIZZINO, A. Transforming growth factor-p: Multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. **Dev Biol**, v.130(2), p.411-22, 1988.

ROBERTS, A.B; et al. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues. **Proc Natl Acad Sci**, v.78(9), p.5339–43, 1981.

ROBERTS, A.B; SPORN, M.B. The transforming growth factor: Peptide Growth Factors and Their Receptors. **New York: Springer-Verlag**, p.419-472, 1990.

ROBERTSON, S.A; et al. Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. **J Reprod Immunol**, v.57(1-2), p.109-28, 2002.

ROJAS-SUAREZ, J; VIGIAL DE GRACIA, P. Pre-eclampsia-eclampsia admitted to critical care unit. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v.25(10), p.2051-4, 2012.

ROS, H.S; et al. Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. **Am J Med Genet**, v.91(4), p.256–260, 2000.

ROTH, I., FISHER, S.J. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. **Dev Biol**, v.205(1), p.194-204, 1999.

SAFTLAS, A.F; et al. Cumulative exposure to paternal seminal fluid prior to conception and subsequent risk of preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v.101-102, p.104-10, 2014.

SAIGAL, S; DOYLE, L.W. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. **Lancet**, v.371(9608), p.261-9, 2008.

SAITO, S. Th17 cells and regulatory T cells: new light on pathophysiology of preeclampsia. **Immunol Cell Biol**, v.88(6), p.615–7, 2010.

SAITO, S; SAKAI, M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v.59, p.161–73, 2003.

SAKAGUCHI, S; et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v.133(5), p.775–787, 2008.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. E. *Molecular Cloning, a laboratory manual* New York Cold Spring Harbor 1989.

SASAKI, Y; et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. **Clin Exp Immunol**, v.149(1), p.139–145, 2007.

SASAKI, Y; et al. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. **Mol Hum Reprod**, v.10(5), p.347–53, 2004.

SHARKEY, D; et al. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. **Mol Hum Reprod**, v.13(7), p.491-501, 2007.

SKJAERVEN, R; et al. Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. **BMJ**, v.331(7521), p.877, 2005.

SHULL, M.M; et al. The importance of transforming growth factor-beta 1 in immunological homeostasis as revealed by gene ablation in mice. In C Jacob (ed): "Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice." **Academic Press La**, p135-159, 1994.

SIBAI, B.M. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v.102(1), p.181-192, 2003.

SIMPSON H; et al. Transforming growth factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. **Placenta**, v.23(1), p.44-8, 2002.

SINGH, R. Hypertensive disorders in pregnancy. **Clin Nephrol**, v.2, p.47-55, 2013.

SOHLBERG, S; et al. Placental perfusion in normal pregnancy and early and late preeclampsia: a magnetic resonance imaging study. **Placenta**, v.35(3), p.202-6, 2014.

SOWMYA, S; et al. Role of IL-10-819(T/C) promoter polymorphism in preeclampsia. **Inflammation**, v.37(4), p.1022-7, 2014.

STAFF, A.C; et al. Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. **Hypertension**, v.61(5), p.932-942, 2013.

STEEGERS, E.A; et al. Pre-eclampsia. **Lancet**, v.376, p.631-44, 2010.

STONEK, F et al., A tumor necrosis factor-alfa promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1652 pregnant women. **Reproductive science**, v.14(5), p.425-429, 2007.

SYRRYS, P; et al. Transforming growth factor-B1 gene polymorphisms and coronary artery disease. **Clin Sci**, v.95, p.659–667, 1998.

TAGA, K., TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. **J Immunol**, V.148(4), p.1143-8, 1992.

THAN, N.G; et al. Placental Protein 13 (PP13) - A Placental Immunoregulatory Galectin Protecting Pregnancy. **Front Immunol**, v.5, p.348, 2014.

TILBURGS, T; et al. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4+CD25 bright regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. **J Immunol**, v.180(8), p.5737-45, 2008.

TOLDI, G; et al. Increased prevalence of IL-17-producing peripheral blood lymphocytes in pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v.66(3), p.223-9, 2011.

TURKAY, C; et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on experimental hepatic fibrogenesis. **Dig Dis Sci**, v.53(3), p.789-93, 2008.

TZAKAS, P; et al. Transforming growth factor beta-1 (TGFB1) and peak bone mass: association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the heel. **BMC Musculoskelet Disord**, v.14, p.6-29, 2005.

VALENZUELA, F.J; et al. Pathogenesis of preeclampsia: The genetic component. **J Pregnancy**, v.2012, p.1-8, 2011.

VEENSTRA van NIEUWENHOVEN, A.L; HEINEMAN, M.J; FAAS, M.M. The immunology of successful pregnancy. **Hum Reprod Update**, v.9, p.347-57, 2003.

VENKATESHA, S; et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med**, v.12(6), p.642-9, 2006.

Von DADELSZEN, P; MAGEE, L.A; ROBERTS, J.M. Subclassification of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v.22920, p.143-148, 2003.

WALKER, J.J. Pre-eclampsia. **Lancet**, v.356, p.1260-5, 2000.

VURAL, P; et al. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 polymorphisms in preeclampsia. **J Obstet Gynaecol Res.**, v.33(1), p.64-71, 2010.

ZETTERSTROM, K. Being born small for gestational age increases the risk of severe pre-eclampsia. **BJOG**, v.114(3), p.319-24, 2007.

WANG, W.J; et al. Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. **J Reprod Immunol**, v.84(2), p.164-70, 2010.

WILCZYNSKI, J.R; et al. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.109(1), p.8-15, 2003.

WILCZYNSKI, J.R; et al. Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and preeclampsia. **Mediators Inflamm**, v.11(2), p.105-11, 2002.

WING, K; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. **Nat Immunol**, v.11(1), p.7–13, 2010.

WOOD, K.J; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nat Rev Immunol**, v.3(3), p.199–210, 2003.

YANG, Y; HUANG, C.T; HUANG, X; PARDOLL, D.M. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. **Nat Immunol**, v.5(5), p.509-15, 2004.

YANG, H; et al. Polymorphisms and haplotypes of the TGF- β 1 gene are associated with risk of polycystic ovary syndrome in Chinese Han women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.186, p.1-7, 2015.

YAN-YAN, L. Transforming growth factor beta1 +869T/C gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2708 participants in the Chinese population. **Intern Med**, v.50(10), p.1089-92, 2011.

YAYAMA, K; et al. Angiotensin II regulates liver regeneration via type 1 receptor following partial hepatectomy in mice. **Biol Pharm Bull**, v.31(7), p.1356-61, 2008.

YOSHIJI, H; et al. Renin-angiotensin system inhibitors as therapeutic alternatives in the treatment of chronic liver diseases. **Curr Med Chem**, v.14(26), p.2749-54, 2007.