

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Avaliação genética e funcional de *FOXP3*, *IL17A* e dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias em mulheres com pré-eclâmpsia

Uberaba
2018

Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka

Avaliação genética e funcional de *FOXP3*, *IL17A* e dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias em mulheres com pré-eclâmpsia

Tese apresentada ao Programa 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 Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Co-orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Uberaba, 2018

SARAH CRISTINA SATO VAZ TANAKA

Avaliação genética e funcional de *FOXP3*, *IL17A* e dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias em mulheres com pré-eclâmpsia

Tese apresentada ao Programa 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 Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Co-orientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Eny Maria Goloni Bertollo

Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

Profa. Dra. Alessandra Bernadete Trovó de Marqui

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva

Profa. Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

Uberaba, de 09 de novembro de 2018

Dedicatória

Dedico ao meu irmão Tancredo e ao meu pai Cláudio, anjos que me acompanham sempre. A minha mãe Célia, exemplo de superação. Aos amigos, familiares e pacientes. Ao meu marido Anderson, fonte de incentivo e apoio nesta caminhada. Ao meu Antônio, razão da minha vida.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu chegar até aqui, colocando pessoas especiais em meu caminho. Obrigada Senhor por suas bênçãos, que eu seja sempre merecedora delas e de seu amor!

Agradeço a minha mãe Célia, exemplo de superação e força. Mãe, você é a fonte que me inspira e me motiva. Felizes os que têm o privilégio de partilhar a vida com você. Muito obrigada por ser quem você é. Agradeço ao meu pai Cláudio e meu irmão Tancredo, meus amores além dessa vida. Obrigada por tudo! Foi um prazer. Até qualquer dia!

Agradeço a minha família pelo apoio.

Aos amigos, velhos e novos, agradeço por desfrutar da amizade e consideração de todos. Obrigada pelo incentivo! À minha amiga Bruna, da Biomed XX para a vida, obrigada pela companhia, pelas conversas, pela ajuda. Agradeço a minha amiga Andrezza por sua ajuda e companhia durante nossos plantões no pronto atendimento da GO. Aos amigos do laboratório de Genética: Ricardo, Chris, Gustavo, Elaine, Carlos, Helô, Mariana. Obrigada pela amizade, bom humor e pelos lanches da tarde.

Meu agradecimento às professoras Roseanne Lopes da Silva Grecco, Alessandra B. Trovó de Marqui, Mariângela Torreglosa Ruiz Cintra, Cristina Wide Pissetti e ao professor Virmond Rodrigues Júnior pela ajuda e disponibilidade.

Obrigada Dra. Marina Carvalho Paschoinni por abrir as portas do serviço de Ginecologia e Obstetrícia, permitindo a realização desse trabalho.

A todos os alunos que passaram pelo laboratório de Genética, obrigada por contribuírem com meu crescimento acadêmico.

Obrigada a todas as participantes desse estudo, em especial às mulheres com pré-eclâmpsia, que mesmo em um momento delicado de suas vidas aceitaram participar deste trabalho em prol do bem comum. Vocês são guerreiras, que Deus as abençoe!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pela oportunidade e a CAPES pelo incentivo financeiro.

Meu eterno agradecimento a minha orientadora, professora Marly Aparecida Spadotto Balarin pelos ensinamentos, dedicação, paciência. Agradeço pela confiança e pelos 8 anos de parceria. Obrigada por contribuir com minha formação. Esse trabalho só foi possível graças a você!

Aos membros da banca, obrigada pela disponibilidade.

Ao meu marido Anderson, companheiro de tantas lutas. Obrigada pela compreensão, apoio e confiança. Você torna meus dias mais alegres e leves. Amo-te!

Agradeço ao meu filho Antônio, que em tão pouco tempo arrombou as portas do meu coração e preencheu minha vida de amor. Filho, você é a certeza dos planos de Deus em minha vida e o motivo que me leva a querer ser melhor a cada dia. Te amo meu japinha!

Por fim, agradeço a todos que dividiram comigo essa jornada e que de alguma forma contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional. Minha eterna gratidão!

Epígrafe

“Mãe... São três letras apenas as deste nome bendito. Também o céu tem três letras e nelas cabe o infinito”.

Mário Quintana

Resumo em língua vernácula

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multissistêmica característica da gravidez que contribui significativamente para a morbidade e mortalidade materna e neonatal. Descobertas recentes sugerem que mudanças significativas no sistema imune estão envolvidas em sua etiologia. Tem sido proposto que a redução de células T reguladoras (Tregs) com consequente falha na tolerância imunológica promova o aumento de citocinas pró-inflamatórias, gerando disfunção endotelial e estresse oxidativo. O fator de transcrição FOXP3 é fundamental para induzir a diferenciação das células Tregs e polimorfismos localizados na região promotora deste gene podem alterar a produção e função dessas células. A IL17A é a principal citocina secretada por células Th17 e em excesso induz inflamação tecidual e polimorfismos nesse gene já foram associados à patogênese de muitas doenças autoimunes e inflamatórias. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar os polimorfismos rs3761549C>T, rs3761548A>C e rs2232365A>G no gene *FOXP3* e rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A*, a expressão dos referidos genes na PE e níveis placentários de IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8. Participaram desse estudo 263 mulheres, divididas em grupo de estudo (PE=89) e grupo controle (C=174). A genotipagem das amostras foi realizada por PCR em Tempo Real. A expressão relativa dos genes *FOXP3* e *IL17A* foi realizada por qPCR em 17 amostras de placenta do grupo PE e 14 do grupo Controle. A quantificação das citocinas foi realizada por citometria de fluxo. Variáveis contínuas foram descritas por média \pm desvio padrão e as variáveis categóricas expressas em porcentagem. As comparações estatísticas entre dois grupos foram realizadas com teste t de Student não pareado, teste de Mann-Whitney ou teste do qui quadrado (χ^2). Regressão logística múltipla e algoritmo EM foram utilizados para avaliar os modelos de herança e inferir haplótipos dos polimorfismos estudados, respectivamente. Valores de p <0,05 foram considerados significativos. Não houve associação entre as frequências genótípicas e alélicas, modelos de herança e haplótipos dos polimorfismos investigados e a PE. Os grupos controle dos polimorfismos rs3761548 no gene *FOXP3* e rs4711998 do gene *IL17A* não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Primiparidade e recorrência familiar foram associadas ao risco de PE. Níveis maiores de *FOXP3* foram observados em mulheres com PE, principalmente PE precoce. Os genótipos dos polimorfismos do gene *FOXP3* não alteram sua expressão. Níveis elevados de IL8 e IL6 foram observados em mulheres com PE tardia. Portanto, esse estudo conclui que não há associação entre os polimorfismos rs3761549C>T, rs3761548A>C e rs2232365A>G no gene

FOXP3 e rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A* e PE. Recorrência familiar e primiparidade são consideradas fatores de risco para PE na amostra estudada. Níveis elevados de *FOXP3* estão associados ao desenvolvimento de PE precoce. Altos níveis de IL6 e IL8 estão associados à PE tardia.

Palavras chave: Polimorfismo Genético, Pré-eclâmpsia, Células Th17, Linfócitos T reguladores.

Resumo em língua estrangeira

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a multisystemic disease specific of pregnancy, which is important for maternal and neonatal morbidity and mortality. Recent findings suggest that significant changes in the immune system are involved in PE pathogenesis. It has been proposed that the reduction of regulatory T cells (Tregs) with consequent failure in immunological tolerance promotes the increase of pro-inflammatory cytokines, generating endothelial dysfunction and oxidative stress. FOXP3 is a critical transcription factor to induce differentiation of Tregs, besides polymorphisms located in the promoter region of this gene can alter the production and function of Tregs cells. IL17A is the major cytokine secreted by Th17 cells and in excess induces tissue inflammation. Polymorphisms in *FOXP3* gene have already been associated with the pathogenesis of many autoimmune and inflammatory diseases. Therefore, we investigated rs3761549C> T, rs3761548A> C and rs2232365A> G polymorphisms in *FOXP3* gene and rs4711998 A> G, rs8193036 C>T and rs2275913 A>G polymorphisms in *IL17A* gene. We also quantified these genes and IL12, TNF- α , IL10, IL6 and IL8 levels in PE. Genotyping was performed by Real Time PCR. The relative expression of the *FOXP3* and *IL17A* genes was performed by qPCR in 17 placental samples from the PE group and 14 from the Control group. Cytokine quantification was performed by flow cytometry. Continuous variables were described by mean \pm standard deviation and categorical variables were expressed by percentage. Comparisons between both groups were performed using an unpaired Student's t test, Mann-Whitney U test or Chi square (χ^2) test as appropriate. The genetic models and haplotypes were analyzed by SNPSStat software. Significance was assumed when the statistical tests returned P-values <0.05. A total of 263 women, study group (PE = 89) and control group (C = 174) participated in the study. There was no association between the genotypic and allelic frequencies, as well as the inheritance models for the polymorphisms investigated and the PE. The control group of polymorphisms rs3761548 in the *FOXP3* gene and rs4711998 of the *IL17A* gene were not in Hardy-Weinberg equilibrium. There was no association between haplotypes and PE. Primiparity and familial recurrence were associated with PE risk. The expression of FOXP3 was statistically higher in the PE group. Statistically elevated levels of IL8 and IL6 were observed in women with late-onset PE. Therefore, there is no association between rs3761549C>T, rs3761548A>C and rs2232365A> G in the *FOXP3* gene and rs4711998 A>G; rs8193036 A>T and rs2275913 A>G polymorphisms in the *IL17A* gene and PE. Familial recurrence and

primiparity are considered risk factors for PE in the sample studied. Elevated levels of FOXP3 are associated with the development of early-onset PE. High levels of IL6 and IL8 are associated with late-onset PE.

Keywords: Preeclampsia, Th17 Cells, T-Lymphocytes, Regulatory

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Países que relataram pré-eclâmpsia e eclâmpsia, 2002-2010	31
Figura 02	Papel das células Th17 e Tregs na pré-eclâmpsia	38
Figura 03	Localização cromossômica do gene <i>FOXP3</i>	39
Figura 04	Localização cromossômica do gene <i>IL17A</i>	41
Figura 05	Níveis de expressão do gene <i>FOXP3</i> nos grupos Controle e Pré-eclâmpsia	56
Figura 06	Níveis de expressão do gene <i>FOXP3</i> nos grupos Controle, pré-eclâmpsia precoce e pré-eclâmpsia tardia	57
Figura 07	Comparação entre a expressão do gene <i>FOXP3</i> e os genótipos CC e CT do polimorfismo rs3761549 C>T	58
Figura 08	Comparação entre a expressão do gene <i>FOXP3</i> e os genótipos AA+AC e CC do polimorfismo rs3761548 A>C	58
Figura 09	Comparação entre a expressão do gene <i>FOXP3</i> e os genótipos AA+AG e GG do polimorfismo rs2232365 (A>G)	59
Figura 10	Níveis placentários das citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 nos grupos controle e PE	60
Figura 11	Níveis placentários de citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 nos grupos pré-eclâmpsia precoce e pré-eclâmpsia tardia	61

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Quadro 01	Reagentes para as Soluções A e B	45
Quadro 02	Identificação dos ensaios utilizados para os polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene <i>FOXP3</i> e rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene <i>IL17A</i>	46
Tabela 01	Caracterização da amostra	50
Tabela 02	Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G no gene <i>FOXP3</i>	50
Tabela 03	Modelos de herança dos polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene <i>FOXP3</i> nos grupos Controle e PE	52
Tabela 04	Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A no gene <i>IL17A</i>	53
Tabela 05	Modelos de herança dos polimorfismos rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene <i>IL17A</i> nos grupos Controle e PE	54
Tabela 06	Haplótipos dos genes <i>FOXP3</i> e <i>IL17A</i> . Uberaba, 2018.	55
Tabela 07	Avaliação dos fatores de risco para o desenvolvimento de PE.	55

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOG	Colégio Americano de obstetrícia e ginecologia
AVC	Acidente vascular cerebral
C°	Graus <i>Celsius</i>
C	Controle
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Ct	Ciclo limiar
DP	Desvio padrão
E	Eclâmpsia
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HAC	Hipertensão arterial crônica
HELLP	<i>Haemolysis Elevated Liver enzymes and Low Platelets</i>
IC	Intervalo de confiança
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IPEX	Poliendocrinopatia autoimune ligada ao X
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μ L	Micro litro
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural Killer
η m	Nanômetro
OR	Odds Ratio
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Pré-eclâmpsia
PE/E	Pré-eclâmpsia/Eclâmpsia
PEP	Pré-eclâmpsia precoce
PET	Pré-eclâmpsia tardia
pH	Potencial hidrogeniônico
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Tris EDTA
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	T reguladoras
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
χ^2	Qui-quadrado

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. DESENVOLVIMENTO	30
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1.1 Aspectos gerais da Pré-eclâmpsia	30
2.1.2 Etiologia da PE	33
2.1.3 Genética da PE	34
2.1.4 O papel do sistema imune na Pré-eclâmpsia	35
2.1.5 Células T reguladoras e FOXP3 na Pré-eclâmpsia	38
2.1.6 Células Th17 e IL17A na Pré-eclâmpsia	40
2.2 JUSTIFICATIVA	42
2.3 OBJETIVOS	43
2.4 METODOLOGIA	44
2.4.1 Considerações éticas	44
2.4.2 Critérios de inclusão	44
2.4.3 Casuística	44
2.4.4 Coleta de sangue periférico e lise de células	45
2.4.5 Extração de DNA Genômico	45
2.4.6 Genotipagem das amostras	46
2.4.7 Coleta de tecido placentário e extração de RNA	47
2.4.8 Síntese do DNA complementar (cDNA)	48
2.4.9 Expressão gênica	48
2.4.10 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	49
2.4.11 Análise estatística	49
2.5 RESULTADOS	50
2.5.1 Caracterização da amostra	50
2.5.2 Análise dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G no <i>FOXP3</i>	51
2.5.3 Análise dos polimorfismos rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene <i>IL17A</i>	53
2.5.4 Análise dos haplótipos dos genes <i>FOXP3</i> e <i>IL17A</i>	54
2.5.5 Análise dos fatores de risco para desenvolvimento de PE	55
2.5.6 Análise da expressão dos genes <i>FOXP3</i> e <i>IL17A</i>	56
2.5.7 Comparação entre os genótipos dos polimorfismos rs3761549 (C>T), rs3761548 (A>C) e rs2232365 (A>G) e a expressão do gene <i>FOXP3</i>	57
2.5.8 Dosagem de citocinas	59
2.6 DISCUSSÃO	61
3. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES	84
ANEXOS	98

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é definida pelo desenvolvimento de hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) associada a proteinúria (≥ 300 mg/24 horas ou $\geq 1+$ em exame com fita reagente) após a vigésima semana de gestação, em mulheres previamente normotensas (ACOG, 2013). Na ausência de proteinúria, o diagnóstico de PE pode ser baseado na presença de sinais e sintomas como dor de cabeça, escotomas visuais, dor abdominal, trombocitopenia (plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$), elevação das enzimas hepáticas (dobro do basal), insuficiência renal ($> 1,1$ mg/dL), edema pulmonar ou convulsões (RAMOS, SASS, COSTA, 2017).

Não há informações precisas sobre sua incidência no mundo, mas estima-se que ocorra em 3-5% das gestações (GIORDANO et al., 2014). A PE pode dar origem a um quadro grave denominado eclâmpsia (E), onde ocorrem crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas e/ou coma. A eclâmpsia é comumente precedida por sintomas como cefaléia frontal/occipital, torpor, visão embaçada, náuseas, vômito, dor no hipocôndrio direito ou no epigástrio (STEEGERS et al., 2010). A pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE/E) é um fator de risco significativo para morte materna, morte perinatal, parto prematuro e baixo peso ao nascer (BILANO et al., 2014).

A etiologia da PE ainda não é bem compreendida, mas doença renal crônica, diabetes tipo 1 ou tipo 2, hipertensão arterial crônica (HAC), primiparidade, idade > 40 anos, intervalo > 10 anos entre gestações, índice de massa corporal (IMC) pré-gravídico > 35 , tabagismo e história familiar de PE são alguns fatores de risco conhecidos (NICE, 2011).

A placenta serve como uma interface provisória entre a mãe e o feto em desenvolvimento e a não rejeição da unidade feto placentária pelo sistema imune materno é baseada em mecanismos complexos (CHELBI, VEITIA, VAIMAN, 2013). O equilíbrio entre as células T reguladoras (Tregs) e Th17 orchestra uma complexa rede que interage com outros tipos celulares garantindo a tolerância materna específica aos antígenos fetais e é fundamental para a manutenção da tolerância materna ao feto e o sucesso da gestação, (FIGUEIREDO, SCHUMACHER, 2016; SANTNER-NANAN et al., 2009). Acredita-se que a quebra desse equilíbrio no início da gestação resulte em alterações imunológicas que desregulam a imunidade sistêmica e placentária, contribuindo para a angiogênese comprometida e o desenvolvimento da PE (CHENG, SHARMA, 2016).

Na PE, observa-se redução das células Tregs e elevação de Th17, gerando disfunção endotelial e estresse oxidativo, que contribui para o desenvolvimento de inflamação na

vasculatura e a produção de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina (IL) 6 e IL17 (HARMON et al., 2016; SALAZAR GARCIA et al., 2018; VARGAS-ROJAS, SOLLEIRO, SOTO, 2015).

O fator de transcrição FOXP3 é fundamental para a diferenciação das células T em células Tregs. A importância deste subconjunto de células e o papel do FOXP3 em seu desenvolvimento foi destacado por experimentos que identificaram mutações no gene *FOXP3* capazes de causar uma doença linfoproliferativa autoimune fatal, demonstrando que alterações nesse gene contribuem com a desregulação das células Tregs (BUCKNER, ZIEGLER, 2008). As células Th17 têm sido extensivamente estudadas na última década por serem potentes indutores de inflamação tecidual. Uma das principais citocinas dessa via é a IL17A e polimorfismos nesse gene já foram associados à patogênese de muitas doenças autoimunes e inflamatórias (CHEN, KOLLS, 2017).

A predisposição genética parece ser um importante fator etiológico para o desenvolvimento da PE, pois o agrupamento de casos de PE dentro de famílias sugere a contribuição de genes maternos, fetais e paternos no desenvolvimento da doença (CHESLEY, COOPER, 1986; VALENZUELA et al., 2012).

Recentemente, trabalhos vêm analisando a relação entre genes ligados ao sistema imunológico e a suscetibilidade a PE (ORLANDO et al., 2018, HORTOLANI et al., 2018). Nesse contexto, devido à importância no processo de tolerância materna e manutenção da gestação, torna-se importante investigar genes relacionados às células Treg e Th17 na etiopatogênese da PE. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo investigar os polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* e rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A* e a expressão dos referidos genes, além de quantificar as citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8.

Participaram deste trabalho 89 mulheres com PE, diagnosticadas segundo critérios do Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG) e 174 mulheres sem intercorrências durante a gestação. Este projeto foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (CEP/UFTM) e todas as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A genotipagem das amostras e a expressão gênica foram realizadas por PCR em Tempo Real e as citocinas foram quantificadas por citometria de fluxo.

Embora a hipertensão seja a principal causa de morte materna no Brasil, a escassez de estudos genéticos sobre este tema em nossa população reforça a necessidade de investigar alterações polimórficas em genes de suscetibilidade para o desenvolvimento da PE. Desta forma, o presente estudo pretende contribuir na investigação da influência de fatores genéticos para o desenvolvimento de PE numa população brasileira.

Desenvolvimento

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Aspectos gerais da Pré-eclâmpsia

Desde o século V a.C, Hipócrates já utilizava o termo “*eklampsía*”, que em grego significa relâmpago, para descrever convulsões repentinas que acometiam gestantes. Sintomas semelhantes em grávidas também eram relatados em outras partes do mundo, conforme manuscritos do mesmo período encontrados na Índia, China e Egito. No entanto, naquela época a eclâmpsia não era considerada um distúrbio específico da gestação (BELL, 2010; CHESLEY, 1978). Apenas no século XVII, com o estabelecimento da obstetrícia como uma especialidade médica, ocorreu a primeira descrição sistemática da eclâmpsia por François Mauriceau, que observou um risco aumentado de convulsões em mulheres primigestas, naquela época atribuídas a anormalidades no fluxo loquial ou morte fetal intrauterina (BELL, 2010; MC MILLEN, 2003; SPEERT, 1958).

Com o decorrer do tempo e os avanços na ciência, sintomas como dor de cabeça, alterações visuais, presença de albumina na urina, dor severa no estômago e edema durante os últimos meses da gravidez foram associados ao desenvolvimento de convulsões, o que resultou no conceito de PE, pois gestantes que desenvolviam eclâmpsia apresentavam esses sinais premonitórios (BELL, 2010).

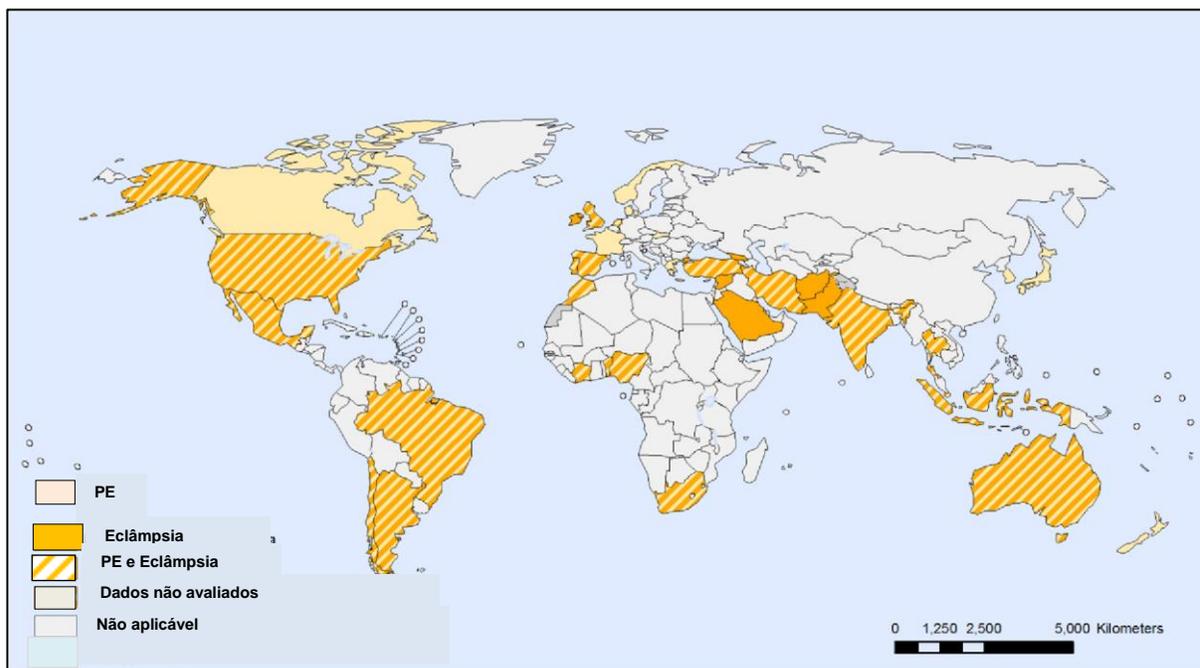
A tríade clássica de sinais e sintomas utilizados para diagnosticar PE era composta por hipertensão, edema e proteinúria, mas, atualmente, o edema foi removido por tratar-se de um achado frequente no terceiro trimestre de gravidez e a proteinúria também não é mais um critério fundamental para o diagnóstico (FOLK, 2018). Portanto, o desenvolvimento de hipertensão após a vigésima semana de gestação, na ausência de proteinúria, mas acompanhada de complicações hematológicas, insuficiência renal, insuficiência hepática, sintomas neurológicos e disfunção útero placentária também preenchem critérios diagnósticos para PE.

A PE é considerada um distúrbio heterogêneo com ampla variabilidade clínica, cujos espectros incluem a eclâmpsia, definida pela presença de crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas, não atribuídas a outras causas e a Síndrome HELLP (*Haemolysis, Elevated Enzymes Liver and Low Platelets*), um acrônimo para hemólise, plaquetopenia e disfunção hepática (JEYABALAN, 2013; SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC, 2005).

Quanto ao início e gravidade dos sintomas, a PE pode ser classificada em precoce (sintomas manifestam-se até 34 semanas de gestação), tardia (sintomas manifestam-se após 34 semanas de gestação) (von DADELSZEN, MAGEE, ROBERTS, 2003), grave (PAS \geq 160mmHg ou PAD \geq 90mmHg, trombocitopenia, disfunção hepática e/ou renal, edema pulmonar e alterações visuais e cerebrais) ou leve (ACOG, 2013).

Estima-se que a PE/E afete 5% das gestações em todo o mundo e seja responsável por cerca de uma a cada sete mortes maternas. Há uma ampla variação regional (**Fig 1**) (ABALOS et al.,2013; SAY et al., 2014), que pode ser atribuída principalmente ao acesso universal ao pré-natal, cuidados oportunos e o manejo adequado das gestantes nos países desenvolvidos, contrastando com a assistência pré-natal precária, falta de acesso a cuidados hospitalares, escassez de recursos e o diagnóstico e tratamento inadequados de pacientes com PE/E nos países em desenvolvimento (GHULMIYYAH, SIBAI, 2012).

Figura 1- Países que relataram pré-eclâmpsia e eclâmpsia, 2002-2010.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, adaptado de Abalos et al., Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. 2013.

Na América Latina, a incidência de PE é de 6% e Equador e Paraguai são os países com o maior número de óbitos maternos e perinatais em sua decorrência (BILANO et al.,2014).

No Brasil, a hipertensão é uma das principais causas de morte materna e prematuridade, no entanto acredita-se que esses dados sejam subestimados e variem de acordo com as regiões do país. Em Minas Gerais, a PE foi a segunda causa de óbitos maternos na última década (GIORDANO et al., 2014; MARTINS et al., 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Diversos fatores de risco para o desenvolvimento da PE já foram identificados, dentre eles história pessoal ou familiar da doença ou de outros distúrbios hipertensivos na gravidez, primiparidade, gestação múltipla, fertilização *in vitro*, idade materna avançada (>40 anos), diabetes preexistente, doença renal, HAC, tabagismo e obesidade (BOKSLAG et al., 2016; DUHIG, VANDERMOLEN, SHENNAN, 2018).

A primiparidade como fator de risco para PE é embasada na disfunção imunológica materna. Estudos propõem que na primeira gestação, o sistema imune materno ainda não está adaptado aos antígenos paternos, sendo mais propenso a desenvolver a doença. Com base nessas observações, a primeira gravidez parece fornecer uma espécie de tolerância imunológica aos antígenos paternos e reduzir a ocorrência de PE em gestações subsequentes, mas essa tolerância é perdida se houver exposição a antígenos paternos distintos ou intervalo de tempo estendido entre a primeira e a segunda gestação (CHENG, SHARMA, 2016). Acredita-se que multíparas possuam baixo risco de desenvolver PE devido ao período prolongado de exposição ao esperma do mesmo parceiro, o que confere a elas tolerância imunológica. No entanto, um longo intervalo entre as gestações ou a troca de parceiro leva a perda dessa tolerância e nesses casos as multíparas têm risco semelhante às primíparas de desenvolver PE (LUO et al., 2007).

Um estudo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre saúde materna e perinatal realizado na África, Ásia e América Latina observou que idade materna inferior a 30 anos e baixa escolaridade eram características sociodemográficas associadas ao maior risco de PE/E, além de características clínicas como alto índice de massa corporal (IMC), nuliparidade, ausência de pré-natal, HAC, diabetes gestacional, doença cardíaca ou renal e anemia severa. Já a realização de 8 ou mais consultas de pré-natal foi considerado um fator protetor (BILANO et al., 2014).

Apesar desses parâmetros serem importantes para rastrear mulheres predispostas, cerca de 60% dos casos de PE ocorrem em mulheres nulíparas saudáveis, sem nenhum fator de risco reconhecível (CORREA et al., 2016).

Embora a PE possa permanecer estável até o parto, alguns casos evoluem rapidamente, resultando em desfechos sérios e até fatais para a mãe e/ou bebê (US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE et al., 2017). Em curto prazo, a PE grave está associada ao desenvolvimento materno de insuficiência renal aguda, edema pulmonar, descolamento de placenta e acidente vascular cerebral (AVC) (FOLK, 2018; HUTCHEON, 2011). Já em longo prazo, a PE aumenta o risco materno de desenvolvimento de HAC, doença cardíaca isquêmica e tromboembolismo (GHULMIYYAH, SIBAI, 2012). Devido a esses fatores, desde 2011 a Associação Americana do Coração incluiu a PE como um grande fator de risco para doença cardiovascular, sendo que mulheres com esse histórico devem ser aconselhadas no pós-parto sobre esses riscos e encaminhadas a um cardiologista para acompanhamento (FOLK, 2018).

Em relação ao feto, a PE está associada a risco de parto prematuro, restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e natimorto. Além disso, estudos demonstram baixo índice de Apgar, maior risco de convulsões febris, encefalopatia e internação em unidade de terapia intensiva neonatal em crianças nascidas após uma gravidez complicada por PE. Essas crianças são mais predispostas a desenvolver HAC, distúrbios metabólicos e epilepsia (BOKSLAG et al., 2016; GHULMIYYAH, SIBAI, 2012; HUTCHEON, 2011).

2.1.2 Etiologia da PE

A fisiopatologia da PE ainda não é completamente esclarecida, mas está claro que seu desenvolvimento requer a presença de placenta, pois a única cura conhecida até o momento é a dequitação da mesma (CORREA et al., 2016). Os mecanismos que desencadeiam a PE são complexos e envolvem a interação entre fatores imunológicos, genéticos e ambientais que levam ao estado antiangiogênico, promovendo o estresse oxidativo e resposta inflamatória materna exacerbada (JEYABALAN, 2013; SIBAI, 2003).

Durante a placentação normal, as células citotrofoblásticas migram para a decídua e invadem o primeiro terço do miométrio, remodelando as arteríolas espiraladas para produzir um sistema vascular de baixa resistência, essencial para o feto (PHIPPS et al., 2016). Na PE, a placentação é caracterizada por remodelação vascular anormal desses vasos, que permanecem estreitos, resultando em hipoperfusão placentária e elevada resistência intravascular (BOKSLAG et al., 2016).

Com a angiogênese prejudicada, ocorrem mudanças na tensão de oxigênio local e alterações imunológicas no microambiente placentário, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, através da ativação de monócitos e neutrófilos (LARESGOITI-SERVITJE et al., 2010; MELLEMBAKKEN et al., 2001; ODEGARD et al., 2000). A disfunção endotelial acompanhada da vasoconstrição generalizada reduz o fluxo sanguíneo para múltiplos órgãos, levando à manifestação clínica característica da PE (PHIPPS et al., 2016).

Desse modo, o surgimento e desenvolvimento da PE parecem ocorrer em duas etapas: primeiramente ocorre a falha da invasão trofoblástica devido a alterações na produção de citocinas imunoreguladoras e fatores angiogênicos e posteriormente ocorre a liberação de células trofoblásticas necróticas e/ou apoptóticas na circulação materna (CORREA et al., 2016; REDMAN, SARGENT, 2010).

2.1.3 Genética da PE

A presença de um componente genético no desenvolvimento da PE é baseada em estudos familiares que relatam que mulheres com parentes em primeiro e segundo grau com PE possuem maior risco desenvolver a doença (FOLK, 2018; SKJAERVEN et al., 2005). No entanto, identificar os genes que contribuem com o desenvolvimento da PE é uma tarefa desafiadora, pois sua natureza poligênica e multifatorial faz com que a prevalência varie de acordo com características geográficas, socioeconômicas e raciais (BUURMA et al., 2013).

Uma ferramenta útil em estudos genéticos, o Equilíbrio de Hardy Weimberg (EHW), é utilizado para avaliar a estrutura das populações, determinando o comportamento de dois alelos em um único locus genético e seus princípios podem ser aplicados para detectar desde erros de genotipagem à suscetibilidade a doenças (RYCKMAN, WILLIAMS, 2008).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são o tipo de variante genética mais comum e ocorrem em aproximadamente 1% da população. Podem afetar a forma como um indivíduo responde ao ambiente e modificar o risco para determinadas doenças, dependendo de sua localização e efeito na regulação gênica e atividade proteica (SACHIDANANDAM et al., 2001).

Os SNPs localizados dentro de regiões codificadoras têm sido extensivamente estudados, incluindo aqueles que causam alterações nos códon de aminoácidos (variantes não sinônimas), que podem levar ao erro de dobramento de proteínas, deslocamento da polaridade, fosforilação

inadequada e outras consequências funcionais que podem resultar em desregulação da transcrição gênica. As variantes localizadas em regiões não codificadoras, embora consideradas não funcionais, podem impactar nas sequências reguladoras de genes, como promotores, intensificadores e silenciadores (CHORLEY et al., 2008). Já os haplótipos referem-se a combinações de alelos marcadores que estão localizados próximos no mesmo cromossomo e que tendem a ser herdados em conjunto, sendo uma ferramenta útil em estudos de associação (LIU, ZHANG; 2008; WEISS, CLARK; 2002). Um haplótipo que contenha muitas mutações pode modificar o modo como os aminoácidos são codificados e auxiliar no entendimento do mecanismo causador de doenças em um gene candidato (SCHAID et al., 2002; LIU, ZHANG et al., 2008).

Nos últimos anos, pesquisadores buscam detectar a associação entre determinadas regiões cromossômicas, genes, haplótipos ou SNPs e a PE, no intuito de identificar genes candidatos ou regiões genéticas de interesse (CHORLEY et al., 2008).

Uma metanálise realizada por Burma e colaboradores (2013) identificou variantes nos genes *CTLA4*, *F2*, *FV* e *LPL* associadas a PE. Abedin e colaboradores (2018) investigaram o gene *ACE*, responsável por produzir uma enzima chave no sistema renina-angiotensina, e encontraram associação entre a variante rs4343 e o risco de PE em mulheres iranianas. Um estudo realizado na Tunísia com os genes *Fas* e *FasL*, que participam do processo de apoptose, encontrou associação entre os polimorfismos *Fas*-670G e *FasL* IVS2nt A124G e PE e suas complicações, como a síndrome HELLP (RAGUEMA et al., 2018).

A associação de polimorfismos em genes relacionados com a coagulação, estresse oxidativo, sistema renal e sistema imune na patogênese da PE sugere o envolvimento de múltiplas vias no desenvolvimento da doença (CORREA et al., 2016; VALENZUELA et al., 2012).

2.1.4 O papel do sistema imune na Pré-eclâmpsia

O sistema imune é responsável por mecanismos de tolerância que estão envolvidos no controle de respostas imunes inapropriadas, através da discriminação de antígenos próprios e não próprios (SAKAGUICHI, 2004). Na gestação, o sistema imunológico deve ser capaz de tolerar antígenos fetais e defender o organismo materno da ação de patógenos (LA ROCCA et al., 2014).

Em termos imunológicos, o feto é chamado de semi alogênico, pela presença de antígenos de origem materna e paterna (LA ROCCA et al., 2014) e embora a organização anatômica da interface materno fetal minimize o contato imunológico, esta estratégia necessita de mecanismos adicionais para ajudar o feto a evadir-se do ataque do sistema imunológico materno (MUNN et al., 1998). Neste sentido, os sistemas imunes inatos e adaptativos atuam em conjunto, auxiliando na remodelação vascular, invasão trofoblástica e tolerância imunológica (HSU, NANAN, 2014; TROWSDALE, BETZ, 2006).

As células T auxiliares CD4+ são capazes de se diferenciar em linhagens específicas Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Tregs) e possuem um importante papel durante a gestação (LA ROCCA et al., 2014; SAITO, 2011).

A implantação do embrião e invasão no endométrio nas primeiras semanas de gestação é caracterizada por uma reação pró-inflamatória, com predomínio do perfil Th1. À medida que a gravidez progride, há um rápido crescimento e desenvolvimento fetal, representado por um ambiente anti-inflamatório e predomínio de citocinas do tipo Th2, onde IL10 ativa a expressão de HLA-G em trofoblastos e monócitos na interface materno fetal, protegendo o feto da rejeição. Ao final da gestação ocorre uma reversão no perfil imunológico, com novamente predominância do estado pró-inflamatório, necessário para o trabalho parto, com a contração do útero e expulsão do feto e da placenta (JIANJUN et al., 2010; MOR et al., 2011).

Um ambiente Th1 forte é prejudicial para a gravidez, pois inibe a invasão do trofoblasto, estimula a apoptose de células trofoblásticas e aumenta a atividade macrófágica, resultando na produção e ativação de fatores nocivos ao embrião que interrompem o suprimento sanguíneo para a placenta em desenvolvimento (VEENSTRA van NIEUWENHOVEN, HEINEMAN, FAAS, 2003).

Novas descobertas sugerem a ocorrência de alterações significativas na resposta imune durante a PE, sugerindo o compartilhamento de características exibidas em distúrbios autoimunes (LAMARCA et al., 2016).

O aumento generalizado de citocinas pró-inflamatórias em placentas de gestantes com PE foi demonstrado em estudos que observaram elevados níveis de IL2 e IL18, que direcionam o balanço da reatividade imunológica para um fenótipo Th1 (HUANG et al., 2005; TRANQUILLI, CORRADETTI, GIANNUBILO, 2008). Especula-se que o predomínio do fenótipo Th1 na PE

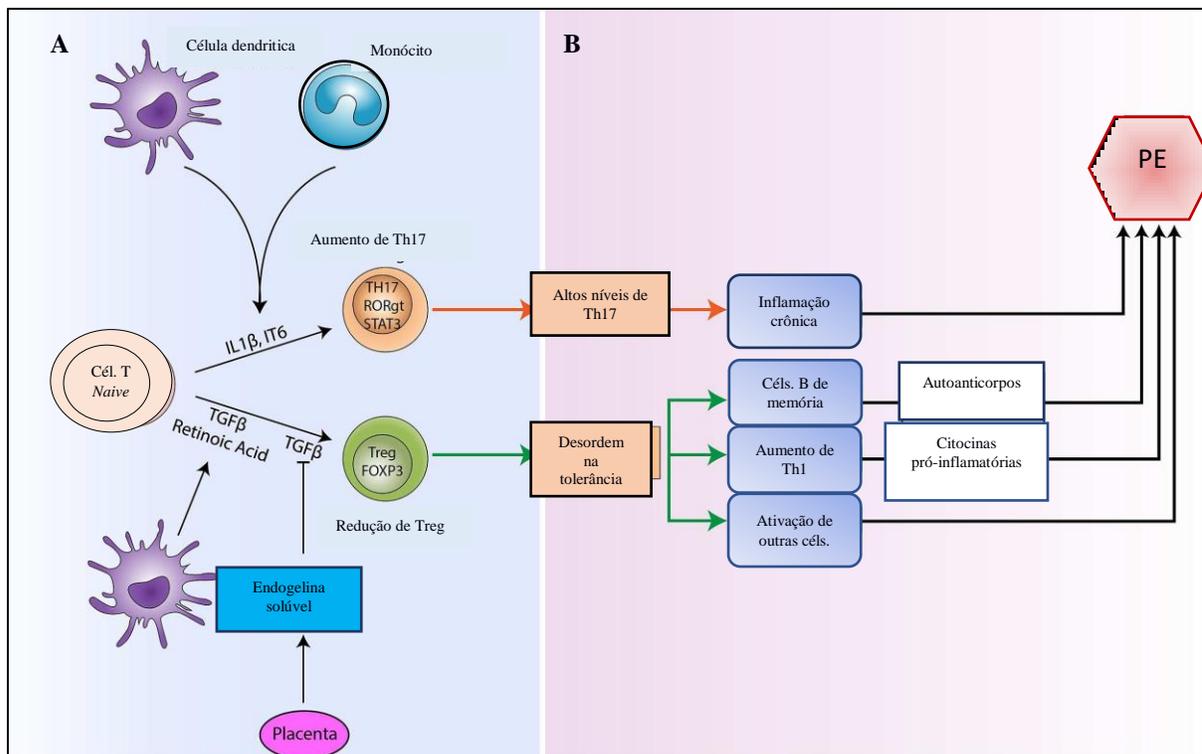
envolva células *natural killers* (NK) e citocinas como o interferon- γ (IFN- γ), IL12, IL8, TNF- α , IL6 e TGF- β (CORNELIUS, 2018; GELDENHUYS et al., 2018).

A resposta Th1 é induzida por IL12, que estimula a liberação de IFN- γ por NK. O excesso de IFN- γ promove *feedback* negativo nas células Th2, suprimindo a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL4 e IL10. Além disso, IL12 e IFN- γ inibem a angiogênese (GELDENHUYS et al., 2018). TNF- α , IL2, IL12, IL18 e IFN- γ têm sido relatados como indutores de apoptose de trofoblastos e o TNF- α também parece ativar células endoteliais e induzir dano no endotélio glomerular (CORNELIUS, 2018). Já a IL6, uma citocina multifuncional que participa da resposta de fase aguda, colabora com a proliferação, invasão e diferenciação trofoblástica, modulando eventos anti e pró-inflamatórios e trata-se de um importante marcador de disfunção endotelial observado nas artérias de mulheres com PE (XIE et al., 2011).

No entanto, apenas o predomínio do fenótipo Th1 observado na interface materno fetal não é suficiente para explicar as alterações imunológicas observadas na PE. Nesse contexto, estudos recentes expandiram a dicotomia Th1/Th2 e incluíram as células Th17 e Tregs para tentar explicar essas alterações. As células Treg são um subconjunto de células T efectoras que participam da supressão de respostas autoimunes, auxiliando na manutenção da tolerância imunológica materna ao feto, enquanto as células Th17 promovem inflamação e rejeição (LAMARCA et al., 2016).

Desse modo, vem sendo proposto que a fisiopatologia da PE esteja relacionada à diferenciação desequilibrada entre células Tregs e Th17, com redução de Tregs e consequente falha na tolerância imunológica e aumento das células Th17, com produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, como a IL17 (**Fig.2**) (HOSSEINI et al., 2018).

Figura 2 - Papel das células Th17 e Tregs na pré-eclâmpsia. A) Diferenciação das células Treg e Th17. B) Função das células Treg e Th17 na pré-eclâmpsia.



Fonte: Adaptado de Hosseini et al., 2018. Regulatory T and T helper 17 cells: Their roles in preeclampsia.

2.1.5 Células T reguladoras e FOXP3 na Pré-eclâmpsia

As células Tregs suprimem a produção de moléculas pró-inflamatórias e a atividade de células B e consequente produção de imunoglobulinas, inibindo a função citotóxica das células NK. Os mecanismos moleculares que induzem essas atividades supressoras não são completamente compreendidos, mas acredita-se que a produção de citocinas imunorreguladoras como IL10 e TGF- β possa colaborar com esse processo (GELDENHUYS et al., 2018).

Durante a gestação, as células Tregs desempenham um importante papel mediando a tolerância imunológica aos antígenos fetais e suprimindo a inflamação excessiva. Em gestações saudáveis, níveis elevados de Treg são observados desde o início, com um pico no segundo trimestre e posterior redução ao final da gestação (LAMARCA et al., 2016).

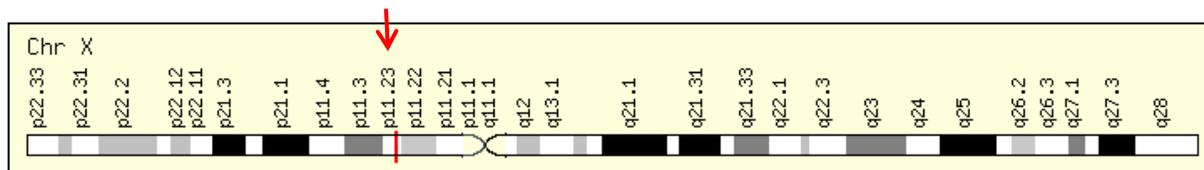
Na PE, observa-se redução de Tregs, com consequente diminuição na produção de IL10 e TGF- β , o que estimula a produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL6 e IL17, que

contribuem para a disfunção endotelial, estresse oxidativo e o aumento da pressão arterial (LAMARCA et al., 2016).

FOXP3 é um importante fator de transcrição para o bom desenvolvimento e função das células Treg (CAMPBELL, 2015). Sua importância na diferenciação e manutenção das atividades supressoras das células Treg foram descobertas a partir de estudos que identificaram e associaram mutações no gene que codifica FOXP3 com à síndrome IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), uma síndrome autoimune sistêmica fatal caracterizada por diabetes, tireoidite, anemia hemolítica, síndrome de hiper IgE, dermatite esfoliativa, esplenomegalia e linfadenopatia (BENNETT et al., 2001; GAMBINERI et al., 2003).

O gene que codifica *FOXP3* está localizado no braço curto do cromossomo X (Xp11.23) (Fig.3) e é constituído por 11 éxons, codificando uma proteína com 431 aminoácidos e peso molecular de 47.25kD (BENNETT et al., 2001).

Figura 3 – Localização cromossômica do gene *FOXP3*.



Fonte: Extraído de: www.genecards.com

O início e a manutenção da transcrição de *FOXP3* dependem de sequências não codificadoras conservadas (CNS), que servem como locais de ligação para outros fatores de transcrição. Além disso, *FOXP3* pode funcionar tanto como um repressor quanto como um transativador, orquestrando a transcrição de acordo com as propriedades imunossupressoras das células Treg e também através de várias proteínas de ligação ao RNA, regulando a expressão gênica através de mecanismos pós-transcricionais (BACCHETTA, BARZAGHI, RONCAROLO, 2018; LU, BARBI, PAN, 2017).

Mais de 70 variantes genéticas no gene *FOXP3* já foram descritas, dentre elas os polimorfismos rs3761548 C>A, rs3761549 C>T e rs2232365 G>A, que estão localizados na região promotora e podem alterar quantitativamente ou funcionalmente a produção desse fator de transcrição, levando a uma disfunção de células Treg (MISHRA et al., 2018). Esses polimorfismos já foram associados ao risco de abortos recorrentes (SHEHJAR et al., 2018), câncer de mama (TIAN et al., 2018) e doença de Graves (ZIDAN et al., 2018).

A redução de Tregs na periferia e decídua de mulheres com PE ocasiona o aumento da apoptose de células trofoblásticas e invasão superficial do trofoblasto na decídua (CORNELIUS, 2018). Essa redução parece ser proporcional a gravidade da doença, onde mulheres com PE grave de início precoce possuem redução significativa de células Tregs em comparação às pacientes com PE leve de início tardio (HU et al., 2008; QUINN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2017).

Devido ao grande número de estudos que relatam a diminuição de Tregs e suas atividades regulatórias na PE, o papel dessas células na contribuição da fisiopatologia desta doença deve ser considerado. Desse modo, estudos que buscam compreender o papel do gene *FOXP3* e seus polimorfismos no desenvolvimento da PE em diversas populações têm sido realizados, no entanto os resultados são controversos (JAHAN et al., 2013; METZ et al., 2012; NOROUZIAN et al., 2016; RIBEIRO et al., 2017).

Metz e colaboradores (2012) analisaram sete SNPs (rs12843496, rs6609857, rs2294020, rs2280883, rs2232367, rs3761547 e rs4824747) previamente avaliados em desordens autoimunes, em 120 mulheres diagnosticadas com PE e 120 controles e não encontraram associação entre essas variantes genéticas e PE. Já estudos iranianos e chineses encontraram associação entre os polimorfismos rs4824747 e rs5902434 com a PE, respectivamente (CHEN et al., 2013; NOROUZIAN et al., 2016).

Essa variabilidade de resultados demonstra a necessidade de explorar de modo mais detalhado o gene *FOXP3* e suas variantes, bem como citocinas relacionadas com o perfil Treg e a suscetibilidade materna a PE.

2.1.6 Células Th17 e IL17A na Pré-eclâmpsia

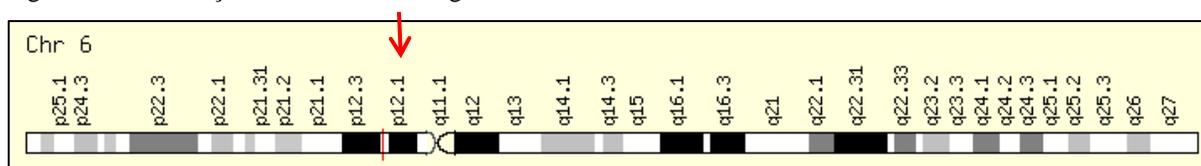
Os linfócitos Th17 são um tipo de linfócitos T CD4+, cujo receptor retinóide nuclear (RORC) é o regulador chave na diferenciação dessa linhagem. A descoberta desse subconjunto de linfócitos T levantou a hipótese de um perfil de predomínio Th1/Th2 sobre Th17/Treg em condições inflamatórias crônicas, onde a hiper-regulação da imunidade via Th17 pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças autoimunes, inflamatórias crônicas, reações de rejeição ao enxerto, além de perturbações alérgicas. Da mesma forma, deficiência de células Th17 pode levar a infecções virais, bacterianas ou fúngicas recorrentes (ANNUNZIATO et al., 2008; BETTELI et al., 2007; CURTIS et al., 2009).

Durante a gestação, as células Th17 são encontradas no sangue periférico e em maior quantidade na decídua, colaborando com a implantação e placentação (CORNELIUS; LAMARCA, 2014) e os níveis de IL17A encontram-se elevados no primeiro e terceiro trimestres, favorecendo o estabelecimento da gravidez e o trabalho de parto, respectivamente (TOLDI et al., 2011). A hipótese de que esta citocina esteja envolvida na patogênese da PE é baseada em estudos com camundongos, que mostraram que essa molécula promove hipertensão induzida pela Angiotensina II (Ang-II), sugerindo um papel no recrutamento de leucócitos durante o remodelamento vascular hipertensivo (MADHUR et al., 2010). Além disso, níveis elevados de IL17A já foram observados em gestantes com PE, mas o mecanismo envolvido ainda não é bem compreendido (SAITO et al., 2011).

A IL17 é a principal citocina secretada pelas células Th17 e pertence a uma família composta por seis citocinas: IL17A, IL17B, IL17C, IL17D, IL17E (IL25) e IL17F. A IL17A é o membro protótipo e inicia vias de sinalização que induzem a proliferação, recrutamento, ativação e migração de neutrófilos (CORNELIUS, LAMARCA, 2014; REYNOLDS et al., 2010).

O gene que codifica a IL17A está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p12.1) (Fig.4) e é constituído por 5 éxons, codificando uma proteína com 155 aminoácidos e peso molecular de 17.50kD (CHENG et al., 2015).

Figura 4 – Localização cromossômica do gene *IL17A*



Fonte: Extraído de: www.genecards.com

Os polimorfismos rs2275913 G>A, rs8193036 C>T e rs4711998 A>G estão localizados na região promotora do gene *IL17A* e podem modular a forma como o gene é expresso. O polimorfismo rs2275913 G>A, também conhecido como G-197A, está localizado dentro de um motivo de ligação para o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), um regulador crítico da expressão de *IL17A*. Este SNP pode alterar a transcrição gênica, elevando os níveis circulantes de IL17A, como demonstrado em estudos com vários tipos de tumores, incluindo câncer gástrico (MOSELEY et al., 2003; NAJAFI et al., 2014; ZHANG et al., 2008).

Esses polimorfismos vêm sendo amplamente estudados em diversas patologias, no entanto os resultados são controversos. Um estudo realizado na Colômbia com 1.171 indivíduos

encontrou associação entre o polimorfismo rs8193036 e suscetibilidade à doença de Chagas e desenvolvimento de cardiomiopatia crônica (LEON RODRIGUEZ et al., 2015). O mesmo polimorfismo também foi associado ao aumento do risco de obesidade central e síndrome metabólica no modelo sobredominante em indivíduos mexicanos com doença arterial coronariana prematura (VARGAS-ALARCÓN et al., 2015). O polimorfismo rs2275913 foi associado ao risco de câncer gástrico no modelo dominante, num estudo Chinês com 1.121 indivíduos (ZHOU et al., 2016). Por outro lado, Senhaji e colaboradores (2016) investigaram diversos polimorfismos em genes que codificam mediadores inflamatórios em 510 indivíduos no Marrocos, dentre eles os polimorfismos rs4711998, rs8193036 e rs2275913 no gene *IL17A* e não encontraram associação entre esses polimorfismos e doença de Crohn, colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal.

Embora polimorfismos no gene *IL17A* e as células Th17 possam estar envolvidas na suscetibilidade a PE, a literatura disponível sobre esse assunto é escassa, reforçando a necessidade de estudos com essa temática.

2.2 JUSTIFICATIVA

Embora existam na literatura inúmeros trabalhos referentes a genes e polimorfismos envolvidos na PE, o conhecimento que se tem a respeito da contribuição dos fatores genéticos no desenvolvimento dessa doença está longe de ser completo. A patofisiologia da PE ainda não é conhecida, o que dificulta o desenvolvimento de novos tratamentos e formas de prevenção.

A compreensão dos mecanismos moleculares e a influência de fatores genéticos e imunológicos envolvidos na PE podem auxiliar na identificação de marcadores que possam ser úteis na detecção precoce de mulheres predispostas ao desenvolvimento desta condição. A descoberta de biomarcadores genômicos e/ou proteômicos específicos que detectem a disfunção placentária precocemente abrirá um novo caminho para a previsão de pacientes suscetíveis a desenvolver PE, garantindo uma vigilância pré-natal eficaz e focada, com a possibilidade de intervenções oportunas serem instaladas na tentativa de minimizar a morbidade e mortalidade materna e fetal. Desse modo, estudos com genes e citocinas envolvidas no balanço pró e anti-inflamatório que atuam na placentação e garantem a tolerância materna ao feto e consequentemente manutenção da gestação são importantes para auxiliar na compreensão da etiopatogênese da PE.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivos gerais

Avaliar a expressão e os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 C>A e rs22323665 A>G no gene *FOXP3* e rs2275913 G>A, rs8193036 C>T e rs4711998 A>G no gene *IL17A* e os níveis de IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 em mulheres com PE.

2.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 C>A e rs22323665 A>G do gene *FOXP3* e rs2275913 G>A, rs8193036 C>T e rs4711998 A>G no gene *IL17A* em mulheres com gestação normal e com PE.
2. Determinar os modelos de herança dos polimorfismos dos genes *FOXP3* e *IL17A* com a suscetibilidade a PE.
3. Determinar a contribuição de haplótipos dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 C>A e rs22323665 A>G do gene *FOXP3* e rs2275913 G>A, rs8193036 C>T e rs4711998 A>G no gene *IL17A* no desenvolvimento da PE.
4. Determinar o efeito do tabagismo, recorrência familiar, primiparidade e presença dos alelos polimórficos dos genes *FOXP3* e *IL17A* no desenvolvimento da PE.
5. Determinar a expressão dos genes *FOXP3* e *IL17A* no tecido placentário de mulheres com gestação normal e com PE.
6. Determinar a expressão dos genes *FOXP3* e *IL17A* no tecido placentário de mulheres com PE precoce e tardia.
7. Comparar os genótipos dos polimorfismos investigados com a expressão gênica.
8. Dosar os níveis placentários das citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 em gestantes saudáveis e com PE.

2.4 METODOLOGIA

2.4.1 Considerações éticas

Esta pesquisa foi conduzida após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) (CEP /UFTM-CAAE 44460115.1.0000.5154) (**Anexo I**). Todas as participantes deste trabalho assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndices I, II, III e IV**).

2.4.2 Critérios de inclusão

Foram incluídas no grupo de estudo apenas mulheres com diagnóstico de PE que seguissem os critérios estabelecidos pelo ACOG (2013), ou seja: elevação da pressão arterial $\geq 140 \times 90$ mmHg em duas medidas com intervalo de pelo menos 4 horas, após a 20ª semana de gestação, em mulheres previamente normotensas; proteinúria ≥ 300 mg/24h ou 1+ na urina tipo I. Na ausência de proteinúria, achados como trombocitopenia, elevação de enzimas hepáticas, insuficiência renal, edema pulmonar e sintomas visuais ou cerebrais foram considerados para o diagnóstico de PE.

Participaram desse estudo apenas mulheres sem histórico de hipertensão arterial crônica, hipotireoidismo, diabetes *mellitus*, diabetes gestacional, doenças infectocontagiosas, doenças autoimunes, gestação múltipla e abortos recorrentes.

2.4.3 Casuística

Trata-se de um estudo do tipo caso controle, composto por 263 mulheres atendidas pelo serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da UFTM entre julho de 2015 a setembro de 2017.

O grupo de estudo foi composto por 89 mulheres diagnosticadas com PE e o grupo controle foi constituído por 174 mulheres sem comorbidades. Para a avaliação da expressão dos genes *FOXP3* e *IL17A* e dosagem das citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 foram obtidas 31 amostras de placentas, sendo 17 do grupo de estudo (PE) e 14 do grupo controle. Dentre as amostras de placenta do grupo PE, 10 foram diagnosticadas com PE precoce (PEP) e 7 com PE tardia (PET). A idade gestacional média foi 27,7 semanas para o grupo PEP e 34,5 semanas para o grupo PET.

Dados como pressão arterial, número de consultas pré-natais, idade gestacional e exames laboratoriais foram obtidos através dos prontuários médicos. As participantes desse trabalho responderam a uma entrevista (**Apêndice V**), onde foram coletados dados como histórico familiar de PE, uso de álcool, drogas e/ou tabaco durante a gestação.

2.4.4 Coleta de sangue periférico e lise de células

Todas as participantes foram submetidas à coleta de 10 mL de sangue total, por venopunção, em tubos de coleta a vácuo estéril (BD Vacutainer[®]), com EDTA. Os tubos foram levados diretamente para o laboratório da Disciplina de Genética Humana da UFTM onde o material foi processado e armazenado.

Para a lise de células, o sangue de todas as participantes foi colocado em tubos cônicos de 50 mL, onde foi adicionado Tris EDTA (TE) 20:5 (Tris HCl 1M; EDTA 0,5M pH=8,0) até completar 30 mL. As amostras foram agitadas em vórtex e posteriormente centrifugadas a 1.870 g por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados e o procedimento repetido três vezes até a obtenção da camada leucocitária livre de eritrócitos. A camada leucocitária obtida foi transferida para um microtubo de 2 mL, onde foi adicionado 1 mL de TE 20:5 para o armazenamento da amostra em freezer a -20°C para posterior extração do DNA genômico.

2.4.5 Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de fenol clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989). As amostras armazenadas foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL, onde foi acrescentada 250µL de solução de B (**Quadro1**) em cada tubo. Todas as amostras foram incubadas por 12 horas em banho Maria a 37°C para completa dissolução da camada leucocitária.

Quadro 1 – Reagentes para as Soluções A e B

Solução A (estoque 2X)		Solução B	
EDTA	20mM	Solução A	0.5x
NaCl	20mM	SDS	5%
Tris-HCl (pH 8,0).	20mM	Proteinase K	1mg/mL

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Após a incubação, foram adicionados 1mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e os tubos agitados lentamente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1.870 g por 15 minutos, a 4°C e a fase superior retirada e transferida para tubos cônicos de 15mL,

onde foi acrescentado 1mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Todas as amostras foram novamente agitadas por 15 minutos e centrifugadas a 1.870 g por 15 minutos. A fase superior foi recolhida em tubos de 15 mL, onde foram acrescentados 40 µL de acetato de sódio 0,2M e 5 mL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram fechados e misturados por inversão para a precipitação do DNA. Posteriormente, o DNA precipitado foi transferido para microtubos de 2mL contendo 1 mL de etanol 70% e os microtubos foram centrifugados a 21.460 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo colocado para secar por 24 horas. Após a secagem, o DNA foi solubilizado em 200 µL de TE 20:1 e todas as amostras foram quantificadas através de leitura de absorbância óptica a 260nm em espectrofotômetro (OPTIZEN POP/ MECASYS®). A integridade do DNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%.

2.4.6 Genotipagem das amostras

A genotipagem das amostras para os polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* e rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A* foi realizada através da técnica de discriminação alélica por PCR em Tempo Real, com a utilização de sondas de hidrólise TaqMan (ThermoFisher Scientific) (**Quadro 2**). As reações de PCR continham 10 ng de DNA, 1,5 µL de TaqMan Universal Master Mix (2X), 0,1 µL de iniciadores e sondas (10X) e água ultrapura suficiente para um volume final de 5 µL, incluindo os controles negativos adequados em todos os ensaios. As reações foram realizadas no aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems™), sob as seguintes condições: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto). Para cada ciclo, o software determinou o sinal fluorescente a partir das sondas marcadas com VIC ou FAM.

Quadro 2 – Identificação dos ensaios utilizados para os polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* e rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A*.

Gene	Polimorfismo	Número do ensaio
<i>FOXP3</i>	rs3761549 C/T	<u>C 27058744 10</u>
	rs3761548 A/C	<u>C 27476877 10</u>
	rs2232365 G/A	<u>C 15942641 10</u>
<i>IL17A</i>	rs4711998 A/G	<u>C 1799586 20</u>
	rs8193036 C/T	<u>C 1799585 10</u>
	rs2275913 A/G	<u>C 15879983 10</u>

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

2.4.7 Coleta de tecido placentário e extração de RNA

Imediatamente após a dequitação da placenta, foram coletados fragmentos de aproximadamente 0,5 cm² da face materna (decídua basal), que foram acondicionados em microtubos de 2 mL contendo 500 µL de solução estabilizadora de RNA (RNAlater[®], Invitrogen) para a conservação das amostras e posterior extração do RNA.

Para a extração de RNA, foram utilizadas aproximadamente 30 mg de cada amostra de placenta, previamente armazenadas em RNAlater[®] (Invitrogen). A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

As amostras foram fragmentadas e colocadas em microtubos contendo 175 µL do tampão de lise para a quebra das membranas celulares, desagregação das proteínas e liberação do material genético. Em seguida, foram adicionados 350 µL de tampão de diluição de RNA aos tubos e as amostras homogeneizadas por inversão. O material foi incubado em banho Maria a 70° C durante 3 minutos e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 12.000 g a 4°C.

Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos, onde foram adicionados 200 µL de etanol 95%. O material foi homogeneizado e transferido para o conjunto de coluna e tubo de coleta e centrifugado a 12.000 g por um minuto. O líquido presente nos tubos de coleta foi descartado e em seguida foram adicionados 600 µL de solução de lavagem aos conjuntos de colunas e esse material foi então novamente centrifugado por 1 minuto a 12.000 g. Após a centrifugação, o líquido presente nos tubos de coleta foi descartado e adicionou-se 50 µL de solução de incubação diretamente na membrana de cada coluna. O material foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de parada nas colunas e o material centrifugado a 12.000 g por 1 minuto.

Posteriormente, foram adicionados 600 µL de solução de lavagem e os tubos novamente centrifugados a 12.000 g por um minuto. O líquido presente nos tubos de coleta foi descartado, sendo adicionados 250 µL de solução de lavagem. Os tubos foram centrifugados por dois minutos a 12.000 g e as colunas foram então transferidas para tubos de eluição, onde foram adicionados 100 µL de água livre de nucleases às membranas. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g por um minuto e as colunas foram descartadas, permanecendo apenas o RNA total recolhido nos tubos de eluição.

O RNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria através do aparelho NanoDrop® ND-2000 (ThermoScientific) e posteriormente estocado em freezer -80°C.

2.4.8 Síntese do DNA complementar (cDNA)

As reações de transcrição reversa para obtenção do cDNA foram realizadas utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante.

Para cada reação foram utilizados 10 µL de RNA (100 ng/µL), 4,2 µL de água DEPC, 2 µL de tampão de transcrição reversa (10X), 2 µL de iniciadores (10X), 1 µL de transcriptase reversa (50 U/µL) e 0,8 µL de dNTPs (100mM), totalizando o volume final de 20 µL por amostra.

A transcrição reversa das amostras foi realizada no termociclador Mastercycler®Nexus Gradient (Eppendorf®), nas seguintes condições: 25° C durante 10 minutos, 37° C durante 120 minutos e 85° C a 5 minutos. Ao final, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C para posterior utilização.

2.4.9 Expressão gênica

A expressão dos genes *FOXP3* e *IL17A* foi avaliada pela técnica de PCR em tempo real, utilizando o equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems™). O gene de referência *ACTB* foi utilizado como controle endógeno. Os ensaios contendo *primers* e sondas específicas para os genes *FOXP3*, *IL17A* e *ACTB* foram pré-desenhados pela Applied Biosystems (Hs01085834_m1, Hs00174383_m1, Hs01060665_g1, respectivamente). O volume final das reações foi de 10 µL e continham 5 µL de TaqMan Universal Mastermix (2X) (Applied Biosystems), 4,5 µL de cDNA (100 ng) e 0,5 µL de TaqMan® Gene Expression Assays (20X). Os controles negativos apropriados foram utilizados. O experimento foi realizado sob as seguintes condições de PCR: 50°C por 5 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para a quantificação relativa (RQ) dos genes *FOXP3* e *IL17A*, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), onde o ciclo limiar (Ct) é o ciclo no qual o nível de fluorescência atinge quantidade suficiente para detecção da amostra. As fórmulas utilizadas para obtenção do valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ são descritas abaixo:

$$\Delta Ct (PE) = Ct (FOXP3 \text{ ou } IL17A) - Ct (ACTB)$$

$$\Delta Ct (\text{controle}) = Ct (FOXP3 \text{ ou } IL17A) - Ct (ACTB)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{PE}) - \Delta Ct (\text{controle})$$

$$\text{Razão de expressão} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.4.10 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

A citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 foram dosadas por citometria de fluxo através da técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD BIOSCIENCES, EUA) a partir do sobrenadante do triturado placentário conforme instruções do fabricante. As amostras e citocinas recombinantes foram incubadas com microesferas com distintas intensidades de fluorescência conjugadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina. Posteriormente foram adicionados anticorpos específicos para cada citocina conjugados com ficoeritrina. Após o período de incubação, as microesferas foram lavadas com solução apropriada e analisadas no citômetro FACSCalibur (BD BIOSCIENCES) com auxílio do *software Cell Quest* (BD BIOSCIENCES). As microesferas foram separadas de acordo com a intensidade de fluorescência específica emitida para cada citocina a 660 nm. As citocinas conjugadas a cada microesfera foram quantificadas de acordo com a intensidade de fluorescência emitida a 585 nm. O *software FCAP Array 2.0* (SoftFlow-EUA) foi utilizado para analisar os dados adquiridos e as concentrações das citocinas calculada a partir de curva padrão.

2.4.11 Análise estatística

Variáveis contínuas foram descritas por média \pm desvio padrão e as variáveis categóricas foram expressas através de porcentagem. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e as comparações estatísticas entre dois grupos foram realizadas com emprego do teste de t *Student* (para dados paramétricos) ou *Mann-Whitney* (para dados não paramétricos). Comparações entre três ou mais grupos foram realizada através do teste de *Kruskal Wallis*. Para variáveis qualitativas, as comparações estatísticas foram realizadas através do teste de Qui-Quadrado (χ^2). As análises referentes à expressão gênica foram realizadas a partir da Razão de expressão ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Para avaliar o risco dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* e rs4711998 A>G, rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A* contribuir com a PE, foi realizada a análise de regressão logística múltipla, através do

programa *SNPStat* (disponível em: http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web). Nessa análise, foram utilizados os seguintes modelos de herança: Codominante (homozigoto selvagem x heterozigoto x homozigoto polimórfico); Dominante (homozigoto selvagem x heterozigoto + homozigoto polimórfico); Recessivo (homozigoto polimórfico x homozigoto selvagem + heterozigoto). O programa *SNPStats* também foi utilizado para inferir os haplótipos dos genes *FOXP3* e *IL17A*, a partir da frequência populacional estimada.

Para verificar a associação dos fatores de risco tabagismo, primiparidade, histórico familiar de PE e a presença dos alelos polimórficos com a PE, foi utilizado o modelo de regressão logística múltipla, através do programa *StatsDirect*. Os resultados foram apresentados em *Odds Ratio* (OR), que indica a chance de determinado acontecimento num estudo caso controle, com intervalo de confiança (IC) de 95%.

O poder estatístico apresentou 99,5% para a detecção de associação, utilizando o software G POWER 3.1. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Caracterização da amostra

Participaram desse estudo 263 mulheres, divididas em dois grupos: Grupo de estudo (PE) e Grupo Controle (C). O grupo PE foi constituído por 89 mulheres e o grupo C por 174.

As médias da idade materna, idade gestacional e peso dos recém-nascidos foram significativamente menores no grupo PE (27,1 anos, 34,2 semanas e 2111,27 gramas, respectivamente). A média da pressão arterial sistólica e diastólica foi estatisticamente maior no grupo PE (155,8 e 103,3 mmHg respectivamente). O número de mulheres primigestas e o número de mulheres com história familiar de PE também foram significativamente maiores no grupo PE (40,4% e 30,3% respectivamente) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Caracterização da amostra

Variável	C n=174	PE n=89	p
Idade materna (média±DP, anos)	31,6+-7,8	27,1+-6,4	<0,001
Idade Gestacional (média±DP, semanas)	39,1+-1,3	34,2+-3,5	<0,001
Peso do recém-nascido (média±DP, gramas)	3293,8+-480,2	2111,27+-855,5	<0,001
PAS (média±DP, mmHg)	114,2+-10,4	155,8+-22,7	<0,001

PAD (média±DP, mmHg)	75,1+-10,3	103,3+-14,9	<0,001
Primigesta, n (%)	26 (14,9)%	36 (40,4%)	<0,001
História familiar de PE, n (%)	15 (8,6%)	27 (30,3%)	<0,001

DP: Desvio padrão, PAS: Pressão Arterial Sistólica, PAD: Pressão Arterial Diastólica, mmHg: milímetros de mercúrio. Variáveis quantitativas comparadas pelo teste de *Mann-Whitney*. Variáveis qualitativas: Qui-quadrado.
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.5.2 Análise dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G no *FOXP3*

Para os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G no gene *FOXP3* foram analisadas 261 (172 C e 89 PE), 263 (174 C e 89 PE) e 260 (172 C e 88 PE) amostras, respectivamente.

As frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G no gene *FOXP3* são apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 2– Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G no gene *FOXP3*. Uberaba, MG-2018.

Polimorfismo	Controle n (%)	PE n (%)	χ^2	<i>p</i>
rs3761549				
CC	143 (83,1)	73 (82)	1,23	0,54
CT	27 (15,7)	16 (18)		
TT	2 (1,2)	0 (0)		
rs3761548				
AA	9 (5,3)	4 (4,5)	1,08	0,58
AC	86 (50,9)	40 (44,9)		
CC	74 (43,8)	45 (50,6)		
rs2232365				
GG	66 (38,4)	29 (33)	0,74	0,69
AG	77 (44,8)	43 (48,8)		
AA	29 (16,8)	16 (18,2)		
Frequência alélica				
rs3761549				
C	313 (0,91)	162 (0,91)		
T	31 (0,09)	16 (0,09)		
rs3761548				
A	104 (0,31)	48 (0,27)		
C	234 (0,69)	130 (0,73)		
rs2232365				
A	135 (0,39)	75 (0,43)		
G	209 (0,61)	101 (0,57)		

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas e os grupos para os polimorfismos investigados ($\chi^2=1,23$; 1,08; 0,74; $p=0,54$; 0,58 e 0,69). Os

grupos PE e controle dos polimorfismos rs3761549 C>T e rs2232365 A>G estão em EHW (PE: $\chi^2= 0,87$ e $0,0001$ e $p=0,35$ e $0,99$; C: $\chi^2= 0,31$ e $0,64$ e $p=0,57$ e $0,42$ respectivamente). O grupo controle do polimorfismo rs3761548 A>C não está em EHW (PE: $\chi^2= 1,77$ e $p=0,18$; C: $\chi^2= 6,39$ e $p=0,01$).

A análise de regressão logística múltipla não demonstrou diferença estatisticamente significativa para os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G do gene *FOXP3* em nenhum dos modelos de herança avaliados (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Modelos de herança dos polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* nos grupos Controle e PE. Uberaba, 2018.

Modelo	Genótipo	Controle n (%)	PE n (%)	OR (95%IC)	p
rs3761549					
Codominante	C/C	143 (83,1)	73 (82)	1,00	0,29
	C/T	27 (15,7)	16 (18)	0,78 (0,38-1,60)	
	T/T	2 (1,2)	0 (0)	-	
Dominante	C/C	143 (83,1)	73 (82)	1,00	0,66
	C/T-T/T	29 (16,9)	16 (18)	0,85 (0,42-1,72)	
Recessivo	C/C-C/T	170 (98,8)	89 (100)	1,00	0,16
	T/T	2 (1,2)	0 (0)	-	
rs3761548					
Codominante	C/C	74 (43,8)	45 (50,6)	1,00	0,59
	A/C	86(50,9)	40 (44,9)	1,33 (0,77-2,31)	
	A/A	9(5,3)	4 (4,5)	1,22 (0,34-4,38)	
Dominante	C/C	7 (12,5)	25 (15,1)	1,00	0,31
	A/C-A/A	49 (87,5)	141 (84,9)	2,45 (0,87-6,91)	
Recessivo	C/C-A/C	160 (94,7)	85 (95,5)	1,00	0,93
	A/A	9 (5,3)	4 (4,5)	1,06 (0,30-3,69)	
rs2232365					
Codominante	G/G	66 (38,4)	29 (33,3)	1,00	0,68
	A/G	77 (44,8)	43 (48,9)	0,79 (0,43-1,43)	
	A/A	29 (16,9)	16 (18,2)	0,76 (0,35-1,66)	
Dominante	G/G	66 (38,4)	29 (33)	1,00	0,38
	A/G-A/A	106 (61,6)	59 (67)	0,78 (0,44-1,37)	
Recessivo	G/G-A/G	143 (83,1)	72 (81,8)	1,00	0,69
	A/A	29 (16,9)	16 (18,2)	0,87 (0,43-1,75)	

OR: *odds ratio*, IC (intervalo de confiança). Regressão logística múltipla.

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

2.5.3 Análise dos polimorfismos rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A*

Para os polimorfismos rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A* foram analisadas 260 (173 C e 87 PE), 259 (171 C e 88 PE) e 263 (174 C e 89 PE) amostras, respectivamente.

As frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A* são apresentadas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Distribuição das frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs3761549 C>T; rs3761548 A>C e rs2232365 G>A no gene *IL17A*. Uberaba, 2018.

Polimorfismo	Controle n (%)	PE n (%)	χ^2	<i>p</i>
rs4711998				
GG	79 (45,7)	39 (44,8)	0,13	0,93
AG	66 (38,1)	35 (40,2)		
AA	28 (16,2)	13 (15)		
rs8193036				
TT	104 (60,8)	47 (53,4)	3,02	0,22
CT	59 (34,5)	31 (35,2)		
CC	8 (4,7)	10 (11,4)		
rs2275913				
GG	99 (56,9)	59 (66,3)	3,02	0,22
AG	65 (37,3)	28 (31,5)		
AA	10 (5,8)	2 (2,2)		
Frequência alélica				
rs4711998				
A	122 (0,35)	61 (0,35)		
G	224 (0,65)	113 (0,65)		
rs8193036				
C	75 (0,22)	51 (0,29)		
T	267 (0,78)	125 (0,71)		
rs2275913				
A	85 (0,24)	32 (0,18)		
G	263 (0,76)	146 (0,82)		

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequências genotípicas e os grupos para os polimorfismos investigados ($\chi^2=0,13$; 3,02 e 3,02; $p=0,93$; 0,22 e 0,22 respectivamente). Os grupos PE e controle dos polimorfismos rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A* estão em EHW (PE: $\chi^2= 1,83$ e 0,40 e $p=0,18$ e 0,53; C: $\chi^2= 0,01$ e 0,02 e $p=0,92$ e 0,88, respectivamente). O grupo controle do polimorfismo rs4711998 A>G não está em EHW (PE: $\chi^2= 1,18$ e $p=0,28$; C: $\chi^2= 4,67$ e $p=0,03$).

A análise de regressão logística múltipla não demonstrou diferença estatisticamente significativa para os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G do gene *IL17A* em nenhum dos modelos de herança avaliados (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Modelos de herança dos polimorfismos rs4711998 A>G; rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A* nos grupos Controle e PE. Uberaba, 2018.

Modelo	Genótipo	Controle n (%)	PE n (%)	OR (95%IC)	p
rs4711998					
Codominante	G/G	79 (45,7)	39 (44,8)	1,00	
	A/G	66 (38,1)	35 (40,2)	0,86 (0,48-1,55)	0,80
	A/A	28 (16,2)	13 (14,9)	1,10 (0,50-2,44)	
Dominante	G/G	79 (45,7)	39 (44,8)	1,00	
	A/G-A/A	94 (54,3)	48 (55,2)	0,92 (0,54-1,59)	0,78
Recessivo	G/G-A/G	145 (83,8)	74 (85,1)	1,00	
	A/A	28 (16,2)	13 (14,9)	1,18 (0,56-2,49)	0,66
rs8193036					
Codominante	T/T	104 (60,8)	47 (53,4)	1,00	
	C/T	59 (34,5)	31 (35,2)	0,82 (0,46-1,46)	0,31
	C/C	8 (4,7)	10 (11,4)	0,46 (0,16-1,29)	
Dominante	T/T	104 (60,8)	47 (53,4)	1,00	
	C/T-C/C	67 (39,2)	41 (46,6)	0,73 (0,43-1,26)	0,26
Recessivo	T/T-C/T	163 (95,3)	78 (88,6)	1,00	
	C/C	8 (4,7)	10 (11,4)	0,50 (0,18-1,35)	0,17
rs2275913					
Codominante	G/G	99 (56,9)	59 (66,3)	1,00	
	A/G	65 (37,4)	28 (31,5)	1,31 (0,74-2,32)	0,34
	A/A	10 (5,8)	2 (2,2)	2,55 (0,52-12,49)	
Dominante	G/G	99 (56,9)	59 (66,3)	1,00	
	A/G-A/A	75 (43,1)	30 (33,7)	1,40 (0,80-2,43)	0,23
Recessivo	G/G-A/G	164 (94,2)	87 (97,8)	1,00	
	A/A	10 (5,8)	2 (2,2)	2,31 (0,48-11,17)	0,26

OR: *odds ratio*; IC (intervalo de confiança). Regressão logística múltipla.

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

2.5.4 Análise dos haplótipos dos genes *FOXP3* e *IL17A*

Os haplótipos para os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* e rs4711998 A>G, rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A* são

apresentados na **Tabela 6**. Não foi observada associação entre nenhum dos haplótipos dos polimorfismos investigados e o risco de desenvolvimento de PE.

Tabela 6 - Haplótipos dos genes *FOXP3* e *IL17A*. Uberaba, 2018.

Gene	Haplótipo	Controle	PE	OR (IC-95%)	p
<i>FOXP3</i>	C-C-A	0,32	0,32	1,00	---
	C-C-G	0,30	0,31	0,83 (0,48-1,45)	0,52
	C-A-G	0,21	0,20	1,15 (0,63-2,08)	0,66
	C-A-A	0,05	0,06	0,57 (0,02-1,07)	0,32
	T-C-G	0,05	0,05	0,89 (0,32-2,47)	0,83
	T-C-A	0,006	0,03	0,11 (0,01-1,05)	0,05
<i>IL17A</i>	G-T-G	0,43	0,42	1,00	---
	A-T-G	0,17	0,16	1,05 (0,52 – 2,14)	0,89
	G-T-A	0,10	0,09	1,03 (0,37 – 2,84)	0,95
	A-C-G	0,08	0,13	0,63 (0,31 – 1,29)	0,2
	G-C-G	0,05	0,09	0,69 (0,28 – 1,69)	0,41
	A-T-A	0,06	0,02	2,34 (0,34 – 15,89)	0,39
	G-C-A	0,04	0,03	1,33 (0,36 – 4,95)	0,67
	A-C-A	0,02	0,02	1,13 (0,25 – 5,05)	0,88

OR: *Odds Ratio*, IC (intervalo de confiança). Algoritmo EM.

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

2.5.5 Análise dos fatores de risco para desenvolvimento de PE

Fatores como tabagismo, histórico familiar de PE, primiparidade e a presença dos alelos polimórficos rs3761549T; rs3761548C e rs2232365A do gene *FOXP3* e rs4711998G; rs8193036T e rs2275913G do gene *IL17A* foram utilizados na análise de regressão logística múltipla para determinar o risco de desenvolvimento de PE (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Avaliação dos fatores de risco para o desenvolvimento de PE.

Variável analisada	Odds Ratio	IC (95%)	p
Tabagismo	0,82	0,32- 2,07	0,67
Histórico familiar	8,41	3,41-20,72	<0,01
Primiparidade	5,05	2,12-11,99	<0,01
rs3761549 T	0,92	0,40-2,09	0,84
rs3761548 C	0,35	0,10-1,16	0,08
rs2232365 A	1,58	0,66-3,76	0,29
rs47711998 G	0,68	0,33-1,42	0,31
rs8193036 T	0,56	0,14-2,15	0,40
rs2275913 G	4,70	0,53-41,50	0,16

OR: Odds ratio; IC: intervalo de confiança. Regressão logística múltipla.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

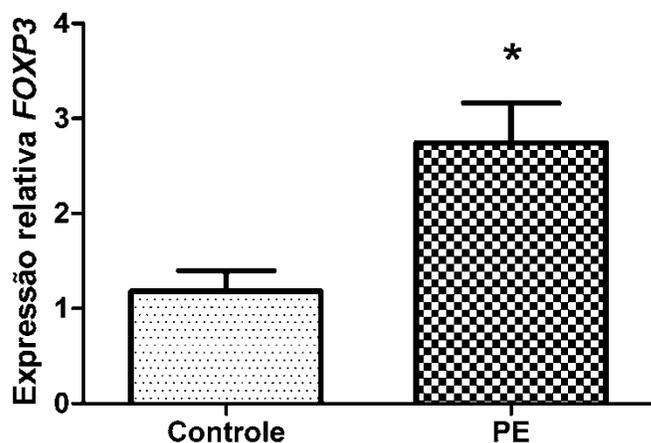
Histórico familiar de PE e primiparidade foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$). Mulheres com histórico familiar de PE possuem risco oito vezes maior de desenvolver a doença

em relação às mulheres sem histórico familiar. Já mulheres primíparas possuem um risco cinco vezes maior de desenvolver PE em relação às mulheres com duas gestações ou mais.

2.5.6 Análise da expressão dos genes *FOXP3* e *IL17A*

A quantificação relativa dos genes *FOXP3* e *IL17A* foi realizada em 31 amostras de placentas, sendo 17 do grupo de estudo (PE) e 14 do grupo controle. A expressão do gene *FOXP3* foi significativamente maior nas placentas de mulheres com PE ($p=0,01$) (**Figura 5**).

Figura 5- Níveis de expressão do gene *FOXP3* nos grupos Controle e PE.

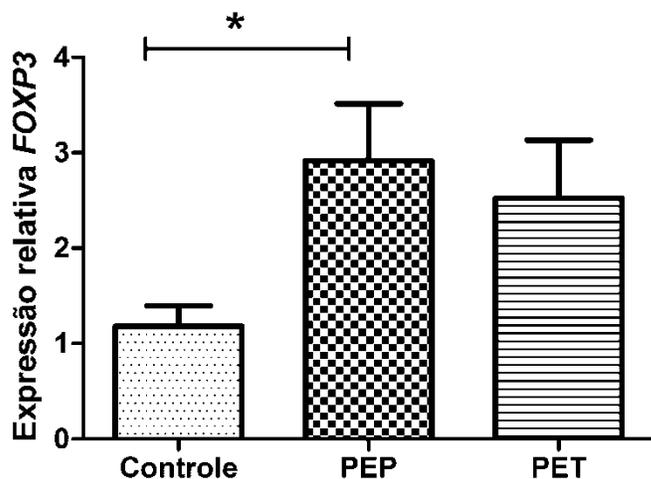


Teste t.

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Ao classificar as amostras de placenta do grupo de estudo de acordo com a idade gestacional de manifestação dos sintomas em Pré-eclâmpsia precoce (PEP - <34 semanas) e Pré-eclâmpsia tardia (PET - ≥ 34 semanas) observou-se que a expressão do gene *FOXP3* foi significativamente maior no grupo PEP quando comparada ao grupo controle ($p<0,05$), como pode ser observado na **Figura 6**.

Figura 6- Níveis de expressão do gene *FOXP3* nos grupos Controle, pré-eclâmpsia precoce (PEP) e pré-eclâmpsia tardia (PET).



Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn.
 Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

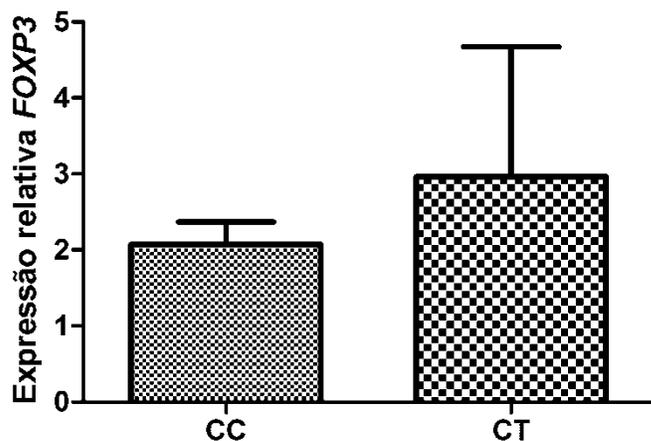
Os níveis de expressão do gene *IL17A* foram indetectáveis tanto no grupo de estudo quanto no grupo controle.

2.5.7 Comparação entre os genótipos dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G e a expressão do gene *FOXP3*

Para avaliar a influência dos genótipos dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 A>G na expressão do gene *FOXP3* gênica, foi realizada a comparação entre os diferentes genótipos observados em todos os indivíduos estudados (PE+Controles).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *FOXP3* em relação aos genótipos CC e CT do polimorfismo rs3761549 C>T em todos os indivíduos estudados ($p=0,37$) (Fig.7).

Figura 7- Comparação entre a expressão do gene *FOXP3* e os genótipos CC e CT do polimorfismo rs3761549 C>T.

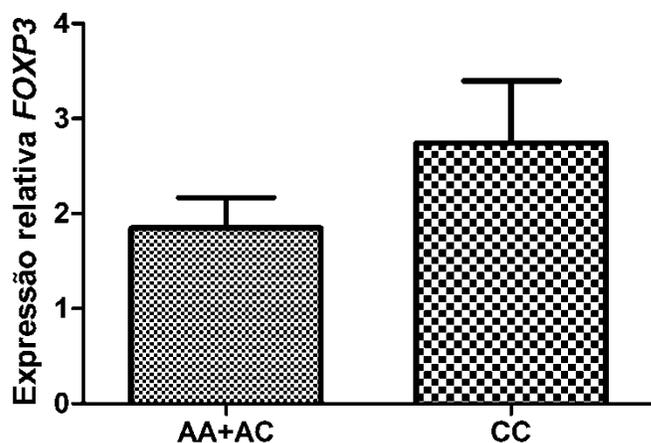


Teste t.

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Para o polimorfismo rs3761548 A>C foram avaliados os genótipos homocigotos selvagem+heterocigotos (AA+AC) *versus* o genótipo homocigoto polimórfico (CC) e não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de *FOXP3* ($p=0,18$) (**Figura 8**).

Figura 8 – Comparação entre a expressão do gene *FOXP3* e os genótipos AA+AC e CC do polimorfismo rs3761548 A>C.

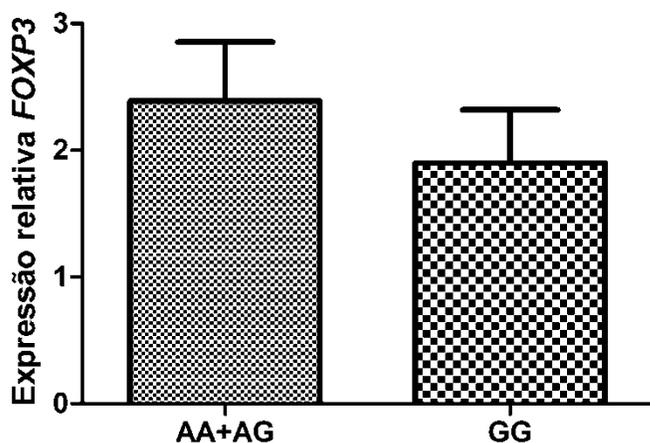


Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A comparação entre a expressão de *FOXP3* e os genótipos homocigotos selvagens + heterocigotos (AA+AG) e homocigoto polimórfico (GG) do polimorfismo rs2232365 A>G não revelou diferença estatisticamente significativa ($p=0,46$) (**Figura 09**).

Figura 09 - Comparação entre a expressão do gene *FOXP3* e os genótipos AA+AG e GG do polimorfismo rs2232365 (A>G).



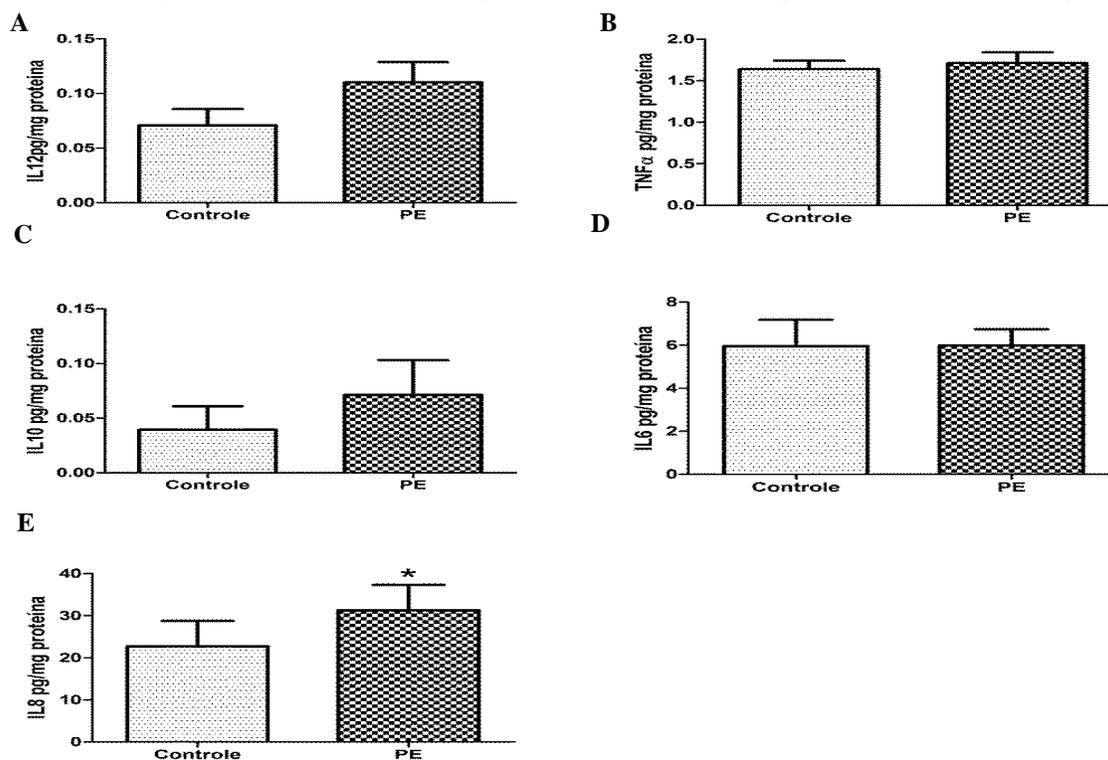
Teste t.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.5.8 Dosagem de citocinas

Os níveis placentários das citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 foram determinados em 31 amostras, sendo 17 PE e 14 controles. Não observamos diferença entre a dosagem de IL12, TNF- α , IL10 e IL-6 entre controles e PE (0,11; 0,68; 0,64 e 0,58 respectivamente) (**Figura 10A a 10D**). No entanto, os níveis de IL8 estavam significativamente aumentados no grupo PE em comparação ao grupo controle ($p=0,04$) (**Figura 10E**).

Figura 10 – Níveis placentários das citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 nos grupos controle e Pré-eclâmpsia. A) IL12, B) TNF- α , C) IL10, D) IL6, E) IL8.

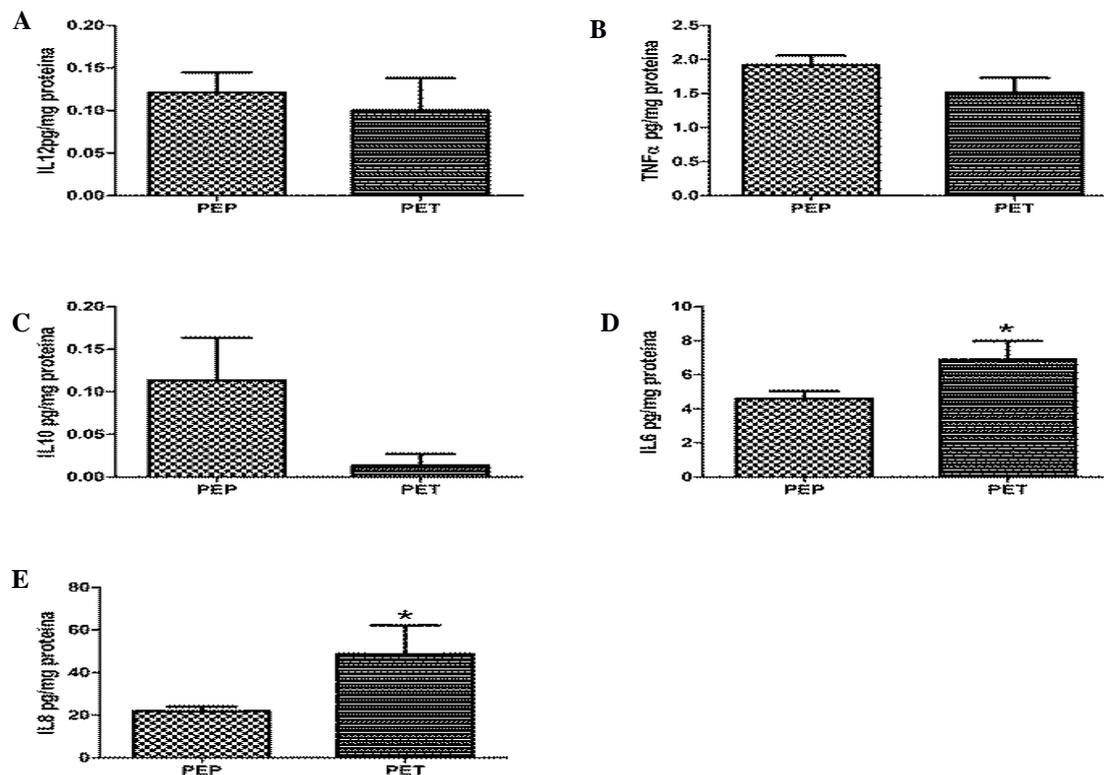


IL12 e TNF- α : teste t. IL10, IL6 e IL8: *Mann-Whitney*

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Quando o grupo PE foi subdividido em PEP e PET, observou-se aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL6 e IL8 em placentas de mulheres com PET ($p=0,04$ e $p=0,03$, respectivamente) (**Figura 11D e E**).

Figura 11 – Níveis placentários das citocinas IL12, TNF- α , IL10, IL6 e IL8 nos grupos PEP e PET. A) IL12, B) TNF- α , C) IL10, D) IL6, E) IL8.



IL12, TNF- α , IL6 e IL8: teste t. IL10: *Mann-Whitney*.
 Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.6 DISCUSSÃO

A PE está associada a altas taxas de morbimortalidade materna e fetal, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (DULEY, 2009). Apesar da literatura associar anomalias no sistema imunológico com sua patogênese, a etiologia da PE permanece desconhecida (JAHAN et al., 2013; JEYABALAN, 2013).

No presente trabalho, as idades maternas e gestacionais médias, bem como o peso dos RNs foram menores no grupo PE. Esse grupo também era composto por maior número de primigestas e mulheres com histórico familiar de PE e apresentou maiores níveis pressóricos. Nossos resultados são condizentes com os apresentados na literatura que indicam que a PE é uma doença característica da primeira gestação, com risco aumentado para partos prematuros e RNs de baixo peso e que possui um componente genético na sua etiologia (CHEN et al., 2013; GHOLAMI et al., 2017).

A maturação, desenvolvimento e função das células Treg dependem da expressão do fator de transcrição FOXP3 (JAHAN et al., 2013). Polimorfismos na região promotora desse gene podem alterar sua expressão e conseqüentemente a produção de células Treg (ODA et al., 2013). Os polimorfismos rs3761549, rs3761548 e rs22232365 já foram associados a condições como carcinoma hepatocelular, carcinoma pulmonar de células não pequenas (JIANG, RUAN; 2014), abortos recorrentes (SAXENA et al., 2015) e graves distúrbios autoimunes (NEDOSZYTKO et al., 2017).

O presente estudo não observou associação entre os polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs22232365 G>A no gene *FOXP3* com o desenvolvimento da PE. Nenhum dos modelos de herança avaliados mostrou resultados significativos para PE.

Em relação ao polimorfismo rs3761549, as frequências alélicas foram exatamente iguais tanto no grupo PE quanto no grupo controle, o que explica a falta de associação entre esse polimorfismo e a PE no presente trabalho, sugerindo que para essa população esse não seja o melhor marcador genético de suscetibilidade. Embora o polimorfismo rs3761549 não tenha sido associado a PE em nosso estudo, alguns trabalhos já encontraram associação entre o genótipo CC deste polimorfismo e risco de desenvolvimento de pênfigo foliáceo (BEN et al., 2017) e endometriose (ANDRÉ et al., 2011), o que sugere que o mesmo pode contribuir com a patogênese de condições autoimunes e ginecológicas, reforçando a necessidade de estudos que investiguem seu papel no desenvolvimento da PE. Destaca-se que nosso estudo é o primeiro a investigar a contribuição do polimorfismo rs3761549 C>T no desenvolvimento da PE.

Em relação aos polimorfismos rs3761548 e rs22232365, resultados semelhantes aos nossos foram relatados por Norouzian e colaboradores (2016), que investigaram esses polimorfismos em 81 mulheres iranianas com PE e 89 controles e não encontraram associação entre essas variantes e a PE. Um estudo chinês realizado com 156 mulheres com PE e 252 controles também não encontrou associação entre o polimorfismo rs3761548 e PE (CHEN et al., 2013). Apesar da diferença no tamanho amostral desses dois trabalhos em relação ao presente estudo, a distribuição genotípica para os polimorfismos rs3761548 A>C e rs22232365 G>A entre os grupos foi semelhante, com maior frequência de indivíduos homozigotos selvagens e heterozigotos nas amostras. Esses dados indicam que a baixa distribuição do genótipo homozigoto polimórfico, principalmente no polimorfismo rs3761548, ocorra na população em geral, independente da localização geográfica (WU et al., 2012).

De modo oposto, Gholami e colaboradores (2017) encontraram associação entre o polimorfismo rs2232365 e os modelos sobredominante, dominante e codominante, sendo o genótipo heterozigoto considerado protetor contra o desenvolvimento de PE em um estudo realizado com 133 mulheres com PE e 143 gestantes iranianas. Esses dados são reforçados por trabalhos que demonstraram baixa frequência do alelo A e genótipo AA em casos de abortos, destacando a importância desse alelo na produção e função normal das células Tregs (WU et al., 2012). Gholami e colaboradores (2017) também encontraram associação entre o genótipo AA do polimorfismo rs3761548 e o risco de PE no modelo recessivo, o que contrapõe os resultados de um estudo realizado na Índia com 282 mulheres com PE e 215 controles, que associou o genótipo CC do polimorfismo rs3761548 com a PE (JAHAN et al., 2013). Em ambos os estudos, a associação ocorreu em relação ao genótipo homozigoto que possuía o alelo menos frequente, o que pode explicar a ausência de associação observada em nosso estudo, onde ambos os grupos tiveram frequência genotípica do menor alelo semelhante.

As divergências nos resultados referentes aos polimorfismos investigados no presente trabalho no gene *FOXP3* reforçam a necessidade da realização de estudos multicêntricos, com maior diversidade genética e tamanho amostral para tentar desvendar a real contribuição dessas variantes na etiologia da PE.

Os polimorfismos rs4711998 A>G, rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A* estão localizados na região promotora e podem regular a expressão gênica, desempenhando um importante papel em processos fisiopatológicos de várias doenças, dentre elas a PE, no entanto essas variantes ainda não foram suficientemente exploradas (ARISAWA et al., 2007).

No presente trabalho, não foi observada associação entre os polimorfismos rs4711998 A>G, rs8193036 C>T e rs2275913 A>G no gene *IL17A* e a PE. Resultados semelhantes em relação ao polimorfismo rs2275913 foram relatados por Wang e colaboradores (2015), em um estudo com 1.031 pacientes com PE e 1.298 gestantes normotensas e não encontraram associação entre o referido polimorfismo e a gravidade ou início de manifestação dos sintomas de PE em mulheres chinesas da etnia Han. Anvari e colaboradores (2015) investigaram o polimorfismo rs2275913 no gene *IL17A* em 261 gestantes iranianas com diagnóstico de PE, divididas de acordo com a gravidade dos sintomas e 278 gestantes saudáveis e também não encontraram associação entre esse polimorfismo e PE grave ou leve.

Embora nossos resultados não tenham associado o polimorfismo rs2275913 com a PE, o mesmo parece modular a expressão de *IL17A* e conseqüentemente os níveis circulantes dessa citocina. Isso foi demonstrado por um estudo realizado no Egito que observou associação entre esse polimorfismo e o risco de abortos recorrentes, sendo o genótipo AA correlacionado com um maior nível sérico de *IL17A*, demonstrando que o aumento desta citocina é prejudicial à gestação (ZIDAN et al., 2015).

Até o momento não há dados disponíveis na literatura a respeito dos polimorfismos rs4711998 A>G, rs8193036 C>T no gene da *IL17A* e PE, mas essas variantes parecem contribuir com a inflamação descontrolada, como observado em estudos com doença arterial coronariana (BAO et al., 2016), doença de Graves (QI et al., 2016) e câncer esofágico (YIN et al., 2014), que detectaram associação entre esses polimorfismos e as condições acima citadas.

A variabilidade nos resultados de estudos sobre os polimorfismos nos genes *FOXP3* e *IL17A* investigados nesse trabalho e a PE pode ser atribuída a fatores como diversidade genética das populações estudadas e diferentes desenhos experimentais empregados. Isso faz com que associações válidas para determinada população, muitas vezes não sejam relevantes para indivíduos de outras etnias, ressaltando a complexidade de estudos envolvendo polimorfismos genéticos (TANAKA et al., 2014; ZIDAN et al., 2015). Apesar disso, acredita-se que num futuro próximo, as variantes genéticas possam fornecer critérios mais específicos e direcionados na detecção precoce da PE (ACOG, 2013; TRANQUILLI et al., 2014).

No presente trabalho, o grupo controle dos polimorfismos rs3761548 do gene *FOXP3* e rs4711998 do gene *IL17A* não estavam em EHW. A inobservância do EHW em nosso estudo sugere que os pressupostos que o mantém não estão sendo seguidos no grupo controle desses polimorfismos e possam estar influenciando o modo como os alelos são distribuídos ao longo das gerações. No entanto não é possível identificar com precisão qual pressuposto está sendo violado. O efeito do “drop-out” alélico ocorre quando alguns alelos são insuficientemente amplificados levando ao excesso de indivíduos homozigotos e pode influenciar o EHW. Esse efeito aparentemente não ocorre no presente estudo, pois as frequências genótípicas do grupo controle nesses dois polimorfismos são semelhantes à de outras populações (RYCKMAN, WILLIAMS, 2008).

Não foi detectada associação entre os haplótipos dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548A>C e rs2232365 G>A no gene *FOXP3* e rs4711998 A>G, rs8193036 C>T e

rs2275913 A>G no gene *IL17A* e a PE. Nossos resultados estão em desacordo com os encontrados por Chen et al., (2013) que encontraram associação entre o haplótipo -6054A/-3279C do gene *FOXP3* e o risco de desenvolvimento de PE em mulheres chinesas, enquanto o haplótipo -6054T/-3279C conferia proteção.

Haplótipos do gene *FOXP3* também foram associados ao risco de abortos recorrentes e endometriose. Um estudo realizado por Saxena e colaboradores (2015) com 200 mulheres que sofreram abortos recorrentes e 300 controles observou que mulheres com haplótipos mutantes dos polimorfismos rs2232365, rs3761548, rs5902434 e rs2294021 do gene *FOXP3* tinham duas vezes mais chances de ter abortos recorrentes quando comparadas às mulheres com haplótipos constituídos apenas pelos alelos selvagens. Já um estudo realizado no Brasil com 177 mulheres com endometriose e 71 mulheres com infertilidade idiopática, analisou cinco polimorfismos do gene *FOXP3* (rs3761548, rs3761549, rs2232368, rs2232366 e rs2280883) e identificou os haplótipos CTTGA e ACTAG associados à endometriose e infertilidade idiopática, respectivamente (ANDRÉ et al., 2011).

Em relação aos haplótipos do gene *IL17A*, nossos resultados são semelhantes aos encontrados num estudo realizado no Irã, que não observou associação entre haplótipos contendo o polimorfismo rs2275913 do gene *IL17A* e o risco de desenvolvimento de PE (ANVARI et al., 2015). No entanto, haplótipos contendo polimorfismos do gene *IL17A* já foram associados com doenças autoimunes (HAMMAD et al., 2016) e abortos (ZIDAN et al., 2015). Hammad e colaboradores (2016) associaram o haplótipo GGA dos polimorfismos rs2275913 do gene *IL17A* e rs763780 e rs2397084 do gene *IL17F* com lúpus juvenil no Egito. Outro estudo realizado no Egito encontrou que mulheres com o haplótipo T-A dos polimorfismos rs2275913 do gene *IL17A* e rs763780 do gene *IL17F* possuem maior risco de abortos de repetição (ZIDAN et al., 2015).

Apesar dos resultados sobre haplótipos nos genes *FOXP3* e *IL17A* serem inconsistentes no que se refere a PE, não se deve descartar essa ferramenta como uma aliada na identificação de alelos predisponentes a doença que são segregados em conjunto.

Nos últimos anos, características individuais e o histórico médico vêm sendo utilizados para tentar prever quais gestantes possuem risco aumentado para desenvolver PE (WRIGH et al., 2015). Nesse sentido, o presente trabalho não associou o tabagismo como um fator de risco para PE, resultado semelhante aos de uma metanálise que avaliou 17 estudos, com 62.089 pacientes com PE e concluíram que não houve associação entre o tabagismo durante a gravidez e

a incidência da doença (WEI et al., 2015). Por outro lado, um estudo realizado na Rússia com 3.281 gestantes, observou que mulheres não fumantes tiveram maior risco de desenvolver PE em comparação as fumantes, sendo o tabaco considerado um fator protetor contra PE (KHARKOVA et al., 2017). Apesar desse resultado, já é conhecido os efeitos nocivos sobre o ambiente hormonal intrauterino do tabaco na gestação que causam efeitos adversos à saúde do feto e da mãe (HAKONSEN, ERNST, RAMLAU-HANSEN, 2014).

Nossos resultados sugerem que mulheres primíparas possuem cinco vezes mais chances de desenvolver PE quando comparadas àquelas com duas ou mais gestações, o que está de acordo com a literatura que relata que mais 50% dos casos de PE ocorrem na primeira gestação (KENNY et al., 2014). Resultados semelhantes aos nossos também foram encontrados em um estudo conduzido por Khader e colaboradores (2018), que relataram que mulheres da Jordânia possuem duas vezes mais risco de desenvolver PE na primeira gestação do que em gestações subsequentes. Do mesmo modo, um estudo sueco observou que mulheres primíparas possuíam risco aumentado de PE e parto prematuro (< 34 semanas) quando comparadas com múltiparas (HERNÁNDEZ-DÍAZ, TOH, CNATTINGIUS; 2009).

A primiparidade como fator de risco para PE pode estar relacionada com causas genéticas, ambientais ou imunológicas, como a imaturidade do sistema imune materno aos antígenos paternos. No entanto pode tratar-se de um achado atribuído à decisão de muitas mulheres que desenvolveram PE na primeira gestação em não se submeterem a uma nova gravidez por receio de desenvolverem novamente PE, sendo a primiparidade uma consequência da PE, não um fator de risco (HERNÁNDEZ-DÍAZ, TOH, CNATTINGIUS; 2009).

No presente trabalho, mulheres com PE que relataram recorrência familiar de PE tiveram oito vezes mais risco de desenvolver a doença. Nossos resultados estão de acordo com estudos realizados no Reino Unido, Dinamarca e Noruega, que observou que mulheres nascidas de gestações complicadas por PE tinham mais risco de desenvolver a doença quando comparadas com mulheres que nasceram de gestações normotensas (AYORINDE, BHATTACHARYA, 2017; BOYD et al., 2013). Já outro estudo relatou que mulheres não nascidas de uma gestação complicada por PE, mas com histórico familiar da doença, também possuíam maior risco de desenvolvê-la quando comparadas com mulheres sem histórico familiar (SKJAERVEN et al., 2004).

É importante salientar que no presente estudo a recorrência familiar de PE foi autorreferida, sendo necessários estudos mais aprofundados para confirmar esses achados. Embora muitos trabalhos tenham relatado a presença de fatores genéticos associados, deve-se ressaltar que a PE é um distúrbio complexo e clinicamente heterogêneo. Desse modo, o risco familiar envolvido não pode ser atribuído somente a um único gene e sim a múltiplos alelos de diferentes genes que possivelmente atuam em conjunto, contribuindo nesse processo (WILLIAMS, BROUGHTON et al., 2011).

O presente trabalho observou níveis significativamente maiores de *FOXP3* expressos nas placentas de mulheres com PE em comparação ao grupo controle. Esses resultados divergem dos encontrados por Gharesi-Fard e colaboradores (2016) num estudo realizado no Irã com casuística semelhante a nossa, que avaliou a expressão gênica de diversas moléculas e observou níveis significativamente reduzidos de *FOXP3* nas placentas de mulheres com PE. Um estudo realizado na China com 15 mulheres primíparas diagnosticadas com PE e 15 primíparas saudáveis relatou que o nível de expressão de mRNA de *FOXP3* em células mononucleares do sangue periférico e decídua estava diminuído em pacientes com PE em comparação com gestantes saudáveis (JIANJUN et al., 2010).

Ao classificarmos a PE de acordo com a idade gestacional de manifestação clínica, o presente estudo detectou níveis significativamente elevados de *FOXP3* em mulheres com PEP, quando comparadas ao grupo controle. Nossos resultados discordam dos encontrados por um estudo brasileiro com 20 gestantes normotensas, 20 gestantes com PEP e 20 com PET, que observou uma menor porcentagem de células expressando *FOXP3* no grupo PE de início precoce (RIBEIRO et al., 2017). Alterações nos níveis de *FOXP3* em mulheres com PE podem indicar duas hipóteses: a redução de *FOXP3* produziria células Tregs menos eficientes e em menor quantidade no organismo materno, causando forte reação imunológica que predisporia ao desenvolvimento de formas mais graves da doença ou o inverso; o aumento de *FOXP3* estimularia a produção de mais células Tregs, na tentativa de compensar a inflamação exacerbada, o que parece explicar melhor nossos resultados.

O aumento da expressão de *FOXP3* em nosso trabalho, principalmente no grupo PE precoce, sugere uma hiper-regulação na produção de células Tregs, com possível aumento de citocinas anti-inflamatórias. Apesar do nosso estudo não ter avaliado a porcentagem de células

Treg circulantes, o aumento da expressão de *FOXP3* observada nas placentas de mulheres com PE sugere um possível mecanismo compensatório em resposta ao ambiente imune desfavorável.

Embora o presente trabalho não tenha detectado a expressão de *IL17A* no tecido placentário de nenhuma amostra, estudos já detectaram a expressão desse gene no tecido placentário de mulheres com PE, no entanto de modo não significativo (GHARESI-FARD et al., 2016). A presença de níveis séricos de *IL17A* mais elevados em mulheres com PE, inclusive de início precoce já foi relatada em estudos realizados na Húngria e no Brasil (MOLVAREC et al., 2015; RIBEIRO et al., 2017).

Além disso, o aumento da expressão de *FOXP3* na PE também pode ter contribuído com a supressão de células Th17 e consequentemente *IL17A*.

A expressão de *IL17A* é regulada por um sistema complexo, onde RORC, o principal regulador da produção de células Th17 em conjunto com outros fatores podem regular negativamente a transcrição, através da remodelação da cromatina (AFZALI et al., 2009; CHEN et al., 2011). A complexa regulação das células Th17 pode ser observada por um estudo realizado na China com 1.040 mulheres com PE e 1.247 gestantes saudáveis, que encontrou associação entre o modelo recessivo do polimorfismo rs153109 do gene *IL27* com a PE. A *IL27* é uma citocina capaz de regular a diferenciação das células T auxiliares, suprimindo Th17 e consequentemente a produção de *IL17* (LIU et al., 2016).

A interpretação dos resultados da expressão gênica de *FOXP3* e *IL17A* deve ser feita com cautela. Como a meia-vida da *IL17A* é curta, a mesma não é constantemente expressa nos tecidos e podem ocorrer falhas na detecção de seus níveis circulantes. Além disso, fatores como a sensibilidade do ensaio também podem explicar as divergências dos nossos resultados com a literatura (SZARKA et al., 2010).

As diferenças funcionais de cada alelo para o polimorfismo rs3761549 ainda não são claras, mas estudos computacionais demonstraram que o genótipo CC promove menor expressão de *FOXP3*, o que resulta na perda da função supressora das Tregs (INOUE et al., 2010). Embora o presente trabalho não tenha observado diferença estatisticamente significativa entre os genótipos CC e CT do polimorfismo rs3761549 na expressão de *FOXP3*, o genótipo CC promoveu menor expressão de *FOXP3* e pode influenciar de modo quantitativo e funcional as células Treg (GHOLAMI et al., 2017). Estudos mais detalhados com esse polimorfismo devem

ser realizados no intuito de identificar o modo como ele regula a expressão de *FOXP3*, contribuindo na compreensão dos mecanismos genéticos e imunológicos envolvidos na PE.

O alelo A do polimorfismo rs3761548 leva a transcrição defeituosa do gene *FOXP3* e o genótipo AA está associado a menor produção desse fator de transcrição (SHEN et al., 2010). Além disso, o genótipo AA do polimorfismo rs3761548 foi associado a abortos espontâneos recorrentes, sugerindo que pacientes com genótipo AA podem ter menos células Treg e/ou função supressora mais fraca, dificultando assim a obtenção de tolerância, levando a perda fetal precoce (WU et al., 2012). Embora não tenhamos observado diferença significativa entre os genótipos AA+AC e CC do polimorfismo rs3761548 e a expressão de *FOXP3*, o potencial nocivo do genótipo AA explica sua baixa frequência observada em nosso estudo e justificam os altos níveis de *FOXP3* observados no genótipo CC.

Apesar de nenhum dos genótipos do polimorfismo rs2232365 estar relacionado a alterações na expressão do gene *FOXP3* no presente estudo, essa variante está localizada em um sítio de ligação para um fator de transcrição que favorece a resposta imune Th2, importante para a manutenção da gestação. Estudos demonstram que células Treg que não expressam *FOXP3* possuem a plasticidade de conversão para Th2, modulando o equilíbrio Th1/Th2 (WANG et al., 2010).

Em relação à dosagem de citocinas placentárias, a IL6 possui capacidade de ativar células endoteliais e induzir a produção de restos trofoblásticos necróticos na placenta, estando implicada com inflamação sistêmica e hipertensão na PE. Já a IL8 tem um papel importante na proliferação de células endoteliais e na ativação de neutrófilos (LAMARCA et al., 2011; SHARMA et al., 2007). No presente trabalho, níveis elevados de IL8 foram detectados no grupo PE e PE tardia. Níveis elevados de IL6 também foram detectados na placenta de mulheres com PET.

A presença de elevados níveis de IL8 nas mulheres com PE pode explicar a ausência de níveis detectáveis de IL17A, possivelmente por inibir a produção de células Th17. Nossos resultados estão de acordo com os relatados por Pinheiro e colaboradores (2013), que detectaram níveis elevados de IL8 e IL6 no soro de pacientes com PE grave por citometria de fluxo e por Moreno-Eutimio e colaboradores (2014), que também detectaram elevados níveis de IL8 e IL6 em mulheres com PE severa (MORENO-EUTIMIO et al., 2014).

Os níveis significativamente elevados de IL8 e IL6 em mulheres com PE tardia observados no presente estudo podem ser atribuídos a um possível mecanismo compensatório

desenvolvido pelo sistema imune de mulheres com PE Precoce, com o aumento da expressão de *FOXP3* na tentativa de controlar a inflamação e manter a gestação.

Essa hipótese é baseada em estudos que demonstram elevados níveis séricos e placentários de IL10 em mulheres com PE, sugerindo hiper-regulação das células Tregs na tentativa de controlar a inflamação (FREEMAN et al., 2004; MADAZLI et al., 2003; OLUSI et al., 2000; RINEHAT et al., 1999, SHARMA et al., 2007).

A baixa casuística de placentas utilizadas no presente trabalho limitou a comparação de alguns resultados. Além disso, a ausência de estudos funcionais com alguns dos polimorfismos investigados dificultou a interpretação dos resultados em relação ao modo como os mesmos podem modular a expressão dos genes *FOXP3* e *IL17A*. Como pontos positivos, devemos destacar o ineditismo do presente trabalho em avaliar os polimorfismos rs3761549 no gene *FOXP3* e rs4711998 e rs8193036 no gene *IL17A* e a PE.

Conclusão

3. CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que não há associação entre as frequências alélicas, genóticas, modelos de herança e haplótipos dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 G>A do gene *FOXP3* e rs4711998 A>G, rs8193036 C>T e rs2275913 A>G do gene *IL17A* e PE. A recorrência familiar e a primiparidade são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de PE na amostra estudada. Mulheres com PE precoce tem maior expressão do gene *FOXP3*. Os genótipos dos polimorfismos rs3761549 C>T, rs3761548 A>C e rs2232365 G>A não influenciam na expressão do gene *FOXP3* na amostra estudada. Mulheres com PE tardia possuem maiores níveis de IL8 e IL6.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALOS, E; et al. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 170, n. 1, p.1-7, 2013.
- ABEDIN, D.A; et al. ACE gene rs4343 polymorphism elevates the risk of preeclampsia in pregnant women. **J Hum Hypertens**, 2018.
- 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, n. 5, p.1122, 2013.
- ANDRÉ, G.M; et al. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. **Fertil Steril**, v. 95, n. 7, p. 2223-7, 2011.
- ANNUNZIATO, F., et al. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *Int. Immunol*, v. 20, p, 1361–1368, 2008.
- ANVARI, F; et al. Investigating the Association of IL-17A and IL-17F with Susceptibility to Preeclampsia in Iranian Women. **Iran J Immunol**, v. 12, n. 2, p.117-28, 2015.
- ARISAWA, T; et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. **J Clin Immunol**, v. 28, p. 44–49, 2007.
- AYORINDE, A.A; BHATTACHARYA, S. Inherited predisposition to preeclampsia: Analysis of the Aberdeen intergenerational cohort. **Pregnancy Hypertens**, v. 8, p. 37-41, 2017.
- BACCHETTA, R; et al. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1417, n. 1, p. 5-22, 2018.
- BAO, M.H; et al. Meta-Analysis for the Association between Polymorphisms in Interleukin-17A and Risk of Coronary Artery Disease. **Int J Environ Res Public Health**, v. 13, n. 7, p. 1-14, 2016.
- BELL, M.J. A historical overview of preeclampsia-eclampsia. **J Obstet Gynecol Neonatal Nurs**, v. 39, n. 5, p. 510-518, 2010.
- BEN, J.M; et al. Role of FOXP3 gene polymorphism in the susceptibility to Tunisian endemic Pemphigus Foliaceus. **Immunol Lett**, n. 184, p. 105-111, 2017.
- BENNETT, C.L; et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. **Nat Genet**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2001.
- BETTELLI, E., et al.Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol*, v. 19, p. 652–657, 2007.

BILANO, V.L; OTA, E; GANCHIMEG, T; MORI, R; SOUZA, J.P. Risk factors of pre-eclampsia/eclampsia and its adverse outcomes in low- and middle-income countries: a WHO secondary analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 911-9, 2014.

BOKSLAG, A; et al. Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. **Early Hum Dev**, v. 102, p. 47-50, 2016.

BOYD, H.A; et al. Associations of personal and family preeclampsia history with the risk of early, intermediate- and late-onset preeclampsia. **Am J Epidemiol**, v.178, n. 11, p. 1611-9, 2013.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. **Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Mulher: princípios e diretrizes**. Brasília, DF; 2009. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/ultimas_noticias/2007/politica_mulher.pdf>. Acesso em: 13 de julho de 2018.

BUCKNER, J.H; ZIEGLER, S.F. Functional analysis of FOXP3. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1143, p. 151-69, 2008.

BUURMA, A.J; et al. Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis. **Hum Reprod Update**, v. 19, n. 3, p. 289-303, 2013.

CAMPBELL, D.J. Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. **J Immunol**, v.195, n.6, p. 2507-13, 2015.

CHELBI, S.T; et al. Why preeclampsia still exists? **Med Hypotheses**, v. 81, n. 2, p. 259-63, 2013.

CHEN, K; KOLLS, J.K. Interleukin-17A (IL17A). **Gene**, v. 614, p. 8-14, 2017.

CHEN, X; et al. Foxp3 (-/ATT) polymorphism contributes to the susceptibility of preeclampsia. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p.596- 99, 2013.

CHEN, Z; et al. FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 5, p. 536-42, 2011.

CHENG, S.B; SHARMA, S. Preeclampsia and health risks later in life: an immunological link. **Semin Immunopathol**, v. 38, n. 6, p. 699-708, 2016.

CHENG, S; et al. Interleukin 17A Polymorphism Elevates Gene Expression and Is Associated with Increased Risk of Nonsmall Cell Lung Cancer. **DNA Cell Biol**, v. 34, n. 1, p. 63-8, 2015.

CHESLEY L.C. Hypertensive disorders or pregnancy. New York, NY, USA: Appleton-Century-Crofts, 1978.

CHESLEY, L.C; COOPER, D.W. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 93, n. 9, p. 898-908, 1986.

CHORLEY, B.N; et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. **Mutat Res**, v. 659, n. 1-2, p. 147-57, 2008.

CORNELIUS, D.C. Preeclampsia: From Inflammation to Immunoregulation. **Clin Med Insights Blood Disord**, v. 11, p. 1-6, 2018.

CORNELIUS, D.C; LAMARCA, B. TH17- and IL-17- mediated autoantibodies and placental oxidative stress play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia. **Minerva Ginecol**, v. 66, n. 3, p. 243-9, 2014.

CORREA, P.J; et al. Etiopathogenesis, prediction, and prevention of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 35, n. 3, p. 280-94, 2016.

CURTIS, M.M; WAY, S.S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, p. 177–185, 2009.

DUHIG, K, et al. Recent advances in the diagnosis and management of pre-eclampsia. **F1000Res**, v. 28, p.7:242, 2018.

DULEY, L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. **Semin Perinatol**, v. 33, n. 3, p. 130–137, 2009.

FIGUEIREDO, A.S, Schumacher, A. The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. **Immunology**, v. 148, n. 1, p. 13-21, 2016.

FOLK, D.M. Hypertensive Disorders of Pregnancy: Overview and Current Recommendations. **J Midwifery Womens Health**, v. 63, n. 3, p. 289-300, 2018.

FREEMAN, D.J; et al. Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. **Hypertension**, v. 44, p. 708–714, 2004.

GAMBINERI, E; et al. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 15, p. 430–5, 2003.

GELDENHUYS, J; et al. Disruption in the Regulation of Immune Responses in the Placental Subtype of Preeclampsia. **Front Immunol**, v. 9, p. 1-15, 2018.

GHARESI-Fard, B; et al. The Expression of T-Helper Associated Transcription Factors and Cytokine Genes in Pre-Eclampsia. **Iran J Immunol**, v. 13, n. 4, p. 296-308, 2016.

GHOLAMI, M; et al. Association study of FOXP3 gene and the risk of pre-eclampsia. **Clin Exp Hypertens**, v. 5, p. 1-4, 2017.

GHULMIYYAH, L; SIBAI, B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. **Semin Perinatol.**, v. 36, n. 1, p. 56-9, 2012.

GIORDANO, J.C; et al. The burden of eclampsia: results from a multicenter study on surveillance of severe maternal morbidity in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 5, e97401, 2014.

HAKONSEN, L.B; et al. Maternal cigarette smoking during pregnancy and reproductive health in children: a review of epidemiological studies. **Asian J Androl**, v. 16, n. 1, p. 39-49, 2014.

HAMMAD, A; et al. Interleukin-17A rs2275913, Interleukin-17F rs763780 and rs2397084 gene polymorphisms as possible risk factors in Juvenile lupus and lupus related nephritis. **Autoimmunity**, v. 49, n. 1, p. 31-40, 2016.

HARMON, A.C; et al. The role of inflammation in the pathology of preeclampsia. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, v. 6, p. 409-19, 2016.

HERNÁNDEZ-DÍAZ, S; et al. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. **BMJ**, v. 18, p. 338, 2009.

HORTOLANI, A.C.C; et al. Investigation of rs1800469 and rs1800468 Polymorphisms of the TGF- β 1 Gene in Women with Pre-eclampsia. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 18, p. 179-185, 2018.

HOSSEINI, A, et al. Regulatory T and T helper 17 cells: Their roles in preeclampsia. **J Cell Physiol**, v. 233, n. 9, p. 6561-6573, 2018.

HSU, P; NANAN, R.K. Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. **Front Immunol**, v 28, n. 5, p. 125, 2014.

HUANG, X; et al. Serum and placental interleukin-18 are elevated in preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 65, n. 1, p. 77-87, 2005.

HUTCHEON, J.A; et al. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 25, n. 4, p.391-403, 2011.

HU, D; et al. Alteration of peripheral CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in pregnancy and pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 87, p. 190–194, 2008.

INOUE, N; et al. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. **Clin Exp Immunol**, v. 162, n. 3, p. 402-6, 2010.

JAHAN, P; et al. Role of Foxp3 gene in maternal susceptibility to pre-eclampsia - a study from South India. **Scand J Immunol**, v. 77, n. 2, p. 104-8, 2013.

- JEYABALAN, A. Epidemiology of preeclampsia: impact of obesity. **Nutr Rev**, n. 71, v. 1, p. 18-25, 2013.
- JIANG, L.L; RUAN, L.W. Association between FOXP3 promoter polymorphisms and cancer risk: A meta-analysis. **Oncol Lett**, v. 8, n. 6, p. 2795-2799, 2014.
- JIANJUN, Z, et al. Imbalance of T-cell transcription factors contributes to the Th1 type immunity predominant in pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n. 1, p. 38-45, 2010.
- KENNY, L.C; et al. Early pregnancy prediction of preeclampsia in nulliparous women, combining clinical risk and biomarkers: the Screening for Pregnancy Endpoints (SCOPE) international cohort study. **Hypertension**, v. 64, n. 3, p. 644-52, 2014.
- KHADER, Y.S; et al. Preeclampsia in Jordan: incidence, risk factors, and its associated maternal and neonatal outcomes. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 31, n. 6, p. 770-776, 2018.
- KHARKOVA, O.A; et al. First-trimester smoking cessation in pregnancy did not increase the risk of preeclampsia/eclampsia: A Murmansk County Birth Registry study. **PLoS One**, v. 12, n. 8, 2017.
- LA ROCCA C, et al. The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. **Immunol Lett**, v. 162, p. 41-8, 2014.
- LAMARCA B, et al. Identifying immune mechanisms mediating the hypertension during preeclampsia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 311, n. 1, p.1-9, 2016.
- LARESGOITI-SERVITJE; et al. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. **Hum. Reprod. Update**, v. 16, p. 510–524, 2010.
- LEON RODRIGUEZ, D.A; et al. Investigation of the role of IL17A gene variants in Chagas disease. **Genes Immun**, v. 16, n. 8, p. 536-40, 2015.
- LIVAK, K.J; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LIU, B; et al. Polymorphisms of the IL27 gene in a Chinese Han population complicated with pre-eclampsia. **Sci Rep**, v. 6, 2016.
- LIU, N; et al. Haplotype-association analysis. **Adv Genet**, v. 60, p.335-405, 2008.
- LUO, Z.C; et al. The effects and mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia: a systematic review. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 21, n. 1, p. 36-45, 2007.
- LU, L; et al. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n.11, p. 703-717, 2017.

MADAZLI, R; et al. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 82, p. 797–802, 2003.

MADHUR, M.S; et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. **Hypertension**, v. 55, p. 500–7, 2010.

MARTINS, E.F; et al. Causas múltiplas de mortalidade materna relacionada ao aborto no Estado de Minas Gerais, Brasil, 2000-2011. **Cad. Saúde Pública**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2017.

McMILLEN, S. Eclampsia. In K. F. Kiple (ed.). **The Cambridge historical dictionary of disease**. New York, Cambridge University Press, 2003,p. 110-112.

MELLEMBAKKEN, J. R; et al. Chemokines and leukocyte activation in the fetal circulation during preeclampsia. **Hypertension**, v. 38, p. 394–398, 2001.

METZ, TD; et al. FOXP3 gene polymorphisms in preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 206, n. 2, p. 1-6, 2012.

MISHRA, S, et al. Study of the association of forkhead box P3 (FOXP3) gene polymorphisms with unexplained recurrent spontaneous abortions in Indian population. **J Genet**, v. 97, n. 2, p. 405-410, 2018.

MOLVAREC, A; et al. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 112, p. 53-7, 2015.

MOR G, et al. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Ann N Y Acad Sci**, v.1221, p. 80-7, 2011.

MORENO-EUTIMIO, M.A; et al. Increased serum levels of inflammatory mediators and low frequency of regulatory T cells in the peripheral blood of preeclamptic Mexican women. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

MOSELEY, T.A; et al. Interleukin- 17 family and IL-17 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, p. 155-174, 2003.

MUNN DH, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 281, p.1191–3, 1998.

NAJAFI S; et al. Association of IL-17A and IL-17 F gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 11, p. 1491-6, 2014.

NEDOSZYTKO B; et al. The role of regulatory T cells and genes involved in their differentiation in pathogenesis of selected inflammatory and neoplastic skin diseases. Part III: Polymorphisms of genes involved in Tregs' activation and function. **Postepy Dermatol Alergol**, v. 34, n. 6, p.517-525, 2017.

- NOROUZIAN, M; et al. FoxP3 gene promoter polymorphism affects susceptibility to preeclampsia. **Hum Immunol**, v. 77, n. 12, p. 1232-1238, 2016.
- ODA, J.M.M; et al. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. **J Genet**, v. 92, p. 163-171, 2013.
- ODEGARD, R. A; et al. Preeclampsia and fetal growth. **Obstet. Gynecol**, v. 96, p. 950–955, 2000.
- OLUSI, S.O; et al: Interleukins in preeclampsia. **Ann Saudi Med**, v. 20, p. 4–7, 2000.
- ORLANDO, I.C JÚNIOR; et al. CASPASE-8 gene polymorphisms (rs13416436 and rs2037815) are not associated with preeclampsia development in Brazilian women. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 31, n. 3, p. 289-293, 2018.
- PHIPPS, E; et al. Preeclampsia: updates in pathogenesis, definitions, and guidelines. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol**, v. 11, n. 6, p. 1102–1113, 2016.
- PINHEIRO, M.B; et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. **Cytokine**, v. 62, n. 1, p. 165-73, 2013.
- QI, Y; et al. Genetic association between Interleukin-17A gene polymorphisms and the pathogenesis of Graves' disease in the Han Chinese population. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 84, n. 2, p. 265-270, 2016.
- QUINN, K.H; et al. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells. **J Reprod Immunol**, v. 91, p. 76–82, 2011.
- RAGUEMA, N; et al. FAS A-670G and Fas ligand IVS2nt A 124G polymorphisms are significantly increased in women with pre-eclampsia and may contribute to HELLP syndrome: a case-controlled study. **BJOG**, 2018.
- RAMOS, J.G.L; et al. Preeclampsia. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 39, n. 9, p. 496-511, 2017.
- REDMAN, C.W; SARGENT, I.L. Immunology of pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 63, n.6, p. 534- 43, 2010.
- REYNOLDS, J.M; et al. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 6, p. 413–423, 2010.
- RIBEIRO, V.R; et al. Association between cytokine profile and transcription factors produced by T-cell subsets in early- and late-onset pre-eclampsia. **Immunology**, v. 152, n. 1, p. 163-173, 2017.
- RINEHART, B.K; et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 181, n. 4, p. 915-20, 1999.

RYCKMAN, K; WILLIAMS, S.M. Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies. **Curr Protoc Hum Genet**, v.1, p. 1.18, 2008.

SACHIDANANDAM, R; et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 409, p. 928–933, 2001.

SAITO, S; et al. Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, p. 649–57, 2011.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 531–62, 2004.

SALAZAR GARCIA, M.D; et al. Early pregnancy immune biomarkers in peripheral blood may predict preeclampsia. **J Reprod Immunol**, v. 125, p. 25-31, 2018.

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

SANTNER-NANAN, B; et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3⁺ and IL-17-producing CD4⁺ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. **J Immunol**, v. 183, p. 7023–7030, 2009.

SAXENA, D; et al. The transcription factor Forkhead Box P3 gene variants affect idiopathic recurrent pregnancy loss. **Placenta**, v. 36, n. 2, p. 226-31, 2015.

SAY, L; et al. Global causes of maternal death: aWHO systematic analysis. **Lancet Glob Health**, v. 2, n. 6, p.323–333, 2014.

SZARKA, A; et al. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. **BMC Immunol**, v.2, n. 2010 Dec 2;11:59. doi: 10.1186/1471-2172-11-59. PubMed PMID: 21126355; PubMed Central PMCID:

SCHAID, D. J., et al. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. **Am. J. Hum. Genet**, v. 70, p. 425–434, 2002.

SENHAJI, N; et al. Association of inflammatory cytokine gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in a Moroccan cohort. **Genes Immun**, v. 17, v.1, p. 60-5, 2016.

SHARMA, A; et al. Leptin, IL-10 and inflammatory markers (TNF-alpha, IL-6 and IL-8) in pre-eclamptic, normotensive pregnant and healthy non-pregnant women. **Am J Reprod Immunol**, v. 58, n. 1, p. 21-30, 2007.

SHEHJAR, F, et al. Association of FoxP3 promoter polymorphisms with the risk of Graves' disease in ethnic Kashmiri population. **Gene**, v. 672, p. 88-92, 2018.

SHEN, Z; et al. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. **J Cell Mol Med**, v. 114, p. 1–2, 2010.

SIBAI, B; DEKKER, G; KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 365, p.785-99, 2005.

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

SKJAERVEN, R; et al. Recurrence of pre-eclampsia across generations:exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. **Br Med J**, v.331, p.877-90, 2005.

SPEERT, H. **Obstetric and gynecologic milestones: Essays in eponymy**. New York, Macmillan Company, 1958.

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

TANAKA, S.C.S.V; et al. Contribuição dos Polimorfismos no gene VEGF para o desenvolvimento das Síndromes Hipertensivas Gestacionais: uma revisão de literatura. **REAS**, 3, (2), p. 86-96, 2014.

The National Institute for Health and Care Excellence. Hypertension in pregnancy: diagnosis and management. Clinical Guidelines CG2017. London, UK: NICE; 2011.

TIAN T, et al. Association of two FOXP3 polymorphisms with breast cancer susceptibility in Chinese Han women. **Cancer Manag Res**, v. 26; n. 10, p. 867-872, 2018.

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

TRANQUILLI, A.L, et al: Placental cytokines in the pathogenesis of preeclampsia and HELLP syndrome. **Curr Womens Health Rev**, n.1, p. 280-285, 2008.

TROWSDALE, J.; BETZ, A. G. Mother's little helpers : mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nature Immunology**, v. 7, n. 3, p. 241–246, 2006.

US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE; et al. Screening for Preeclampsia: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. **JAMA**, v. 317, n.16, p.1661-1667, 2017.

VALENZUELA FJ, et al. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. **J Pregnancy**, 2012.

VARGAS-ALARCÓN, G; et al. Interleukin-17A gene haplotypes are associated with risk of premature coronary artery disease in Mexican patients from the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) study. **PLoS One**, v. 10, n. 1, 2015.

VARGAS-ROJAS, M.I; et al. Th1, Th2, Th17 and Treg levels in umbilical cord blood in preeclampsia. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 29, p. 1642–5, 2015.

VEENSTRA van NIEUWENHOVEN, A.L, et al. The immunology of successful pregnancy. **Hum Reprod Update**, n. 9, p. 347-57, 2003.

von DADELSZEN, P; MAGEE, L.A; ROBERTS, J.M. Subclassification of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 22, n. 2, p.143-8, 2003.

WANG, H; et al. Role of IL-17 Variants in Preeclampsia in Chinese Han Women. **PLoS One**, v. 10, n. 10, 2015.

WANG, Y., et al. An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 10, p. 5983–5992, 2010.

WEI, J; et al. Cigarette smoking during pregnancy and preeclampsia risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43667-78, 2015.

WEISS, K. M; et al. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends Genet**, v. 18, p. 19–24, 2002.

WILLIAMS, P.J; PIPKIN, F.B. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 405–417, 2011.

WRIGHT, D; et al. Competing risks model in screening for preeclampsia by maternal characteristics and medical history. **Am J Obstet Gynecol**, v. 213, n. 1, p. 1-10, 2015.

WU, Z; et al. Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population. **Clin Dev Immunol**, p. 1-7, 2012.

XIE, C; et al. A meta-analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 in preeclampsia. **Cytokine**, v. 56, n. 3, p. 550-9, 2011.
22019000.

YIN, J; et al. Interleukin 17A rs4711998 A>G polymorphism was associated with a decreased risk of esophageal cancer in a Chinese population. **Dis Esophagus**, v. 27, n. 1, p. 87-92, 2014.

ZHANG B; et al. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 374, p. 533-537, 2008.

ZHOU, F; et al. Associations of genotypes and haplotypes of IL-17 with risk of gastric cancer in an eastern Chinese population. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 82384-82395, 2016.

ZIDAN, H.E; et al. The association of IL-33 and Foxp3 gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Egyptian women. **Cytokine**, v. 108, p. 115-119, 2018.

ZIDAN, H.E, et al. Interleukin-17 and leptin genes polymorphisms and their levels in relation to recurrent pregnancy loss in Egyptian females. **Immunogenetics**, v. 67, n. 11-12, p. 665-73, 2015.

APÊNDICE I - TERMO DE ESCLARECIMENTO

(Para participação do Grupo Controle MENORES DE IDADE)

TÍTULO DO PROJETO: “CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا”

JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA:

A pré-eclâmpsia é uma doença exclusiva da gestação, onde ocorre aumento da pressão arterial e presença de proteínas na urina. A falta de informações a respeito da causa dessa doença torna difícil sua prevenção e o diagnóstico precoce. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a adolescente sob sua responsabilidade está sendo convidada a participar, de maneira voluntária, do projeto de pesquisa: **“CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا”**. Nessa pesquisa é necessário comparar os dados das mulheres com pré-eclâmpsia com os de mulheres que tiveram/tem uma gestação saudável. Como a adolescente sob sua responsabilidade teve/ tem uma gestação normal, está sendo convidada a participar do grupo controle do estudo.

Esse trabalho tem como objetivo investigar a contribuição de fatores genéticos e imunológicos para o desenvolvimento dessa doença.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E RISCOS:

A adolescente sob sua responsabilidade responderá um questionário com dados sobre a gestação, histórico familiar, entre outros dados a serem analisados nessa pesquisa.

Serão coletados de 5 a 10 ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma coleta) e no momento do parto serão coletados alguns fragmentos da placenta. As amostras serão coletadas no Ambulatório, e/ou Enfermaria do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia e no Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e analisadas no Laboratório de Genética Humana e Molecular e Laboratório de Imunologia da UFTM.

Não será feito nenhum procedimento que traga risco a vida da adolescente ou de seu filho (a). A adolescente sob sua responsabilidade poderá ter algum desconforto na coleta de sangue.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO E USO DO MATERIAL BIOLÓGICO:

Autorizo o armazenamento do restante de material biológico da adolescente sob minha responsabilidade e concordo com a utilização desse material em possíveis desdobramentos deste projeto de pesquisa.

Autorizo

Não autorizo

Ressaltamos que caso haja a necessidade de novos estudos, será necessária a aprovação prévia do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Instituição.

BENEFÍCIOS ESPERADOS:

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a adolescente sob sua responsabilidade. O benefício principal da participação é possibilitar que no futuro, os resultados alcançados com esta pesquisa possam auxiliar no diagnóstico e tratamento desta doença, beneficiando as mulheres com pré-eclâmpsia.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA, CONFIDENCIALIDADE E CUSTOS:

Você e a adolescente sob sua responsabilidade entendem que tiveram o direito a recusarem participar deste projeto e que a recusa não afetará de nenhuma maneira seus cuidados médicos.

Você poderá obter todas as informações que quiser e retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao atendimento. Pela participação no estudo, a adolescente sob sua responsabilidade não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. O nome da adolescente sob sua responsabilidade não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois ela será identificada com um número. Os resultados da pesquisa estarão à disposição quando finalizada.

Pesquisador Responsável:

Nome: Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

E-mail: balarin@mednet.com.br

Telefone: (34) 33183454

Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

Praça Manoel Terra, 330 – CEP38015-050 – Uberaba, MG, Brasil

APÊNDICE II - TERMO DE ESCLARECIMENTO

(Para participantes do **Grupo Controle Maiores de Idade**)

TÍTULO DO PROJETO: “CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا”

JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA:

A pré-eclâmpسيا é uma doença exclusiva da gestação, onde há elevação da pressão arterial e presença de proteínas na urina. A falta de informações a respeito da causa dessa doença torna difícil sua prevenção e o diagnóstico precoce. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a Sr^a está sendo convidada a participar, de maneira voluntária, do projeto de pesquisa: “**CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا**”. Nessa pesquisa é necessário comparar os dados das mulheres com pré-eclâmpسيا com os de mulheres que tiveram/tem uma gestação saudável. Como você teve/ tem uma gestação normal, está sendo convidada a participar do grupo controle do estudo.

Esse trabalho tem como objetivo investigar a contribuição de fatores genéticos e imunológicos para o desenvolvimento dessa doença.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E RISCOS:

Você responderá um questionário sobre sua gestação, histórico familiar, entre outros dados a serem analisados nessa pesquisa.

Serão coletados de 5 a 10 ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma coleta) e no momento do parto serão coletados alguns fragmentos da placenta. As amostras serão coletadas no Ambulatório, e/ou Enfermaria do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia e no Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e analisadas no Laboratório de Genética Humana e Molecular e Laboratório de Imunologia da UFTM.

Não será feito nenhum procedimento que lhe traga risco à sua vida ou de seu filho (a). Você poderá ter algum desconforto na coleta de sangue.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO E USO DO MATERIAL BIOLÓGICO:

Autorizo o armazenamento do restante de meu material biológico e concordo com sua utilização em possíveis desdobramentos deste projeto de pesquisa.

Autorizo

Não autorizo

Ressaltamos que caso haja a necessidade de novos estudos, será necessária a aprovação prévia do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Instituição.

BENEFÍCIOS ESPERADOS:

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a você. O benefício principal de sua participação é possibilitar que no futuro, os resultados alcançados com esta pesquisa possam auxiliar no diagnóstico e tratamento desta doença, beneficiando as mulheres com pré-eclâmpسيا.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA, CONFIDENCIALIDADE E CUSTOS:

Você entende que teve o direito de se recusar a participar deste projeto e que sua recusa não afetará de nenhuma maneira seus cuidados médicos.

Você poderá obter todas as informações que quiser e retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificada com um número. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Pesquisador Responsável:

Nome: Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

E-mail: balarin@mednet.com.br

Telefone: (34) 33183454

Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

Praça Manoel Terra, 330 – CEP38015-050 – Uberaba, MG, Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o GRUPO DE ESTUDO MENORES DE IDADE)

APÊNDICE III - TERMO DE ESCLARECIMENTO

TÍTULO DO PROJETO: “CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا”

JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA:

A pré-eclâmpsia é uma doença exclusiva da gestação, onde ocorre aumento da pressão arterial e presença de proteínas na urina. A falta de informações a respeito da causa dessa doença torna difícil sua prevenção e o diagnóstico precoce. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a adolescente sob sua responsabilidade está sendo convidada a participar, de maneira voluntária, do projeto de pesquisa: “**CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا**”. Nessa pesquisa é necessário comparar os dados das mulheres com pré-eclâmpsia com os de mulheres que tiveram/tem uma gestação saudável. Como a adolescente sob sua responsabilidade teve/ tem pré-eclâmpsia, está sendo convidada a participar do grupo de estudo desse trabalho.

Esse trabalho tem como objetivo investigar a contribuição de fatores genéticos e imunológicos para o desenvolvimento dessa doença

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E RISCOS:

A adolescente sob sua responsabilidade responderá um questionário com dados sobre a gestação, histórico familiar, entre outros dados a serem analisados nessa pesquisa.

Serão coletados de 5 a 10 ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma coleta) e no momento do parto serão coletados alguns fragmentos da placenta. As amostras serão coletadas no Ambulatório, e/ou Enfermaria do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia e no Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e analisadas no Laboratório de Genética Humana e Molecular e Laboratório de Imunologia da UFTM.

Não será feito nenhum procedimento que traga risco a vida da adolescente ou de seu filho (a). A adolescente sob sua responsabilidade poderá ter algum desconforto na coleta de sangue.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO E USO DO MATERIAL BIOLÓGICO:

Autorizo o armazenamento do restante de material biológico da adolescente sob minha responsabilidade e concordo com a utilização desse material em possíveis desdobramentos deste projeto de pesquisa.

Autorizo

Não autorizo

Ressaltamos que caso haja a necessidade de novos estudos, será necessária a aprovação prévia do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Instituição.

BENEFÍCIOS ESPERADOS:

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a adolescente sob sua responsabilidade. O benefício principal da participação é possibilitar que no futuro, os resultados alcançados com esta

pesquisa possam auxiliar no diagnóstico e tratamento desta doença, beneficiando as mulheres com pré-eclâmpsia.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA, CONFIDENCIALIDADE E CUSTOS:

Você e a adolescente sob sua responsabilidade entendem que tiveram o direito de se recusarem a participar deste projeto e que a recusa não afetará de nenhuma maneira seus cuidados médicos.

Você poderá obter todas as informações que quiser e retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo ao atendimento. Pela participação no estudo, a adolescente sob sua responsabilidade não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. O nome da adolescente sob sua responsabilidade não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois ela será identificada com um número. Os resultados da pesquisa estarão à disposição quando finalizada.

Pesquisador Responsável:

Nome: Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

E-mail: balarin@mednet.com.br

Telefone: (34) 33183454

Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

Praça Manoel Terra, 330 – CEP38015-050 – Uberaba, MG, Brasil

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o GRUPO DE ESTUDO MAIOR DE IDADE)

APÊNDICE IV - TERMO DE ESCLARECIMENTO

TÍTULO DO PROJETO: “CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا”

JUSTIFICATIVA E OS OBJETIVOS DA PESQUISA:

A pré-eclâmpسيا é uma doença exclusiva da gestação, onde há elevação da pressão arterial e presença de proteínas na urina. A falta de informações a respeito da causa dessa doença torna difícil sua prevenção e o diagnóstico precoce. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a Sr^a está sendo convidada a participar, de maneira voluntária, do projeto de pesquisa: “**CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPسيا**”. Nessa pesquisa é necessário comparar os dados das mulheres com pré-eclâmpسيا com os de mulheres que tiveram/tem uma gestação saudável. Como você teve/ tem pré-eclâmpسيا, está sendo convidada a participar do grupo de estudo deste trabalho.

Esse trabalho tem como objetivo investigar a contribuição de fatores genéticos e imunológicos para o desenvolvimento dessa doença.

PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS E RISCOS:

Você responderá um questionário sobre sua gestação, histórico familiar, entre outros dados a serem analisados nessa pesquisa.

Serão coletados de 5 a 10 ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma coleta) e no momento do parto serão coletados alguns fragmentos da placenta. As amostras serão coletadas no Ambulatório, e/ou Enfermaria do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia e no Centro Cirúrgico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e analisadas no Laboratório de Genética Humana e Molecular e Laboratório de Imunologia da UFTM.

Não será feito nenhum procedimento que lhe traga risco à sua vida ou de seu filho (a). Você poderá ter algum desconforto na coleta de sangue.

AUTORIZAÇÃO PARA ARMAZENAMENTO E USO DO MATERIAL BIOLÓGICO:

Autorizo o armazenamento do restante de meu material biológico e concordo com sua utilização em possíveis desdobramentos deste projeto de pesquisa.

Autorizo

Não autorizo

Ressaltamos que caso haja a necessidade de novos estudos, será necessária a aprovação prévia do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Instituição.

BENEFÍCIOS ESPERADOS:

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a você. O benefício principal de sua participação é possibilitar que no futuro, os resultados alcançados com esta pesquisa possam auxiliar no diagnóstico e tratamento desta doença, beneficiando as mulheres com pré-eclâmpsia.

BASES DA PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA, CONFIDENCIALIDADE E CUSTOS:

Você entende que teve o direito de se recusar a participar deste projeto e que sua recusa não afetará de nenhuma maneira seus cuidados médicos.

Você poderá obter todas as informações que quiser e retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificada com um número. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Pesquisador Responsável:

Nome: Dra. Marly Aparecida Spadotto Balarin

E-mail: balarin@mednet.com.br

Telefone: (34) 33183454

Endereço: Laboratório de Genética Humana e Molecular

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

Praça Manoel Terra, 330 – CEP38015-050 – Uberaba, MG, Brasil

APÊNDICE V - ENTREVISTA

CONTRIBUIÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ-ECLÂMPSIA

RG HC: _____ RG Genética: _____ DATA: ___/___/___

1 - IDENTIFICAÇÃO: INFORMANTE:

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ IDADE: _____ COR: ()Branca ()Não branca

NATURAL DE: _____

PROCEDÊNCIA: _____

GRUPO SANGUÍNEO: _____

ESCOLARIDADE: () analfabeta ()1º grau incompleto ()1º grau completo ()2º grau

()superior

OCUPAÇÃO ATUAL: _____

CONJUGE: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ IDADE: _____ COR: ()Branca ()Não branca

GRUPO SANGUÍNEO: _____

ESCOLARIDADE: () analfabeta ()1º grau incompleto ()1º grau completo ()2º grau

()superior

OCUPAÇÃO: _____

ENDEREÇO: _____

_____ CEP _____

TEL.: (_____) _____ () RES. () RECADO COM: _____

2 - EXAMES LABORATORIAIS:

Série vermelha: _____

Série Branca: _____

Plaquetas: _____

TGO: _____

TGP: _____

Urina: _____

3 – DADOS ADICIONAIS

PAS: _____ PAD: _____ FC: _____

PESO (ANTES DA GESTAÇÃO OU 1ª CONSULTA PRÉ-NATAL): _____

ALTURA: _____ IMC: _____

4 - PARIDADE:

G _____ P _____ C _____ N _____ AE _____ AP _____

G	IDADE DA MÃE	SEXO FILHO	INTERCORRÊNCIAS	PARCEIRO

5- ANTECEDENTES FAMILIARES

Recorrência familiar de pré-eclâmpsia?.

MATERNOS () Sim () Não

() 1ª geração (mãe/irmã) () 2ª geração (tias/avós) Quem? _____

PATERNOS () Sim () Não

() 1ª geração (mãe/irmã) () 2ª geração (tias/avós) Quem? _____

6- ANTECEDENTES PESSOAISFEMININO:

DOENÇA CRÔNICA?:

() Sim Qual? _____

() Não

USO CRÔNICO DE BEBIDA ALCOÓLICA? Sim Qto: _____ Não**TABAGISMO** Sim Qtos cigarros ao dia? _____ NãoUSO DE DROGAS ILÍCITAS? Sim Qual _____ Não

OUTROS DADOS RELEVANTES _____

7- DADOS DA GESTAÇÃO ATUAL

IDADE GESTACIONAL: _____ (DUM) _____ (US)

Nº DE CONSULTAS AO FINAL DA GESTAÇÃO: >6 <6**DIAGNÓSTICO:** PRÉ-ECLÂMPSIA LEVE GRAVE GESTAÇÃO SAUDÁVEL**SE GESTANTE COM PE:**

IDADE GESTACIONAL DO DIAGNÓSTICO: _____ (DUM)

PROTEINÚRIA 24HRS E/OU URINA TIPO I _____

EM USO DE MEDICAMENTOS?

 Sim Quais? _____ Não**8- DADOS DO PARTO**

DATA DO PARTO: ____/____/_____ IDADE GESTACIONAL _____(DUM) _____(US)

TIPO DE PARTO: CESÁREA INDICAÇÃO _____

PARTO NORMAL

PESO DO RN: _____

SEXO RN: _____

DESTINO RN: ALOJAMENTO CONJUNTO BERÇÁRIO UTI NEO

APGAR: 1' _____ 5' _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Contribuição de fatores genéticos e imunológicos para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

Pesquisador: Marly Aparecida Spadotto Balarin

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 44460115.1.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.099.692

Data da Relatoria: 08/05/2015

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

*TEMA EM ESTUDO

A gestação é um fenômeno onde os eventos iniciais são caracterizados pela placentação e a presença de tolerância imunológica no ambiente uteroplacentário (MOORE, 2008). A placentação tem início após a fecundação do óvulo pelo espermatozóide, dando início a um processo de divisão celular caracterizado pela fusão do material genético paterno e materno, formando o blastocisto. O blastocisto é então estimulado a fazer com que sua camada mais externa, denominada trofoblasto, se diferencie e invada o endométrio uterino (MOORE, 2008). Para que o processo de placentação e desenvolvimento do embrião ocorra é necessário que o sistema imunológico da mãe não reconheça os antígenos fetais como estranhos. Neste sentido, acredita-se que o ambiente uterino seja imunologicamente privilegiado (TROWSDALE & BETZ, 2008).

A manutenção da gestação representa um desafio para o sistema imunológico materno, uma vez que o mesmo deve defender o organismo contra patógenos e tolerar aloantígenos expressos em tecidos fetais. Em termos imunológicos, o feto é chamado de semi alogênico, pela presença de antígenos de origem materna e paterna (LA ROCCA et al., 2014). Embora a organização anatômica

Endereço: Rua Madre Marta José, 122
 Bairro: Nossa Gra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqg.ufm.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 1.099.692

da interface materno-fetal minimize o contato imunológico, são necessários mecanismos adicionais para auxiliar o feto a evadir-se do ataque do sistema imunológico materno (MUNN et al., 1998). Convulsões em mulheres grávidas e o termo eclâmpsia são relatados há milênios, tendo seus registros mais antigos datados de 3000 anos A.C, no Egito, em um manuscrito conhecido como "Papiro de Kahun" (STEVENS, 1975; ROBERTS, COOPER, 2001; LINDHEIMER et al., 2009). A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação, reconhecida desde a antiguidade como uma das principais causas de mortalidade materna e perinatal. É definida por níveis tensionais maiores ou iguais a 140 e/ou 90 mmHg (milímetros de mercúrio) em duas medidas com intervalo de 4 a 6 horas e proteinúria (com ou sem edema) maior ou igual a 300 mg em 24 horas ou uma cruz pelo método da fita na urina, após a 20ª semana de gestação. É denominada de "doença das teorias" devido às diversas hipóteses existentes sobre sua fisiopatologia (CHESLEY, 1978; ROBERTS, 1998; NHBPEP, 2000). Pode ser classificada em precoce, tendo início antes da 34ª semana de gestação, estando associada a uma forma clínica mais grave. Reflete lesões isquêmicas placentárias, com a presença de um componente genético mais acentuado, havendo maior taxa de recorrência e pior prognóstico materno-fetal. Seu surgimento antes da 24ª semana de gestação está associado à alta taxa de morbidade materna e fetal, com chances de 50% de recorrência em gestações subsequentes e alta incidência de hipertensão crônica no futuro (DEKKER et al., 1995; Von DADELSZEN et al., 2003; ROBERTS; CATOV, 2008). Já a PE tardia tem início após a 34ª semana de gestação e está associada a um comportamento normal ou levemente alterado das artérias uterinas espiraladas, sem sinais de restrição de crescimento intra-uterino e de melhor prognóstico materno-fetal (DEKKER et al., 1995; HUPPERTZ, 2008). A PE pode evoluir para a eclâmpsia (E), quando ocorrem crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas ou para a Síndrome HELLP, onde a gestante apresenta hemólise, plaquetopenia e disfunção hepática (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINE, 2005).

Embora alterações do sistema imunológico estejam associadas com a origem da PE, outros fatores, incluindo citocinas pró-inflamatórias, ativação de neutrófilos e disfunção endotelial também estão relacionadas com a fisiopatologia desta síndrome. Desse modo, têm sido propostas duas etapas para o surgimento e desenvolvimento da PE: a primeira etapa culmina com a falha da invasão trofoblástica devido a alterações na produção de citocinas imunoreguladoras e fatores angiogênicos e a segunda etapa tem como resultado a resposta inflamatória sistêmica materna, envolvendo principalmente o endotélio, sendo promovida pela liberação de células trofoblásticas necróticas e/ou apoptóticas na circulação (SARGENT et al., 2008; LARESGOITI-SERVITJE, 2010). Portanto, diz-se que a PE é uma doença de caráter multifatorial, resultante de complexas

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqpg.ufm.edu.br



Continuação do Parecer: 1.099.692

interações entre fatores genéticos e ambientais. Parece recorrer mais em parentes de indivíduos afetados do que na população geral e essa agregação familiar pode ser atribuída ao fato de que membros de uma mesma família além de compartilhar a informação genética, também estão expostos aos mesmos fatores ambientais (NUSSBAUM, 2008). Tabagismo, doença renal, obesidade, gestação múltipla, primiparidade, extremos de idade do ciclo reprodutivo, antecedentes pessoais ou familiares de PE e/ou hipertensão arterial crônica são considerados alguns fatores de risco para o desenvolvimento de PE (NHBPEP, 2000; FREIRE, TEDOLDI, 2009). No entanto, a real etiologia da doença permanece desconhecida (PERAÇOLLI, PARPINELLI; 2005).

O sistema imune é responsável pela discriminação entre antígenos próprios e não próprios, mantendo um estado de tolerância contra autoantígenos. Mecanismos de tolerância estão envolvidos no controle de respostas imunes inapropriadas, prevenindo doenças autoimunes e distúrbios autoinflamatórios (SAKAGUICHI et al., 2004).

As células TCD4+ podem ser induzidas a se diferenciarem em linhagens específicas Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg) de acordo com o ambiente local de citocinas. Células Th1 estão envolvidas na imunidade celular; células Th2 estão envolvidas na imunidade humoral e ativação de eosinófilos, células Th17 protegem contra infecções fúngicas e mediadoras inflamatórias em diferentes tipos de tecido, e as células Treg são importantes na manutenção de autotolerância e regulação da inflamação (SAITO et al., 2010).

A autotolerância periférica e homeostase imune são mantidas, pelo menos em parte, por células T reguladoras (Treg) Essas células representam um pequeno subconjunto de células T que constituem cerca de 5-15% das células T CD4+ periféricas (SAKAGUICHI et al., 2004).

As células Treg desempenham papel crucial na manutenção da autotolerância e da tolerância materna ao feto. Níveis elevados de Tregs no sangue e decídua materna estão associados a gestações normais, ao passo que níveis circulantes reduzidos foram observados em mulheres com complicações na gestação, incluindo abortos espontâneos e pré-eclâmpsia. O gene que controla o desenvolvimento e função dessas células é conhecido como: fator de transcrição, forkhead box P3 (Foxp3) (HORI et al., 2003).

Este gene está localizado no cromossomo X (Xq11.23-Xq13.3), constituído por 11 éxons e codifica uma proteína com 431 aminoácidos e peso molecular de 47.25kD. A importância deste gene para a biologia das células Treg foi relatada em estudos que identificaram a correlação entre uma mutação de perda de função no gene Foxp3 e síndrome IPEX (desregulação imune, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X), caracterizada por diabetes, tireoidite, anemia hemolítica, síndrome de hiper IgE, dermatite esfoliativa, esplenomegalia e linfadenopatia (BENNETT

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqpg.ufmtm.edu.br



Continuação do Parecer: 1.099.692

et al., 2001; GAMBINERI et al., 2003).

Estudos demonstraram que a inativação do gene *Foxp3* em modelos animais resultou na deficiência e supressão das funções de Treg (SOMERSET et al., 2004). Além disso, estudos observaram menor expressão do gene *Foxp3* no endométrio de mulheres com infertilidade sem causa aparente, reforçando o papel das células Treg na tolerância fetal (JASPER et al., 2006).

Evidências sugerem que defeitos envolvendo as células T reg promovam a rejeição de células fetais, causando hipertensão arterial e as manifestações clínicas associadas a PE. Esses defeitos podem ser oriundos de polimorfismos no gene do fator de transcrição *Foxp3*, no entanto as variantes genéticas de *Foxp3* não têm sido exploradas suficientemente nos termos da suscetibilidade materna para PE (JAHAN et al., 2012).

Poucos polimorfismos deste gene foram investigados na tentativa de elucidar seu papel na etiologia da PE. Dentre eles, o rs3761548 C>A, localizado na região promotora do gene *Foxp3*, já foi associado à baixa regulação deste fator de transcrição. Jahan e colaboradores (2012), num estudo realizado na Índia, sugeriram que o alelo A do polimorfismo rs3761548 confere proteção contra PE. Já um estudo realizado na China, observou que o polimorfismo rs5902432 del/ATT pode contribuir potencialmente no desenvolvimento de PE em mulheres chinesas da etnia Han (CHEN et al., 2013).

A redução na expressão e associação de polimorfismos no gene *Foxp3* com PE demonstra que as células Tregs podem estar envolvidas no desequilíbrio da tolerância imunológica entre a mãe e feto e, desta forma participar na patogênese da PE (CHEN et al., 2013).

Linfócitos Th17 são um subconjunto recentemente descoberto de linfócitos T CD4+ que produzem IL-17 e IL22. Sua descoberta levantou a hipótese de um perfil de predomínio Th1/Th2 sobre Th17/Treg em condições inflamatórias crônicas. A hiper-regulação da imunidade via Th17 pode contribuir para o desenvolvimento e progressão de doenças autoimunes, inflamatórias crônicas, reações de rejeição ao enxerto, além de perturbações alérgicas. Da mesma forma, deficiência de células Th17 pode levar a infecções virais, bacterianas ou fúngicas recorrentes. O receptor retinóide nuclear (RORC) é o regulador chave na diferenciação da linhagem de células Th17 (BETTELI et al., 2007; ANNUNZIATO et al., 2008; CURTIS et al., 2009).

Uma das principais citocinas secretadas pelas células Th17 é a interleucina 17 (IL17) A IL17 é uma citocina pró-inflamatória, que desempenha um papel importante tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo. Sua secreção já foi associada ao desenvolvimento de doença inflamatória intestinal e outros distúrbios autoimunes (KAABACHI et al., 2014). A ligação de IL-17 ao seu receptor inicia vias de sinalização que induzem a produção de citocinas e quimiocinas pró-

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqpg.ufm.edu.br



Continuação do Parecer: 1.099.692

inflamatórias e o recrutamento de neutrófilos (REYNOLDS et al., 2010).

Recentemente tem sido proposto o envolvimento das células Th17 na fisiopatologia da PE. Estudos observaram que mulheres com PE apresentaram níveis elevados de Th17 na circulação, quando comparadas com mulheres com gestação normal (CORNELIUS, LAMARCA, 2014). Essa hiper-regulação talvez possa ser atribuída a polimorfismos no gene que codifica IL17.

Esse gene está localizado no cromossomo 6 (6p12) e alguns polimorfismos já foram associados ao desenvolvimento de colite ulcerativa, câncer de pulmão não células pequenas e abortos recorrentes (CHENG et al., 2014; LI et al., 2014; NAJAFI et al., 2014). O polimorfismo rs 2275913 G>A, também conhecido como G-197A, está localizado na região upstream do gene IL-17, dentro de um motivo de ligação para o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), um regulador crítico da expressão IL-17. Portanto, é concebível que este SNP possa influenciar na regulação da transcrição de IL-17 (NAJAFI et al., 2014). Apesar de vários estudos já terem relatado associação entre polimorfismos no gene da IL17 e diversas patologias, ainda não existem estudos disponíveis sobre esse tema e a PE.

Dados recentes têm revelado importante ligação funcional entre células Treg e Th17. Essas células necessitam de TGF para se desenvolverem a partir de linfócitos T naives. Treg, que induzem tolerância, e células Th17, que induzem inflamação ou rejeição, parecem surgir a partir de precursores comuns: ou por exposição à TGF sozinho (iTregs) ou TGF, IL-1 ou IL-6 (Th17). Além disso, a conversão de células Treg em células Th17 foi observada em camundongos e seres humanos (AFZALI et al., 2009).

O desequilíbrio entre as células Treg e Th17 tem sido proposto como um mecanismo patogênico em diversas doenças humanas (SANTNER-NANAN et al., 2009).

Sugere-se que o equilíbrio entre as células Tregs e Th17 seja fundamental para a manutenção da tolerância materna ao feto e o sucesso da gestação, e que polimorfismos em genes envolvidos nessas vias, como o gene da IL17 (Th17) e Foxp3 (Treg) possam estar envolvidos na etiopatogênese da pré-eclâmpsia."

"PERGUNTAS DA PESQUISA

1. Genes e/ou polimorfismos genéticos relacionados ao sistema imunológico contribuem para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia?
2. Há elevação significativa de citocinas pró e/ou antiinflamatórias nas gestantes com PE, em relação às gestantes saudáveis?
3. Genes relacionados ao sistema imunológico, encontram-se com expressão alterada nas

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3318-5776 Fax: (34)3318-5776 E-mail: cep@pesqpg.ufm.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - MG



Continuação do Parecer: 1.099.692

gestantes com PE, em relação às gestantes saudáveis?"

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

- "1. Investigar a associação entre polimorfismos em genes relacionados ao sistema imunológico e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia; dentre eles os polimorfismos rs3761549 (C>T), rs3761548 (C>A) e rs22323665 (A>G) no gene Foxp3 e rs2275913 (G>A), rs8193036 (C>T) e rs4711998 (A>G) no gene IL17 em mulheres com gestação normal, em mulheres com pré-eclâmpsia e em seus bebês;
2. Investigar a expressão de genes relacionados ao sistema imunológico, dentre eles os genes Foxp3 e IL17 no tecido placentário de gestantes com PE e compará-la a de gestantes saudáveis;
3. Investigar o perfil de citocinas pró e antiinflamatórias em gestantes com PE e compará-lo ao de gestantes saudáveis."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

"O risco da perda de confidencialidade será minimizado através da identificação das participantes por códigos (letras ou números) e todos os resultados serão armazenados em banco de dados com acesso exclusivo dos pesquisadores com vistas a manter a confidencialidade das informações.

Em vista dos benefícios para o melhor entendimento da etiopatogênese da pré-eclâmpsia e da possível melhoria no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas| mais eficazes e precoces, os desconfortos gerados pela coleta de sangue se mostram minimizados."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância temática.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O CEP-UFTM informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios anuais, assim como também é obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término

Endereço: Rua Madre Maria José, 122		
Bairro: Nossa Sra. Abadla		CEP: 38.025-100
UF: MG	Município: UBERABA	
Telefone: (34)3318-5776	Fax: (34)3318-5776	E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 1.099.692

do estudo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado em reunião de Colegiado do CEP-UFTM em 08/05/2015.

UBERABA, 10 de Junho de 2015

Assinado por:

**Alessandra Cavalcanti de Albuquerque e Souza
(Coordenador)**