



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Camila Rodrigues de Melo Barbosa

**Imunorregulação da pré-eclâmpsia:**

Polimorfismo da região promotora do gene *HLA-G* e níveis sorológicos de sHLA-G associados a gravidade da doença

Recife

2022

Camila Rodrigues de Melo Barbosa

**Imunorregulação da pré-eclâmpsia:**

Polimorfismo da região promotora do gene *HLA-G* e níveis sorológicos de sHLA-G associados a gravidade da doença

Dissertação apresentada ao Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Coorientador: Dr. Paulin Sonon

Recife

2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz**

---

B238i Barbosa, Camila Rodrigues de Melo.  
Imunorregulação da pré-eclâmpsia: polimorfismo da região promotora do gene *HLA-G* e níveis sorológicos de sHLA-G associados a gravidade da doença/Camila Rodrigues de Melo Barbosa. – Recife: [s. n.], 2022.  
120 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva; coorientador: Paulin Sonon.

1. Pré-eclâmpsia. 2. Gravidez de alto risco. 3. Antígenos HLA-G. 3. Glicocorticóides. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Sonon, Paulin. III. Título.

---

CDU 618.2

Camila Rodrigues de Melo Barbosa

**Imunorregulação da pré-eclâmpsia:**

Polimorfismo da região promotora do gene *HLA-G* e níveis sorológicos de sHLA-G associados a gravidade da doença

Dissertação apresentada ao Mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 24 de março de 2022.

Banca Examinadora

---

Dr<sup>a</sup> Clarice Neuenschwander Lins de Moraes  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup> Renata dos Santos Almeida  
Real Hospital Português

---

Dr<sup>a</sup>. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho aos meus pais, Reginaldo e Marta, que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até aqui.  
Essa vitória também é de vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelas bênçãos em minha vida e pela oportunidade de viver essa fase com saúde e discernimento. Por ter, diante de todos os desafios, me dado a oportunidade de viver o momento mais sublime da minha vida: o nascimento do meu filho, Heitor.

Aos meus pais, Reginaldo e Marta que são meus maiores incentivadores, que vibram comigo a cada vitória conquistada, que me mostraram o valor dos estudos e me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu marido, Gladstone por todo companheirismo, confiança, paciência e amor durante essa fase tão desafiadora. Obrigada por dividir comigo o fardo dos dias cansativos e compartilhar alegrias e vitórias.

Ao meu irmão Reginaldo e minha cunhada Ingrid, pelo carinho, ajuda, por fazer de tudo para tornar essa caminhada mais suave e compartilhar comigo as angústias e desafios ao longo desses anos.

A minha orientadora, Dra. Norma por ter me dado a oportunidade de fazer parte do laboratório de Imunogenética, pela orientação incansável e ensinamentos que levarei para a vida. Obrigada por não ter desistido de mim e ter me apoiado nos momentos mais desafiadores durante meu mestrado. Nunca esquecerei.

Ao meu coorientador, Paulin que esteve presente durante toda a coleta de dados, experimentos e construção da pesquisa. Sempre disponível. Sem sua colaboração nada disso seria possível.

A todos os meus colegas do laboratório de Imunogenética que tiveram paciência para ensinar, do básico ao mais complexo, todos os pormenores para uma pessoa que nunca trabalhou em laboratório. Levarei todos vocês em meu coração.

A minha amiga e companheira de laboratório, Neila, com quem desabafei, dividi angústias nos dias mais difíceis, aprendi e compartilhei muitos momentos agradáveis.

Aos funcionários e professores do programa de pós-graduação de Biociência e Biotecnologia em Saúde.

Aos funcionários do Centro Obstétrico do HC/UFPE, em especial as residentes Luciana e Kélita, pela colaboração durante os meses de coleta de dados em meio ao caos de uma pandemia.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho pudesse ser realizado.

“É justo que muito custe o que muito vale”  
Santa Tereza D’Ávila (1580)

## RESUMO

BARBOSA, Camila Rodrigues de Melo. **Imunorregulação da pré-eclâmpsia:** polimorfismo da região promotora do gene *hla-g* e níveis sorológicos de sHLA-G associados a gravidade da doença. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

A gravidez humana é permeada por mecanismos de adaptação envolvendo o sistema imunológico que modula sua resposta para que a presença do feto seja tolerada, apesar da expressão de antígenos paternos. HLA-G é uma molécula do MHC de classe-I não-clássica e na gravidez é expressa em altos níveis na placenta. O baixo grau de polimorfismo do HLA-G sugere que ele desempenha papel na indução da tolerância imunológica, pois níveis baixos foram vistos em mulheres com pré-eclâmpsia (PE). O objetivo da pesquisa foi estudar a associação dos níveis de sHLA-G com polimorfismos da região promotora do gene *HLA-G* nas gestantes com PE relacionando à gravidade da doença. 151 gestantes participaram da pesquisa, onde foi realizado avaliação epidemiológica, estudo genético e imunológico. 61,5% das pacientes tinham PE grave, 30,4% PE sem gravidade e 7,6% síndrome hellp. Na admissão as gestantes com síndrome hellp apresentaram alteração nas taxas de plaquetas ( $p=0,0367$ ), ureia (0,0478), ácido úrico (0,0061), TGO ( $p<0,0001$ ), TGP ( $p<0,0001$ ) e DHL ( $p<0,0001$ ), com valores superiores aos da PE grave e PE sem gravidade demonstrando risco de desenvolver formas graves. A análise genética do promotor do gene *HLA-G* para o sítio -486 A/A possivelmente está relacionada ao aumento do risco de desenvolver PE e a presença do alelo -1138 A está associada a um risco 3 vezes maior de apresentar a forma grave da doença. Foi identificado que o haplótipo *HLA-G* -509CC/-400GG/-391GG foi associado a proteção contra a doença ( $p=0,0184$ ), enquanto o *HLA-G* -1138AA/-400GG está relacionado a formas graves ( $p=0,0246$ ). Foi observado maiores níveis de sHLA-G na admissão em relação ao pós-parto, e não houve diferença nos níveis de sHLA-G nas pacientes com PE grave, incluindo a síndrome hellp nas gestantes que usaram corticoide. Este estudo ressaltou a importância das plaquetas, ureia, ácido úrico, TGO, TGP e HDL como marcadores de risco para gravidade da doença durante a admissão da paciente no serviço de saúde.

Palavras-chave: pré-eclâmpsia; antígenos HLA-G; glicocorticóides.

## ABSTRACT

BARBOSA, Camila Rodrigues de Melo. **Immunoregulation of preeclampsia:** polymorphism of the promoter region of the *hla-g* gene and serological levels of sHLA-G associated with disease severity. 2022. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

Human pregnancy is permeated by adaptation mechanisms involving the immune system that modulates its response so that the presence of the fetus is tolerated, despite the expression of paternal antigens. HLA-G is a non-classical class-1 MHC molecule and in pregnancy it is expressed at high levels in the placenta. The low degree of HLA-G polymorphism suggests that it plays a role in inducing immune tolerance, as low levels have been seen in women with preeclampsia. The objective of the research was to study the association of sHLA-G levels with polymorphisms of the promoter region of the HLA-G gene in pregnant women with preeclampsia relating to the severity of the disease. 151 pregnant women participated in the research, where an epidemiological assessment, genetic and immunological study was carried out. 61.5% of patients had severe PE, 30.4% had no severe PE and 7.6% had hellp syndrome. At admission, pregnant women with hellp syndrome showed changes in platelet rates ( $p=0.0367$ ), urea (0.0478), uric acid (0.0061), TGO ( $p<0.0001$ ), TGP ( $p<0.0001$ ) and LDH ( $p<0.0001$ ), with values higher than those of severe PE and non-severe PE, demonstrating a risk of developing severe forms. The genetic analysis of the promoter of the HLA-G gene for the -486 A/A site is possibly related to an increased risk of developing PE, and the presence of the -1138 A allele is associated with a 3-fold increased risk of having the severe form of PE. illness. It was identified that the HLA-G -509CC/-400GG/-391GG haplotype was associated with protection against the disease ( $p=0.0184$ ), while the HLA-G -1138AA/-400GG is related to severe forms ( $p=0.0246$ ). Higher sHLA-G levels were observed at admission compared to postpartum, and there was no difference in sHLA-G levels in patients with severe PE, including hellp syndrome in pregnant women who used corticosteroids. This study highlighted the importance of platelets, urea, uric acid, TGO, TGP and HDL as risk markers for disease severity during patient admission to the health service.

Keywords: Pre-eclampsia, HLA-G Antigens, Glucocorticoids

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo das complicações hipertensivas obstétricas .....	15
Tabela 2 -	Perfil sociodemográfico da população de estudo .....	32
Tabela 3 -	Comorbidades da população de estudo .....	33
Tabela 4 -	Comorbidades familiares da população de estudo .....	33
Tabela 5 -	Sinais e sintomas identificados na admissão.....	34
Tabela 6 -	História do parto atual e condições de nascimento do RN .....	35
Tabela 7 -	Associação de comorbidades a gravidade da pré-eclâmpsia .....	36
Tabela 8 -	Características clínicas associadas a gravidade da pré-eclâmpsia ....	37
Tabela 9 -	Associação de variáveis laboratoriais da gestante na admissão com a gravidade da pré-eclâmpsia .....	38
Tabela 10 -	Associação de variáveis laboratoriais da gestante pós-parto com a gravidade da pré-eclâmpsia .....	39
Tabela 11 -	Associação de variáveis neonatais com a gravidade da pré-eclâmpsia .....	40
Tabela 12 -	Evolução das variáveis laboratoriais no pós-parto da Síndrome hellp .....	41
Tabela 13 -	Evolução das variáveis laboratoriais no pré e pós-parto na PE grave .....	42
Tabela 14 -	Avaliação das variáveis laboratoriais no pré e pós-parto na PE sem gravidade .....	43
Tabela 15 -	Frequência genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene <i>HLA-G</i> em gestantes .....	46
Tabela 16 -	Haplótipo construído com genótipos associados a proteção contra doença .....	47
Tabela 17 -	Haplótipo construído com genótipos associados a evolução da doença em gestantes com PE .....	48
Tabela 18 -	Associação da idade gestacional no parto em relação a gravidade da PE .....	49
Tabela 19 -	Níveis de sHLA-G na admissão e após o parto em nascimentos pré-termo e termo .....	49
Tabela 20 -	Relação entre uso de corticoide e gravidade da pré-eclâmpsia .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
CEP	Comitê de ética em Pesquisa
CIUR	Crescimento Intrauterino Restrito
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
HDL	Lactato desidrogenase
HAS	Hipertensão arterial sistólica
HCG	Hormônio Coriônico Gonadotrófico
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLP	Hormônio lactogênio placentário
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IG	Idade Gestacional
IL	Interleucina
LIF	Fator Inibitório de Leucemia
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MMII	Membros Inferiores
NK	Natural Killer
PA	Pressão Arterial
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PE	Pré-eclâmpsia
PEG	Pré-eclâmpsia Grave
PNI	Psiconeuroimunologia
PR	Receptor de Progesterona
PRE	Elemento de Resposta à Progesterona
RN	Recém-nascido
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	Células T-helper
Treg	Células T regulatórias
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 REFFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	8
1.1 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DA GESTAÇÃO .....	8
1.2 RESPOSTA IMUNE NA GESTAÇÃO.....	9
1.3 EMBRIOLOGIA E FORMAÇÃO DA PLACENTA.....	12
1.4 DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS NA GESTAÇÃO.....	14
1.5 PRÉ-ECLÂMPسيا .....	16
1.6 A MOLÉCULA HLA-G .....	18
1.7 CORTICOIDE PERINATAL .....	22
1.8 EPIDEMIOLOGIA DA ECLÂMPسيا.....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>3 PERGUNTAS CONDUTORAS</b> .....	26
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	27
4.1 OBJETIVO GERAL.....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	28
5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	28
5.2 SELEÇÃO DE PACIENTES .....	28
5.3 DEFINIÇÃO OPERACIONAL DA PRÉ-ECLÂMPسيا .....	28
5.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E AMOSTRAS .....	29
5.5 FRACIONAMENTO DE CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEADAS .....	29
5.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO HUMANO .....	29
5.7 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO.....	30
5.8 DETECÇÃO DE HLA-G SOLÚVEL POR ELISA .....	31
<b>6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E PROCESSAMENTO DE DADOS</b> .....	31
<b>7 RESULTADOS</b> .....	Erro! Indicador não definido.
7.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO:.....	32
7.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS À GRAVIDADE DA PRÉ-ECLÂMPسيا .....	36
7.3 COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS LABORATORIAIS NA EVOLUÇÃO DA PRÉ-ECLÂMPسيا .....	40
7.4 ANÁLISE GENÉTICA DO PROMOTOR DO GENE <i>HLA-G</i> .....	44

7.5 EFEITO DO CORTICOIDE NOS NÍVEIS DE SHLA-G MATERNO NA PRÉ-ECLÂMPZIA GRAVE .....	50
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>APENDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>67</b>
<b>APENDICE B – FICHA DE ENTREVISTA.....</b>	<b>70</b>
<b>APENDICE C - RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE D - ARTIGO PARA SUBMISSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IAM.....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS .....</b>	<b>102</b>

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DA GESTAÇÃO

A gravidez consiste no desenvolvimento e crescimento de um ou mais embriões dentro do útero materno, cujo processo requer inúmeras alterações no corpo da mulher, de abrangência física, endócrina, psicológica e imunológica, com o objetivo de evitar a rejeição do feto, mantendo-o durante todo o período de formação no organismo (SHERER; POSILLICO; SCHWARZ, 2018; WATANABE et al., 2014).

Dentre as alterações físicas, o aumento de tamanho dos vários órgãos sexuais, como o útero (passa de 50g para 1.100g aproximadamente), e as mamas (quase dobram de tamanho) são as mais evidentes. Além disso, os diversos hormônios circulantes podem resultar no desenvolvimento de edema, acne e traços masculinos ou acromegálicos. Em média, a gestante engorda durante a gravidez 11 a 15 kg, e grande parte deste ganho de peso ocorre durante os dois últimos trimestres (HALL; GUYTON, 2017).

Além das alterações físicas, a gestação é caracterizada por um período de mudanças hormonais, que estão associadas a ansiedade e desordens de humor, podendo contribuir para aumento de morbidade e mortalidade materno-fetal. A exposição a eventos estressantes durante o desenvolvimento gestacional pode induzir alterações duradouras nos sistemas neuroendócrino e comportamental, tornando-se fator de risco para abortos, nascimentos prematuros e bebês com baixo peso ao nascer, e transtorno depressivo materno (MARCUS; HERINGHAUSEN, 2009; SHERER; POSILLICO; SCHWARZ, 2018).

Neste período de modificações, os hormônios corticosteroides participam das alterações endócrinas características da gestação, regulando muitos dos processos necessários para a implantação bem-sucedida do embrião, bem como o crescimento e posterior desenvolvimento do feto e da placenta. Os mecanismos pelos quais o feto e a placenta podem ser submetidos a concentrações aumentadas de glicocorticoides no útero, podem ser, entre outros, através de administração de glicocorticoides sintéticos à mãe (maturação pulmonar do feto em gravidez com risco de parto prematuro), ou devido à elevação das concentrações de cortisol materno (comum em situações de estresse). Fisiologicamente, o embrião, placenta e endométrio estão

expostos ao cortisol derivado tanto das glândulas adrenais maternas quanto fetais (MICHAEL; PAPAGEORGHIU, 2008).

Adicionalmente, o Hormônio Coriônico Gonadotrófico (HCG) auxilia, por ação local, a implantação do embrião e diferenciação trofoblástica, além de ser fundamental na manutenção da secreção de progesterona pelo corpo lúteo até a fase placentária da síntese de progesterona, por volta da 8ª semana de gestação. Já a possível influência dos glicocorticoides no aumento da apoptose decidual e placentária e na diminuição da síntese e sinalização de citocinas pró-inflamatórias são algumas ações que impedem o sucesso gestacional no início da gravidez (MONDADORI, 2010; PERSSON et al., 2017).

De acordo com estudos na área de Psiconeuroimunologia (PNI), a exposição crônica de um indivíduo ao estresse, ansiedade e a outros fatores emocionais, como a depressão, sob a influência das alterações hormonais, pode alterar a modulação do sistema imunológico, alterando também o processo gestacional (DONADIO; VARGAS, 2015).

## 1.2 RESPOSTA IMUNE NA GESTAÇÃO

As mudanças imunológicas observadas no período gestacional têm como principal objetivo evitar a rejeição e promover o desenvolvimento do feto, que é considerado um tecido semi-alogênico, pois contém 50% de material genético paterno (HUNT, 2009). Por esse motivo, o sistema imunológico da gestante deve ser ativo para proteger tanto a mãe e o feto de agentes patógenos, como também, ser regulado para que a presença do feto semi-alogênico seja tolerada, sendo suprimido apesar da expressão dos antígenos paternos (PERSSON et al., 2017)

Além disso ainda no início da gestação, o processo de imunomodulação é essencial devido a intensa proliferação celular no útero para formação e implantação da placenta e desenvolvimento do concepto, uma vez que mãe e embrião/feto são dois seres geneticamente diferentes e que estão em íntimo contato. Portanto, mecanismos específicos se fazem necessários para o sucesso gestacional (HVIID, 2016; MONDADORI, 2010).

Dentre estes mecanismos, estão a influência da progesterona sobre o sistema imune da mãe participando do bloqueio da proliferação de linfócitos, prolongamento

da sobrevivência de aloenxerto, modulação na produção de anticorpos além de redução na produção de citocinas pró-inflamatórias com a mudança no perfil de produção de citocinas para o tipo Th2 (WILCZYN´SKI, 2005; SZEKERES-BARTHO; HALASZ; PALKOVICS, 2009).

As células Th1 produzem principalmente IFN- $\gamma$  e IL-2, mas não IL-4 e IL-5, e desempenham papel nas respostas imunes celulares contra patógenos intracelulares. Já as células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-10, mas não IFN- $\gamma$ , e estão envolvidas na imunidade humoral e respostas alérgicas (VIANA, 2009). As subpopulações Th1 e Th2 se regulam mutuamente, sendo que a produção de IL-10 inibe o desenvolvimento e atividade das células Th1, enquanto estas são capazes de inibir o desenvolvimento de subpopulações Th2 a partir da produção de IFN- $\gamma$  (PICCINI, 1998; MONDADORI, 2010).

Este controle é importante para o estabelecimento, manutenção e regulação das respostas imunes, sendo observado que um padrão efetor Th2 está associado ao sucesso gestacional. No entanto, as células Th1 participam no processo de implantação e desenvolvimento placentário, portanto é fundamental o equilíbrio entre essas subpopulações celulares. Deste modo, é comprovado que tolerância materna ao feto durante a gestação envolve outros mecanismos, além de uma simples inibição da resposta efetora Th1 e direcionamento para Th2 (WILCZYN´SKI, 2005; VIANA, 2009; RACKAITYTE, 2020).

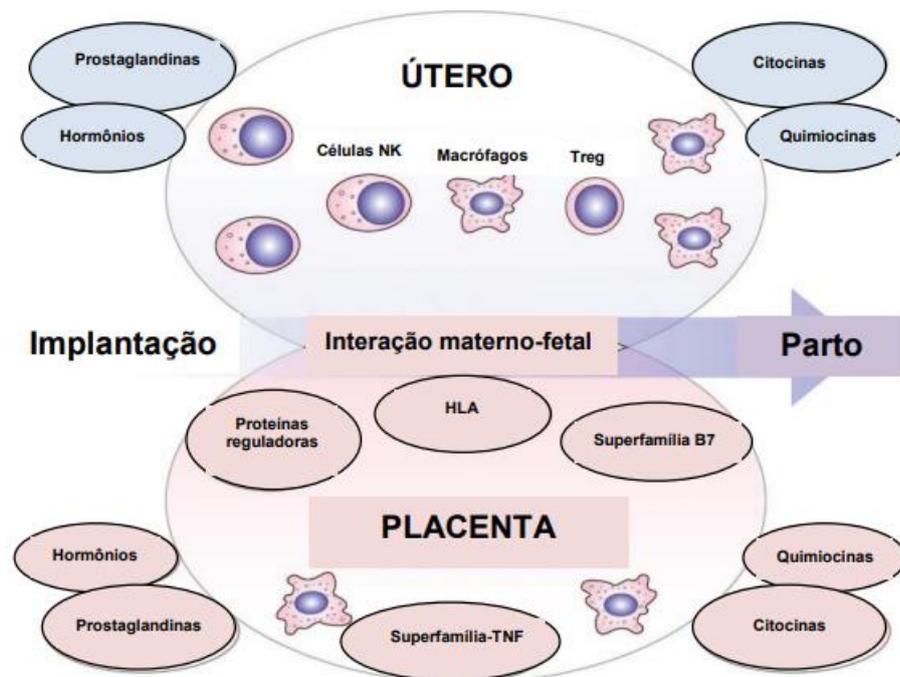
A imunomodulação na gestação inclui ainda a remodelação da decídua pelas células dendríticas, participando da angiogênese e vascularização através da modulação do Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Essa remodelação envolve a desorganização da musculatura vascular da artéria espiral. Em seguida, o endotélio vascular torna-se liquefeito e a membrana elástica se desintegra. Essas alterações são induzidas principalmente por fatores de crescimento angiogênicos, que foram produzidos por células NK decíduais e macrófagos. As células NK constituem menos de 20% dos linfócitos periféricos humanos, mas representam cerca de 70% dos linfócitos na decídua do primeiro trimestre (POLLARD, 2008; BROSENS, 2019; XU, 2020).

A presença de células T regulatórias (Treg), também participa do processo de imunomodulação regulando a resposta imunológica materna frente ao feto através de imunossupressão por células CD4 e CD25 (SAITO; SASAKI; SAKAI, 2005); Essas

células tem o papel de suprimir a ativação, proliferação e funções efetoras de uma ampla gama de células imunes e são notavelmente abundantes nos órgãos linfoides periféricos durante o segundo trimestre da gestação, quando ocorre o início da autoimunidade fetal, coincidindo com o surgimento de células T periféricas, ressaltando a importância da tolerância mediada por Treg para a sobrevivência do feto (STOJANOVSKA, 2020; RACKAITYTE, 2020).

Outros fatores que interferem na imunorregulação na gestação é a expressão do Fator Inibitório de Leucemia (LIF), citocina que se expressa ao longo da gestação modulando o comportamento do trofoblasto no início da gestação (PICCINNI et al., 1998), e a ação imunossupressora da molécula HLA-G (MANDÒ et al., 2016), que será destacado mais à frente. Desta forma o insucesso gestacional caracterizado pela rejeição do concepto pode estar relacionado a vários fatores em diferentes processos e vias imunológicas que ocasiona um desequilíbrio na homeostase imunológica (HVIID, 2016; RAJAGOPALAN, 2014) (Figura 1).

Figura 1 - Mecanismos imunológicos que atuam na interface materno fetal



Fonte: Adaptado de Hunt *et al.* (2009).

Legenda: Adaptações que ocorrem no útero, placenta e feto contribuindo para o estabelecimento de um ambiente imune privilegiado para o desenvolvimento fetal.

### 1.3 EMBRIOLOGIA E FORMAÇÃO DA PLACENTA

A placenta é um órgão exclusivo do período gestacional que proporciona a interface entre mãe e feto apresentando funções primordiais como metabolismo (p.ex. síntese de glicogênio, colesterol e ácidos graxos), transporte de substâncias como gases, nutrientes além de secreção endócrina de HCG. Sem a realização dessas funções, não seria possível a manutenção da gravidez e o desenvolvimento do feto (SANTIAGO, 2013).

Após a fecundação do ovócito secundário pelo espermatozoide é iniciado o processo contínuo de desenvolvimento embrionário humano. O zigoto sofre divisões sucessivas levando a formação dos blastômeros e blastocisto e, enfim, a nidação (implantação) na parede do útero. Nesse momento, o binômio mãe-feto vai se adaptando às transformações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas de uma gravidez (MOORE; DALLEY, 2014; MONTENEGRO, 2014).

Assim que o blastocisto se implanta no epitélio endometrial, as células do trofoblasto emitem prolongamentos, as vilosidades coriônicas, que se implantam no endométrio uterino e iniciam a digestão enzimática dos vasos sanguíneos, formando lacunas cheias de sangue materno (Figura 2). O trofoblasto viloso que fica em contato direto com o sangue materno forma a barreira placentária entre o tecido materno e o fetal, dando início à formação da placenta humana (HENTSCHKE, 2014), onde a diferenciação do trofoblasto é essencial para a implantação correta e contínua da invasão trofoblástica uterina. Durante esse período, estruturas extra embrionárias, como cavidade amniótica, saco vitelínico e coriônico, são também formadas (HALL; GUYTON, 2017).

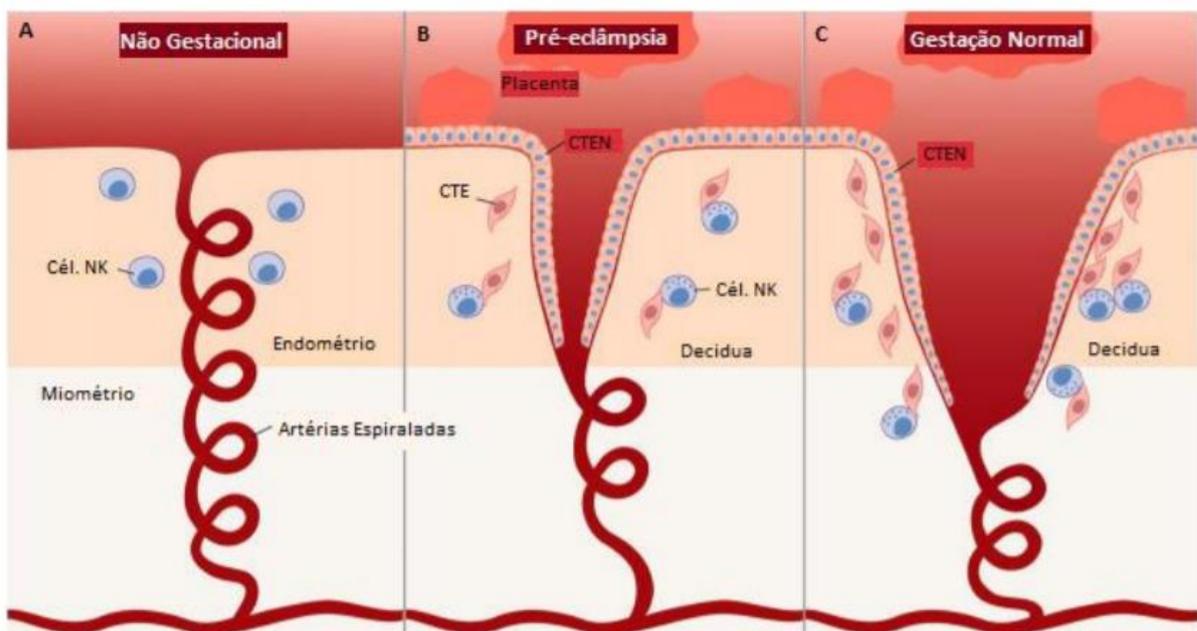
As células do trofoblasto se diferenciam e proliferam rapidamente, dividindo-se em três conjuntos principais de células, com funções distintas: 1) o sinciciotrofoblasto – o principal componente endócrino da placenta, que forma o revestimento epitelial das vilosidades placentárias, e responsável pelo transporte de gases, nutrientes, metabólitos e pela produção de hormônios (estrogênio, progesterona, glicocorticoides, Hormônio lactogênio placentário – HLP, HCG) que irão participar no controle metabólico fetal, materno e placentário ao longo da gravidez; 2) o citotrofoblasto viloso, que se prolifera ao longo da gravidez e se funde com o sinciciotrofoblasto viloso; e 3) o trofoblasto extraviloso, que são as células responsáveis pela invasão

placentária, de forma a ancorar a placenta à decídua e ao miométrio (BERRY; ATTA, 2016)

Por volta de 18 semanas, o endotélio vascular e as artérias espiraladas passam a apresentar trofoblasto endovascular incorporado na parede dos vasos. Assim, as artérias espiraladas se convertem em artérias uteroplacentárias, o que resulta no circuito hemodinâmico de baixa resistência entre as artérias radiais e o espaço interviloso ( HALL; GUYTON, 2017).

Na gestação fisiológica, os efeitos desse fenômeno são a conversão desses vasos em vasos flexíveis de parede fina que não respondem a estímulo vasoconstritor, permitindo, assim, um maior fluxo sanguíneo para a placenta. Entretanto, de forma que ainda não se sabe completamente, a remodelação pode estar comprometida tanto na Pré-eclâmpsia (PE) como no Crescimento Intrauterino Restrito (CIUR) (MISTRY et al., 2011). Na PE e no CIUR parece haver uma invasão trofoblástica deficiente que não atinge a zona de junção miometrial, deixando intocada a estrutura arterial, predispondo-a à aterosose aguda, com grande limitação do fluxo uteroplacentário. Acredita-se que apenas 10% das artérias espiraladas sofrem remodelação completa na pré-eclâmpsia, nomeando-a de “implantação anômala superficial” (MONTENEGRO, 2014).

*Figura 2: Invasão trofoblástica nas artérias espiraladas*



Fonte: Adaptado de Mondadori (2010).

Legenda: Invasão endovascular do citotrofoblasto nas artérias em espiral: a gestação complicada pela pré-eclâmpsia (B) apresenta uma vascularização superficial e incorreta, impedindo o suprimento de

nutrientes e oxigênio adequados ao feto. Já o útero gravídico normal (C), apresenta correta invasão vascular da decídua e miométrio. O útero não-gravídico (A) não apresenta a invasão do citotrofoblasto.

#### 1.4 DISTÚRBIOS HIPERTENSIVOS NA GESTAÇÃO

A hipertensão arterial crônica na gravidez é caracterizada pela ocorrência de Hipertensão arterial sistólica (HAS), caracterizada pela Pressão Arterial (PA) sistólica maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica maior ou igual a 90 mmHg antes da gestação. Como muitas vezes não há registros de medidas de PA antes da gestação, considera-se HAS crônica quando ela for constatada no primeiro trimestre da gestação ou, no máximo, até a 20ª semana (FEBRASGO, 2017).

Já, a hipertensão gestacional é caracterizada pela hipertensão arterial que surge pela primeira vez após a 20ª semana da gestação, sem estar acompanhada de nenhum sinal, sintoma ou alteração laboratorial que caracterize a PE, que ocorre quando há hipertensão arterial associada a proteinúria significativa que surge após a 20ª semana de gestação (exceto na mola hidatiforme, quando a PE pode surgir antes da 20ª semana). Se o aumento da pressão arterial e a proteinúria ocorrerem após a 20ª semana em uma primigesta com história familiar (principalmente irmã ou mãe) de PE ou eclâmpsia, a probabilidade de acerto no diagnóstico de PE será maior do que 90% (FEBRASGO, 2017; ROBERTS, 2013)

A Pré-eclâmpsia Grave (PEG) é definida como a PE associada a complicações materno-fetais que são graves o suficiente para que haja risco iminente de comprometimento de vida materno-fetal. É considerada grave quando um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas estão presentes: 1) pressão arterial igual ou acima de 160/110 mmHg, confirmada em pelo menos duas tomadas, com intervalo de seis horas; 2) proteinúria de 5 g ou mais em urina de 24 horas (3 ou 4+ em teste de tira); 3) oligúria ou diurese menor do que 400 ml por dia; 4) sintomatologia de iminência de eclâmpsia, ou seja, cefaleia, dor epigástrica e transtornos visuais; 5) cianose e edema pulmonar; além de 6) dor no hipocôndrio direito; 7) trombocitopenia ou plaquetas abaixo de 100.000/ mm<sup>3</sup>; 8) anemia hemolítica microangiopática decorrente da hemólise; 9) icterícia e/ou elevação das enzimas hepáticas e 10) restrição do crescimento fetal (FEBRASGO, 2017; KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018).

Nesse contexto, a eclâmpsia é caracterizada a partir do aparecimento de convulsões em uma paciente com PE, devendo ser excluídas epilepsia e outras doenças convulsivas (ROBERTS, 2013).

Ainda dentro das síndromes hipertensivas está a síndrome HELLP que foi descrita inicialmente por Louis Weinstein, em 1982, e é caracterizada pela presença de hemólise, elevação de enzimas hepáticas e plaquetopenia, cuja iniciais das palavras em inglês (Hemolysis, Elevated Liver functions tests e Low Platelet counts) deram o nome à síndrome (KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018).

Sua sintomatologia geralmente é inespecífica, podendo-se encontrar mal-estar, epigastralgia, náuseas e cefaleia sendo a suspeita de síndrome HELLP a presença de trombocitopenia em uma paciente com PE. A síndrome HELLP desenvolve-se em 0,1% a 0,8% de todas as gestações e 10% a 20% das gestantes com pré-eclâmpsia grave/eclâmpsia (FEBRASGO, 2017). Um resumo das principais complicações hipertensivas no período gestacional pode ser visto no quadro 1.

*Tabela 1: Resumo das complicações hipertensivas obstétricas*

	<b>SINTOMAS/DIAGNÓSTICO</b>
<b>Pré-eclâmpsia sem gravidade</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão arterial <math>\geq</math> 140/90 mmHg após 20 semanas de IG em paciente normotensa antes da gestação;</li> <li>- Sintomas cerebrais (cefaleia, tonturas, visão turva, escotomas);</li> <li>- Sintomas digestivos (dor epigástrica ou no quadrante superior D, náuseas ou vômitos).</li> </ul>
<b>Pré-eclâmpsia grave</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão arterial igual ou acima de 160/110 mmHg;</li> <li>- Proteinúria de 5 g ou mais em urina de 24 horas;</li> <li>- Oligúria ou diurese menor do que 400 ml por dia;</li> <li>- Sintomatologia de iminência de eclampsia, ou seja, cefaléia, dor epigástrica e transtornos visuais;</li> <li>- Cianose e edema pulmonar;</li> <li>- Dor no hipocôndrio direito;</li> <li>- Icterícia e/ou elevação das enzimas hepáticas</li> </ul>
<b>Síndrome Hellp</b>	PE grave associada a: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemólise Microangiopática;</li> <li>- Trombocitopenia;</li> <li>- Função hepática alterada.</li> </ul>

Fonte: A autora, 2022.

## 1.5 PRÉ-ECLÂMPسيا

A PE é uma síndrome relacionada com a gestação e é uma das principais complicações na gravidez, ocorrendo entre 5% e 10% das gestações. Caracteriza-se por hipertensão (maior ou igual a 140 mmHg/ 90 mmHg) identificada pela primeira vez após a 20ª semana de gestação em pacientes sem história prévia de hipertensão. Nos casos de gestante com HAS crônica, a presença de edema de membros inferiores e proteinúria confere o diagnóstico de PE sobreposta (MONDADORI, 2010).

Apresenta alta taxa de mortalidade materna, principalmente em países em desenvolvimento, alcançando índices de até 14%, uma vez que a assistência pré-natal e os cuidados terciários nessas regiões são limitados. O diagnóstico é geralmente realizado pela presença de hipertensão associada a proteinúria na mãe, contudo, em cerca de 10% a 15% dos casos não há ou não são detectadas essas características (MARTINS; SILVA, 2018).

É uma disfunção que pode se manifestar tanto na mãe, quanto no feto ou até mesmo em ambos. Na síndrome materna, as principais complicações são elevação da pressão arterial, proteinúria e edema, podendo evoluir para eclâmpsia, com o aparecimento de convulsões (BERRY; ATTA, 2016).

O quadro descrito acima leva a diminuição do aporte de sangue para o feto causando restrição do crescimento fetal, redução do líquido amniótico e oxigenação anormal (síndrome fetal), sendo o modo de apresentação e a taxa de progressão da doença variáveis (HENTSCHKE, 2014).

A etiologia e patogênese da doença envolvem uma combinação de diversos fatores, entre eles, materno-fetal e ambientais, porém esses fatores ainda não foram totalmente elucidados (ALVES et al., 2008). Uma das hipóteses da patogênese da PE é a teoria imunológica, que propõe a resposta imune materna inadequada à presença do feto semi-alogênico que leva a alterações patológicas precocemente na placenta, embora os sinais de PE só se tornem visíveis no terceiro trimestre de gestação (ROKHAFROOZ et al., 2018).

Neste contexto, o reduzido fornecimento de sangue para a placenta explica o retardo do crescimento fetal associado à doença, mas não explica os diversos sintomas da síndrome materna. Uma hipótese amplamente aceita é que a doença

ocorra em duas fases, sendo a primeira a invasão do trofoblasto raso que leva à perfusão inadequada do leito placentário, levando a segunda fase, onde a isquemia placentária leva a síndrome materna sistêmica através da liberação de fatores que são tóxicos para as células endoteliais circulantes na gestante. Desta forma, sendo a placenta o órgão central na patogênese da PE, a sua retirada suprime a manifestação da doença (O'BRIEN; DAUSSET; CAROSELLA, 2000).

Diante do exposto, existem vários estudos que abordam os aspectos imunológicos envolvidos na gestação, a fim de se buscar uma melhor compreensão dos processos que levam a uma gestação bem-sucedida ou ao aparecimento de disfunções – como a pré-eclâmpsia – relacionadas ao sistema imune. Nesses processos imunológicos que ocorrem durante o período gestacional, muitas são as células, moléculas e mecanismos moduladores da resposta imune envolvidos na formação de uma extensa e complexa rede de interações imunológicas, das quais a molécula do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) G tem uma comprovada relevância (WERTASCHNIGG et al., 2019).

Ao longo dos anos, muitos estudos têm tentado identificar um marcador de risco para PE. No entanto, mesmo na falta de consenso, é possível aconselhar as pacientes em relação ao seu potencial risco de desenvolver a doença através de sua história clínica (REDMAN, 2011; MISTRY, 2011). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da PE podem ser vistos na figura 3.

Figura 3 — Quadro esquemático dos fatores de risco para pré-eclâmpsia

Fatores de Risco	Comentários
<b>Evidência Forte</b>	
Primigestação	RR: 2,4 (2,1 – 2,7)
Diabete mellitus	RR: 2 – 3 e maior se DM descompensado
Gestação gemelar	RR: 3 (2 – 4,2)
Irmã com PE	RR: 3,3 (1,5 – 7,5)
Irmã, mãe ou avó com eclampsia	RR: Respectivamente 37, 26 e 16% de PE
HAS crônica	25% de desenvolver PE sobreposta
PE sobreposta em gestação prévia	70% de recorrência
Hidropisia fetal (não imune)	RR: 10
Gestação molar	RR: 10
Nova paternidade	Risco semelhante ao da primeira gestação
<b>Evidência média ou fraca</b>	
IMC $\geq$ 25,8	RR: 2,3 – 2,7
Idade materna > 40 anos	RR: 3-4
Uso de método anticoncepcional de barreira	Aumento do risco
Maior duração da atividade sexual	Diminuição do risco
Aborto prévio	Diminuição do risco
Ganho excessivo de peso	Aumento de risco
Inseminação artificial	Aumento de risco
“Homem de risco” (parceira anterior teve PE)	RR: 1,8 (1,2 – 2,6)

Fonte: Hentschke (2014)

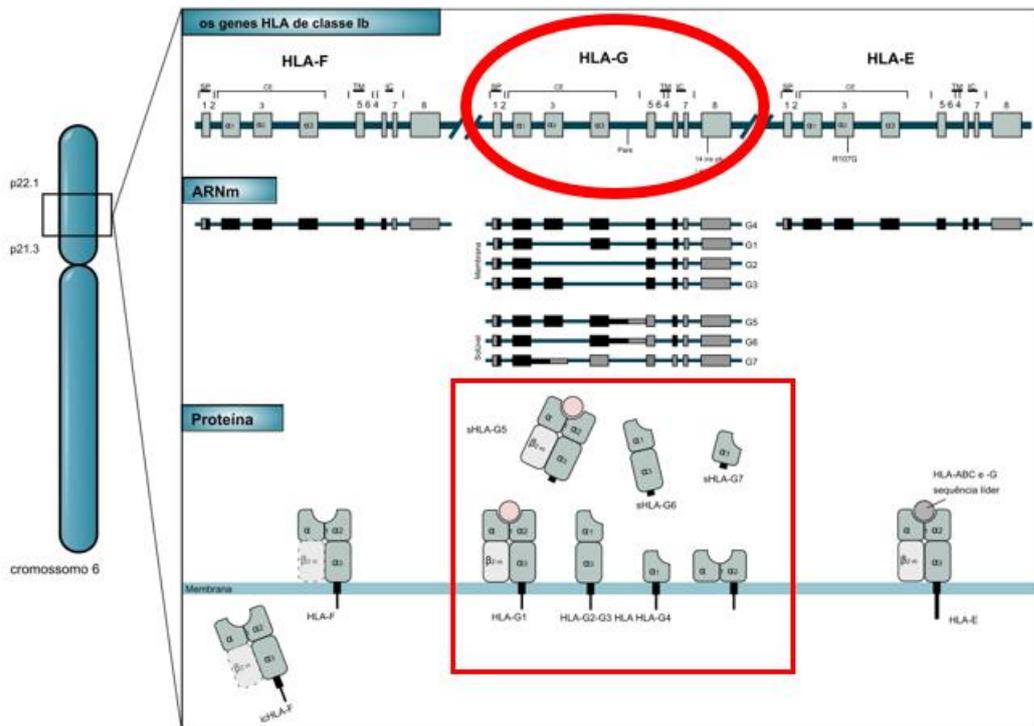
## 1.6 A MOLÉCULA HLA-G

O HLA-G é uma das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe I não clássica, codificada pelo gene *HLA-G*, localizado no braço curto do cromossomo humano 6 (região 6p21.3) e é caracterizado por apresentar baixo polimorfismo na região codificante, diversidade genética nas regiões não codificantes, função distinta em relação as demais moléculas HLA clássicas de classe I, e várias isoformas devido a ocorrência de processamento alternativo do RNA (ALMEIDA, 2017; CAROSELLA et al., 2008).

A HLA-G é a molécula HLA não-clássica mais estudada, descrita pela primeira vez em 1990, tendo sua distribuição tecidual restrita as células trofoblásticas na placenta, timo, córnea, ilhotas pancreáticas, precursores eritróides e endoteliais, e células-tronco mesenquimais. (CAROSELLA et al., 2008; ALVES et al., 2008). O transcrito primário sofre processamento diferencial gerando diferentes sequencias de mRNA, sendo responsáveis pela produção de pelo menos 7 isoformas proteicas,

sendo 4 proteínas ligadas à membrana celular (HLA-G1, G2, G3, G4) e 3 proteínas solúveis (HLA-G5, G6, G7) (Figura 4) (CASTELLI et al., 2017; PORTO, 2018).

Figura 4 — O locus gênico do HLA-G e a expressão das suas isoformas



Fonte: Adaptado de Person *et al.* (2017, tradução nossa).

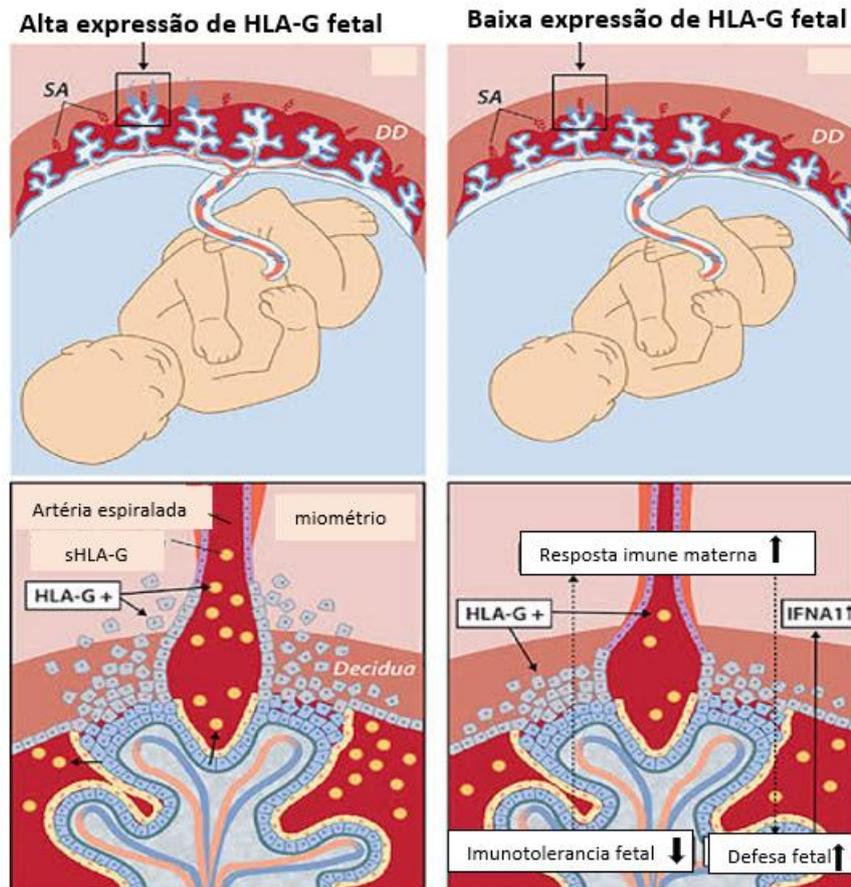
Legenda: Localização e organização do gene HLA-G e a expressão das 7 isoformas proteicas formadas.

Os polimorfismos encontrados na região codificante do gene *HLA-G* estão distribuídos ao longo da sequência que codificam para os três domínios alfa, enquanto que nas moléculas clássicas de HLA os polimorfismos estão concentrados nas fendas peptídicas, sugerindo que o HLA-G não desenvolva a função de apresentação de antígenos, mas que o HLA-G pode desempenhar um papel na indução de tolerância imunológica na interface materno-fetal (VIANNA; 2009; FERREIRA et al., 2017a).

A molécula do HLA-G está expressa em altos níveis na região materno-fetal, atuando como inibidor para as células do sistema imunológico, principalmente as células Natural Killer (NK) (Figura 5). Essa particularidade confere à molécula HLA-G um efeito modulador da resposta imune não apenas na gestação, mas também nas doenças autoimunes e inflamatórias, no câncer e infecções virais (HUNT, 2009). Altos níveis de sHLA-G já foram descritos em mulheres que apresentaram gestações de

sucesso, sendo estes níveis superiores aos encontrados em mulheres que apresentaram aborto ou outras complicações como pré-eclâmpsia (ALEGRE et al., 2007; LUO et al., 2018).

Figura 5 – Interface materno fetal e expressão de HLA-G.



Fonte: Adaptado de Wertaschnigg, 2019 (tradução pela autora) Legenda: Interface materno fetal e efeitos da alta expressão de HLA-G versus baixa expressão de HLA-G.

A expressão de HLA-G é regulada principalmente pela região promotora e pela região 3' não traduzida do gene (3'UTR), onde dois mecanismos distintos têm sido associados à regulação de HLA-G: o primeiro refere-se a presença de uma inserção de 14 pares de base (pb) e o outro de guanina na posição +3142. A presença dos 14 pb leva a um evento adicional de processamento de mRNA, que culmina com a deleção de 92 bases da 3'UTR do RNA mensageiro, e influencia o processamento diferencial e a estabilidade da molécula (FERREIRA et al., 2017b).

A ação inibitória do HLA-G é exercida sobre diferentes tipos celulares. Nas células NK, o HLA-G tem a função de inibição da proliferação e função citotóxica,

regulação positiva da expressão de receptores de inibição, aumento da proliferação celular e produção de IFN $\gamma$ , além da secreção de fatores pró-angiogênicos e inibição da migração transendotelial (MONDADORI, 2010).

Nos linfócitos T CD8+, o HLA-G inibe sua função citotóxica e proliferação além de atuar na formação de células T regulatórias CD8+. Nos linfócitos T CD4+, o HLA-G inibe a alorreatividade, proliferação e formação de células T regulatórias CD4+ (ALVES et al., 2008). Ainda, as Células Apresentadoras de Antígeno (APCs) e Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) são influenciadas pelo HLA-G através da inibição da maturação das células dendríticas, da apresentação de antígeno e de sua “mobilidade”, indução das células T regulatórias, regulação positiva da expressão de receptores de inibição, além da secreção de citocinas Th2 (CAROSELLA et al., 2008; MONDADORI, 2010).

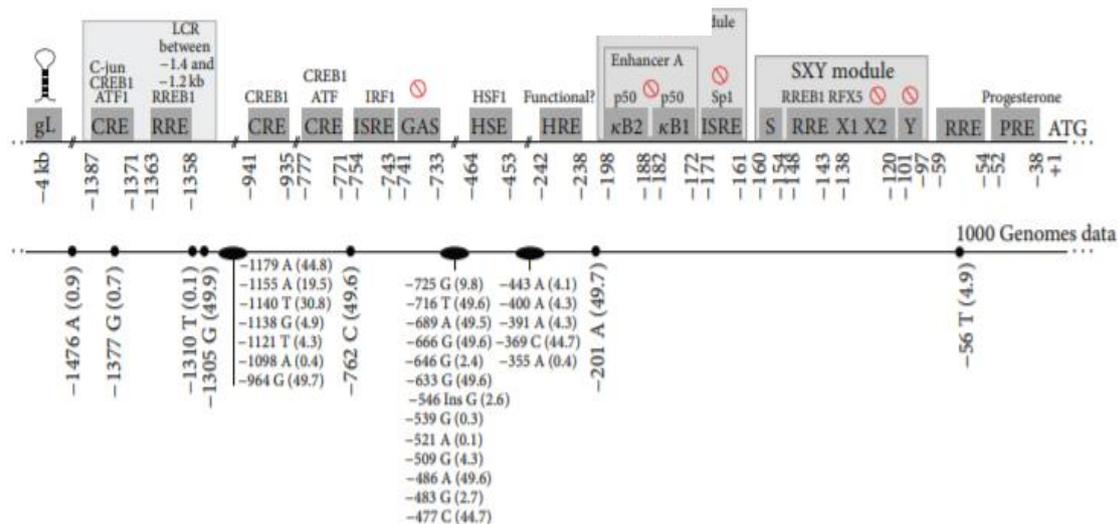
O promotor *HLA-G* exibe vários sítios polimórficos, regulando a expressão de *HLA-G* atuando de diferentes maneiras. Alguns elementos reguladores alternativos dentro do promotor do gene *HLA-G* foram descritos, como o Fator Induzível por Hipóxia (HIF), que está envolvido no controle das respostas celulares à depleção de oxigênio. A expressão de HLA-G (membrana e solúvel) é 2 vezes aumentada quando os citotrofoblastos extravilosos são cultivados sob apenas 2% de oxigênio. O Elemento de Resposta à Hipóxia (HRE) está localizado entre as posições -242 e -238 (Figura 6), no entanto, a funcionalidade deste elemento não foi explorada (CASTELLI et al., 2014).

A expressão de *HLA-G* pode ser induzida também pela progesterona que é um hormônio esteroide imunomodulador secretado tanto pelo corpo lúteo como pela placenta, permitindo a manutenção do endométrio e a implantação do embrião. O mecanismo subjacente a esta indução é mediada principalmente pela ativação do Receptor de Progesterona (PR) e sua subsequente ligação a um Elemento de Resposta à Progesterona (PRE) encontrado na região promotora *HLA-G* (Figura 6) (CASTELLI et al., 2014).

Dessa forma, tais sítios polimórficos poderiam contribuir para a resposta inadequada ao corticoide secretado pela placenta, e desta forma está associado a susceptibilidade ou proteção ao desenvolvimento da pré-eclâmpsia (ALVES, 2016). Além disso, é possível que a resposta clínica aos glicocorticoides sintéticos utilizados na condução da gestante com pré-eclâmpsia seja relacionada a presença de

polimorfismo no sítio de ligação de corticoides, visto que várias funções inibitórias do sistema imune materno são dependentes dos níveis de HLA-G placentário (AKHTER et al., 2012).

Figura 6 - Representação da região promotora do gene *HLA-G*



Fonte: Adaptado de Castelli (2014). Legenda: Região promotora do gene *HLA-G* mostrando vários elementos que regulam a expressão do gene, entre eles o Elemento de Resposta à Progesterona (PRE) e o Elemento de Resposta à Hipóxia (HRE).

## 1.7 CORTICOIDE PERINATAL

Os corticosteroides começaram a ser utilizados em obstetrícia com o objetivo de auxiliar o amadurecimento pulmonar fetal em gestações prematuras. A partir de estudos em animais, comprovou-se atuação da droga em pneumócitos tipo II, que são responsáveis pela produção de surfactante com possível utilização em humanos. O desenvolvimento incompleto da árvore brônquica, associado à imaturidade de outros órgãos, além da deficiência de surfactante, responde pelos quadros de insuficiência respiratória recorrente em recém-nascidos prematuros (NETO; SOUZA; AMORIM, 2010)

A corticoterapia para maturação pulmonar fetal está recomendada entre as 24 e as 33 semanas e 6 dias, independentemente da integridade das membranas amnióticas ou do número de fetos, em todas as situações em que existe risco de trabalho de parto prematuro nos 7 dias seguintes (AREIA et al., 2018).

Sua utilização no período antenatal está associada à redução não apenas na incidência da síndrome de angústia respiratória no recém-nascido, como também de outras complicações, como hemorragia intraventricular, leucomalácia periventricular, retinopatia da prematuridade, enterocolite necrotizante, persistência do canal arterial e, principalmente, da mortalidade neonatal (NETO; SOUZA; AMORIM, 2010; PINTO, 2015)

A utilização de corticoide mostrou que recém-nascidos de mães com pré-eclâmpsia grave têm os mesmos benefícios com o uso de corticoide entre a 24<sup>a</sup> e a 34<sup>a</sup> semana que outros recém-nascidos prematuros, e não há aumento da morbidade materna nem risco elevado de morte fetal, como se acreditava anteriormente (THOM et al., 2016)

Admite-se, portanto, que a utilização de corticoterapia representa importante terapêutica, não só pela ausência de riscos maternos adicionais para morte, corioamnionite ou sepse puerperal, como também pela diminuição de riscos provenientes da prematuridade, devendo ser administrada também em gestantes com pré-eclâmpsia pelo risco de parto prematuro (PINTO, 2015)

A diminuição do número de células NK uterinas pela administração de prednisona, um glicocorticoide sintético, e ativação in vitro da secreção de HCG (auxilia, por ação local, na implantação do embrião e na diferenciação trofoblástica) pelo trofoblasto promovida por estes glicocorticoides são algumas ações benéficas que podem ser mediadas por essas drogas para uma gestação inicial bem-sucedida (MONDADORI, 2010).

Os corticosteroides têm sido utilizados para o tratamento de mulheres com síndrome HELLP, especialmente naquelas com plaquetas abaixo de 50.000/mm<sup>3</sup>. O mecanismo de ação sugerido inclui redução da adesão de plaquetas, redução na remoção pelo baço de plaquetas e aumento na ativação de plaquetária. Não há evidência suficiente do impacto da administração rotineira de esteroides na síndrome HELLP, porém o seu uso pode ser justificado em situações especiais em que o aumento das plaquetas seja importante (FEBRASGO, 2017).

## 1.8 EPIDEMIOLOGIA DA ECLÂMPSIA

A razão de mortalidade materna é calculada pelo número de óbitos maternos por 100.000 nascidos vivos. No Brasil, o número encontrado em 2011 foi de 64,8/100.000. Um estudo de 2016 mostra que as principais causas de mortes maternas registradas no Brasil foram as desordens hipertensivas (23%), sepse (10%), hemorragia (8%), complicações relacionadas ao aborto (8%) e desordens placentárias (5%) (MARTINS,2018; MARTINS, 2016)

A PE e eclâmpsia estão entre as três maiores causas de morbidade e mortalidade materna no mundo, afetando de 2% a 8 % de todas as gestações. Ainda que nos últimos 50 anos tenha havido uma diminuição nas taxas de eclâmpsia, morbidade e mortalidade materna nos países desenvolvidos, as estatísticas mostram que 98% das mortes ocorrem em países em desenvolvimento e permanecem ainda muito altas (HENTSCHKE, 2014).

Sabe-se ainda que mais de 10% das mulheres irão desenvolver PE na sua primeira gestação. Embora a grande maioria dessas pacientes tenha desfechos favoráveis, essa condição pode levar ao aumento de complicações sistêmicas graves, como hemorragia cerebral, disfunção hepática e renal aguda, e ainda edema agudo de pulmão, assim como descolamento prematuro de placenta, Coagulação Intravascular Disseminada (CIVD), hemólise, hemorragia cerebral, CIUR e morte fetal (EILAND; NZERUE; FAULKNER, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

Uma vez que a pré-eclâmpsia é a doença mais comum dentre as síndromes hipertensivas gestacionais com repercussões nas mulheres e nos recém-nascidos em todo o mundo, e por possuir um componente imunológico, a identificação de fatores genéticos relacionados a modulação da resposta imune podem contribuir para a avaliação da susceptibilidade e gravidade da doença e o desenvolvimento de estratégias de prevenção, detecção precoce e terapêuticas.

Apesar do conhecimento (1) do efeito terapêutico do uso de glicocorticoides no período gestacional trazendo benefícios tanto para a mãe quanto para o feto, (2) da presença de elemento genético de resposta ao corticoide no promotor do gene *HLA-G*, e (3) o fato do sítio de ligação do corticoide ao promotor ser polimórfico, ainda não existe relatos sobre a associação de polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G* com os níveis de HLA-G em resposta ao uso de corticoide no tratamento da pré-eclâmpsia.

Este estudo irá esclarecer se o polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G* e os níveis sorológicos de HLA-G está associado ao aumento da gravidade da doença, contribuindo para elucidar questionamentos relacionados aos fatores que podem interferir na expressão deste gene, gerando, além de conhecimento científico, a possibilidade de utilização dos achados como marcadores de gravidade da pré-eclâmpsia relevantes, diminuindo morbidade e mortalidade tanto das gestantes quanto de seus recém-nascidos.

### 3 PERGUNTAS CONDUTORAS

Os níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G) estão associados à presença de polimorfismos no promotor do gene *HLA-G* e à gravidade da pré-eclâmpsia?

O corticoide utilizado em baixas doses para maturação pulmonar do Recém-nascido altera os níveis de sHLA-G materno?

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a associação dos níveis sorológicos de sHLA-G com polimorfismos da região promotora do gene *HLA-G* nas gestantes com pré-eclâmpsia e relacioná-los à gravidade da pré-eclâmpsia.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Avaliar as variáveis clínico-epidemiológica e laboratoriais associadas a gravidade e desfecho da PE;

4.2.2 Identificar sítios polimórficos na regiões reguladoras do gene *HLA-G* associadas a gravidade da doença;

4.2.3 Avaliar a diferença nos níveis de sHLA-G em sangue periférico associada a gravidade da doença;

4.2.4 Associar a resposta do uso de corticoide na PE com níveis sanguíneos de sHLA-G.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado em 30/10/2019 pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) do Aggeu Magalhães com o CAAE 17910719.1.0000.5190 (Anexo 1), e em 07/11/2019 pelo CEP do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CAAE 17910719.1.3001.8807 (Anexo 2) conforme recomendado pela legislação brasileira de pesquisa com seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. As pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

### 5.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

A população de estudo foi formada por 151 gestantes maiores de 18 anos, atendidas no período de 01 de abril a 30 de setembro de 2020 no Centro Obstétrico do HC da UFPE, que é um hospital terciário atuando como hospital-escola e prestador de serviços médico-hospitalares. O HC conta com um total de 411 leitos, sendo referência em gestação de alto risco, com 10 leitos no Centro Obstétrico, realizando uma média de 200 partos mensais.

### 5.3 DEFINIÇÃO OPERACIONAL DA PRÉ-ECLÂMPSIA

A definição operacional da PE foi baseada nos critérios sugeridos pela Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (2017) e Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2020), sendo brevemente descrita abaixo:

- PE sem gravidade: PA  $\geq$  140/90 mmHg após 20 semanas de Idade Gestacional (IG) em paciente normotensa antes da gestação; Sintomas cerebrais (cefaleia, tonturas, visão turva, escotomas), ou digestivos (dor epigástrica ou no quadrante superior D, náuseas ou vômitos),

- PE grave: PA  $\geq$  160/110 mmHg, em duas aferições com 6 horas de intervalo e com a paciente em repouso; Distúrbios visuais ou cerebrais (cefaleia, visão borrada, cegueira, alteração do estado mental) persistentes; Dor epigástrica ou no quadrante superior direito persistente; Proteinúria de 24h  $\geq$  5 g ou  $\geq$  3+ em fita, em duas amostras

coletadas com intervalo de 4 horas; Oligúria, com volume urinário < 500 ml/24h; Insuficiência renal (creatinina sérica  $\geq 1,2$  mg/dl em paciente com função renal normal prévia); Insuficiência hepática (TGO ou TGP > 70 UI//L);

- Síndrome Hellp: PE grave que evolui com exames laboratoriais alterados como Trombocitopenia (plaquetas < 100.000/ $\mu$ L), elevação de enzimas hepáticas (o dobro do basal), comprometimento renal (acima de 1,1 mg/dl ou o dobro do basal) ou Bilirrubina > 1,2 mg/dl.

#### 5.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E AMOSTRAS

A coleta dos dados clínicos foi realizada a partir de questionário (Apêndice B) semiestruturado aplicado diretamente à paciente pela pesquisadora. Dados referentes a internação assim como resultados de exames foram obtidos através de consulta ao prontuário médico.

Foram coletados em média 8 mL de sangue materno em tubo contendo EDTA de cada paciente, na admissão hospitalar e 24h pós-parto. As amostras foram processadas no Laboratório de Imunogenética/IAM/ FIOCRUZ.

Para a análise de variantes genéticas, a distribuição de alelos do gene *HLA-G* foi comparada com a frequência dos alelos do banco de dados de sequenciamento de mulheres de Pernambuco, sem histórico de doença autoimune e câncer na família doadoras de sangue ou não, que voluntariamente participaram como grupo controle de outras pesquisas desenvolvidas pelo Laboratório de Imunogenética da Fiocruz-PE.

#### 5.5 FRACIONAMENTO DE CÉLULAS PERIFÉRICAS MONONUCLEADAS

A partir da amostra de sangue das pacientes, as células sanguíneas foram fracionadas através do gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (Cytiva, Washington, D.C., EUA), como indica o fabricante. Após serem lavadas com Tampão de Fosfato Salino (PBS) pH 7.2 e centrifugadas a 12.000 x g, elas foram armazenadas em precipitado a uma temperatura de -80°C até a realização dos ensaios. O plasma obtido também foi estocado para avaliação imunológica na mesma temperatura.

#### 5.6 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO HUMANO

O DNA genômico foi isolado das células mononucleares com o reagente DNAzol (Invitrogen, California - USA), utilizando o protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em DNAzol e o DNA precipitado com etanol 100%.

Após a centrifugação a 12.000 x g, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 75% por duas vezes e diluído em 8 mM NaOH. O DNA isolado foi utilizado nos estudos de variabilidade genética.

### 5.7 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO

Foi amplificada a região 5'UTR do gene *HLA-G* a partir do DNA genômico das pacientes utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores HLAGF 5'-ACACTCATAATTCATTCATTCAGC-3'; HLAGR 5'-TCTTCTGATAACACAGGAACTTC -3' e a enzima DNA-polimerase Primestar® GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc, Kusatsu, Shiga, Japão), nas condições abaixo.

98°C	10 segundos	35 vezes
60°C	15 segundos	
68°C	6 minutos	
4°C	∞	1 vez

O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da reação antes de serem encaminhados para sequenciamento, que foi realizado de acordo com o protocolo do Big Dye Terminator v3.1, e no equipamento ABI GeneticAnalyser 3100 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) localizado na plataforma tecnológica na Fiocruz-PE.

Os cromatogramas obtidos com o sequenciamento das regiões de interesse foram analisados com o programa Lasergene SeqMan 7.0 (DNASTAR Inc., Madison, EUA) para contagem dos SNP (*Single nucleotide polymorphism*).

As frequências genéticas observadas nas gestantes portadoras de doença grave, incluindo aquelas com síndrome HELLP, foram comparadas com as frequências observadas nas gestantes apresentando doença sem gravidade. Ainda foram comparadas as frequências determinadas considerando todas as mulheres com pré-eclâmpsia, independente da gravidade da doença, com as frequências em mulheres saudáveis sem histórico de câncer, doença autoimune, aborto ou pré-eclâmpsia na família determinadas em estudos anteriores do Laboratório de Imunogenética da Fiocruz-PE.

## 5.8 DETECÇÃO DE HLA-G SOLÚVEL POR ELISA

A detecção de HLA-G solúvel (sHLA-G) (isoformas G5 e G6) no plasma foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal anti-HLA-G MEM-G/9 (Exbio, Praga, República Checa) de captura, pelo método de ELISA sanduíche. Uma curva padrão de cinco pontos (12,5-200 ng/mL) construída com o antígeno expresso em linhagem celular M8 foi utilizada para determinar os níveis circulantes de sHLA-G e os resultados foram expressos em ng/mL.

## 6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E PROCESSAMENTO DE DADOS

As variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais foram descritas com medidas de dispersão central para as variáveis contínuas e por valores absolutos e percentuais de contagem para as variáveis categóricas, estimadas com o programa GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, EUA), e o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). As frequências alélicas e genótípicas também foram analisadas com o programa R. Para todos os resultados, os valores de  $P < 0,05$  são considerados significativos.

As normalidades dos dados numéricos foram determinadas com teste de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. A análise das diferenças de médias ou medianas utilizou testes para amostras pareadas e não pareadas considerando o número de grupos de comparação de dois ou superior a dois.

As variáveis não normais e não pareadas foram analisadas pelo teste de mann whitney ou kruskall wallis de acordo com o número de grupos analisados, enquanto as amostras pareadas foram analisadas com o teste de wilcoxon ou ANOVA.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO:

Dentre as 151 pacientes do estudo, 93 gestantes tinham o diagnóstico de PE grave (61,5%), 46 PE sem gravidade (30,4%) e 12 pacientes foram diagnosticadas com síndrome hellp (7,6%). A maioria das pacientes se identificaram como sendo de cor parda (84,2%), são casadas/união estável (68,67%), têm ensino médio completo (56,6%) e a maioria delas refere não ter nenhuma fonte de renda (4,8%), referindo como ocupação principal ser dona de casa (Tabela 2).

*Tabela 2: Perfil sociodemográfico da população de estudo*

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Diagnostico Final</b>		
Síndrome Hellp	12	7,64
Pré eclâmpsia grave	93	61,59
Pré eclâmpsia sem gravidade	46	30,46
<b>Cor</b>		
1. Branca	10	7,14
2. Preta	12	8,57
3. Parda	118	84,29
<b>Estado Civil</b>		
1. Solteira	46	30,67
2. Casada/União estável	103	68,67
3. Separada	1	0,67
<b>Escolaridade</b>		
2. 1ª a 4ª série	17	11,33
3. 5ª a 8ª série	38	25,33
4. Médio	85	56,67
5. Superior incompleto	6	4,00
6. Superior completo	4	2,67
<b>Renda Mensal</b>		
1. Nenhuma renda	65	44,83
2. Até 2 salários mínimos	51	35,17
3. De 2 a 4 salários mínimos	29	20,00

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo.

A maioria das pacientes referiram não ser portadora de diabetes (95,3%), não ser hipertensa antes da gestação (86%), não apresentar histórico de PE (83,3%), eclâmpsia (97%) e asma (98%) (Tabela 3).

*Tabela 3: Comorbidades da população de estudo*

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Diabetes</b>		
1. Sim	7	4,67
2. Não	143	95,33
<b>HAS Antes Gestação</b>		
1. Sim	21	14,00
2. Não	129	86,00
<b>Pré Eclâmpsia</b>		
1. Sim	25	16,67
2. Não	125	83,33
<b>Eclâmpsia</b>		
1. Sim	3	2,03
2. Não	145	97,97
<b>Asma</b>		
1. Sim	3	2,00
2. Não	147	98,00

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo.

Em relação ao histórico familiar, 82,6% das pacientes referiram ter pai ou mãe diabéticos (82,6%), hipertensos (91,3%) e mãe/irmã com PE (44,2%) e eclâmpsia (2%) (Tabela 4).

*Tabela 4: Comorbidades familiares da população de estudo*

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Diabetes</b>		
1. Sim	123	82,69
2. Não	27	18,00
<b>Hipertensão</b>		
1. Sim	137	91,33
2. Não	13	8,67
<b>Pré Eclâmpsia</b>		
1. Sim	62	44,22
2. Não	82	55,78
<b>Eclâmpsia</b>		
1. Sim	3	2,10
2. Não	140	97,90

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo.

As principais queixas descritas pelas pacientes no momento da admissão foram: cefaleia, relatada por 88,8% das pacientes, seguido de enjoo e vômito com 40,4% e epigastralgia que foi declarada por 24,8%. Após exame físico realizado na admissão, foi registrado em prontuário que 92,7% das pacientes apresentavam edema em membros inferiores (MMII) (Tabela 5).

*Tabela 5: Sinais e sintomas identificados na admissão*

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Edema MMII</b>		
1. Sim	140	92,72
2. Não	11	7,28
<b>Escotomas</b>		
1. Sim	33	22,45
2. Não	114	77,55
<b>Hemorragia</b>		
1. Sim	2	1,36
2. Não	145	98,64
<b>Epigastralgia</b>		
1. Sim	37	24,83
2. Não	112	75,17
<b>Convulsão</b>		
1. Sim	1	0,69
2. Não	144	99,31
<b>Cefaleia</b>		
1. Sim	133	88,08
2. Não	18	11,92
<b>Dispneia</b>		
1. Sim	9	6,21
2. Não	136	93,79
<b>Turvação Visual</b>		
1. Sim	17	11,72
2. Não	128	88,28
<b>Enjoo / Vômito</b>		
1. Sim	59	40,41
2. Não	87	59,59

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo.

No que diz respeito ao parto atual e condições de nascimento do recém-nascido (RN), observamos que 70,4% dos partos aconteceram por via cirúrgica e que a grande maioria dos RN's não apresentaram intercorrências como necessidade de reanimação, uso de ventilação por pressão, aspiração de vias aéreas nem intubação orotraqueal (Tabela 6).

*Tabela 6: História do parto atual e condições de nascimento do RN*

<b>Variáveis</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Tipo de Parto</b>		
1. Vaginal	44	29,53
2. Cesárea	105	70,47
<b>Sexo do RN</b>		
1. Masculino	74	50,00
2. Feminino	74	50,00
<b>Baixo Peso</b>		
1. < 2500	24	16,11
2. ≥ 2500	125	83,89
<b>Reanimação Neonatal</b>		
1. Sim	4	2,72
2. Não	143	97,28
<b>Ventilação Pressão</b>		
1. Sim	20	13,61
2. Não	127	86,39
<b>Intubação Orotraqueal</b>		
1. Sim	2	1,36
2. Não	145	98,64
<b>Aspiração Vias Aéreas</b>		
1. Sim	25	17,61
2. Não	117	82,39

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo.

## 7.2 VARIÁVEIS CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS À GRAVIDADE DA PRÉ-ECLÂMPسيا

De acordo com a análise das pacientes que participaram do estudo, a idade das gestantes (média de 27,5 anos) não esteve associada a gravidade da doença ( $p=0,4820$ ). As gestantes com formas graves da pré-eclâmpسيا na admissão hospitalar apresentaram menores idades gestacionais, sendo para a síndrome hellp, PE grave e PE sem gravidade, respectivamente 34, 37 e 38 semanas ( $p=0,0018$ ).

Constatou-se que a pressão sistólica na admissão foi significativamente maior na gestante com síndrome hellp e PE grave em relação a PE sem gravidade (167 x 160 x 148,  $p<00001$ ), e que o histórico de hipertensão arterial ( $p=0,0002$ ) e de diabetes ( $p=0,0492$ ) aumenta o risco para desenvolvimento de síndrome hellp (Tabela 7).

Apesar da proporção de gestantes com histórico de pré-eclâmpسيا ter aumentado nas gestantes com formas grave da doença atual, não há uma relação significativa entre a ocorrência de pré-eclâmpسيا em gestações pregressa e futura.

*Tabela 7: Associação de comorbidades a gravidade da pré-eclâmpسيا*

Variáveis	Diagnóstico Final						p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpسيا grave		Pré eclâmpسيا sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>HAS anterior</b>							
1. Sim	5	41,67	5	5,43	11	23,91	0,0002
2. Não	7	58,33	90	94,57	35	76,09	
<b>PE anterior</b>							
1. Sim	4	33,33	16	17,39	5	10,87	0,1633
2. Não	8	66,67	76	82,61	41	89,13	
<b>Diabetes anterior</b>							
1. Sim	2	16,67	2	2,17	3	6,52	0,0492
2. Não	10	83,33	90	97,83	43	93,48	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo. P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

Analisando os sintomas apresentados pelas pacientes, a presença de escotomas ( $p=0,0011$ ), epigastralgia ( $p< 0,0001$ ) e turvação visual ( $p=0,0022$ ) foi associada a manifestação da síndrome hellp e PE grave comparada a PE sem gravidade. Adicionalmente, a hemorragia ( $p=0,0062$ ) e a cefaleia ( $p=0,0003$ ) foram sintomas associados à manifestação de síndrome hellp (Tabela 8).

*Tabela 8: Características clínicas associadas a gravidade da pré-eclâmpsia*

Variáveis	Diagnóstico Final						p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>Escotomas</b>							
1. Sim	6	50	24	26,67	3	6,67	0,0011
2. Não	6	50	66	73,33	42	93,33	
<b>Hemorragia</b>							
1. Sim	2	16,67	0	0	0	0	0,0062
2. Não	10	83,33	90	100	45	100	
<b>Epigastralgia</b>							
1. Sim	9	75	24	26,37	4	8,7	< 0,0001
2. Não	3	25	67	73,63	42	91,3	
<b>Cefaleia</b>							
1. Sim	12	100	88	94,62	33	71,74	0,0003
2. Não	0	0	5	5,38	13	28,26	
<b>Turvação Visual</b>							
1. Sim	5	41,67	11	12,36	1	2,27	0,0022
2. Não	7	58,33	78	87,64	43	97,73	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo. P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

Os níveis de hemoglobina, hematócrito, plaquetas, ureia, creatinina, ácido úrico e bilirrubina das gestantes estavam dentro da normalidade. O valor médio de plaquetas e ureia, e a mediana do ácido úrico apresentou diferenças estatísticas entre as diferentes formas clínicas, com a síndrome hellp apresentando menor valor de plaquetas e maior valor de ureia e ácido úrico. Na admissão as gestantes com síndrome hellp apresentou alteração nas taxas de TGO, TGP e DHL, com valores superiores aos da PE grave e da PE sem gravidade (Tabela 9). Avaliando o pós-parto, as plaquetas ainda estavam alteradas em pacientes com PE grave. TGO e DHL mantiveram alteração pós-parto na PE grave e Síndrome hellp, apresentando diferença estatística significativa nas plaquetas e TGO (Tabela 10).

Tabela 9: Associação de variáveis laboratoriais da gestante na admissão com a gravidade da pré-eclâmpsia.

Variável Laboratorial	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	Valor de p1	Valor de p2	Significância**
<b>Plaquetas</b>	148	49.000	427.000	230.331,1	229.000	61.247,1	5.034,5			
Síndrome Hellp	12	96.000	322.000	186.916,7	173.000	68.235,5	19.697,9			1 vs 2
PE grave	91	49.000	400.000	232.626,4	230.000	58.633,5	6.146,5			1 vs 3
PE sem gravidade	45	118.000	427.000	237.266,7	226.000	61.337,2	9.143,6	0,7711	0,0367	
<b>Ureia</b>	144	0,5	46,8	19,4	19,0	7,5	0,6			
Síndrome Hellp	12	17,4	34,9	24,4	22,5	5,9	1,7			
PE grave	88	0,5	46,8	18,8	18,2	7,9	0,8			1 vs 2
PE sem gravidade	44	9,3	36,9	19,2	18,2	6,6	1,0	0,2517	0,0478	
<b>Ácido Úrico</b>	144	2,2	40,9	5,2	4,9	3,3	0,3			
Síndrome Hellp	12	3,0	11,3	6,2	6,0	2,0	0,6			1 vs 2
PE grave	88	2,2	8,4	5,0	4,8	1,4	0,1			1 vs 3
PE sem gravidade	44	2,5	40,9	5,5	4,5	5,6	0,9	< 0,0001*	0,0061	
<b>TGO</b>	144	8,1	429,2	31,0	20,4	46,4	3,9			
Síndrome Hellp	12	8,1	265,9	77,4	37,0	77,0	22,2			1 v 2
PE grave	89	10,0	429,2	30,3	20,5	48,9	5,2			1 vs 3
PE sem gravidade	43	9,3	39,9	19,5	18,0	6,4	1,0	< 0,0001*	0,0002	
<b>TGP</b>	143	4,6	278,9	22,4	12,8	35,9	3,0			
Síndrome Hellp	12	7,7	278,9	72,3	47,2	80,4	23,2			1 vs 2
PE grave	88	4,6	260,2	19,5	12,6	29,1	3,1			1 vs 3
PE sem gravidade	43	5,6	64,9	14,3	11,6	10,9	1,7	< 0,0001*	0,0002	
<b>DHL</b>	139	268,1	2116,9	482,2	438,7	193,6	16,4			
Síndrome Hellp	11	364,8	1180,4	612,7	571,4	243,3	73,4			1 vs 2
PE grave	85	268,1	2116,9	483,6	446,9	215,3	23,4			1 vs 3
PE sem gravidade	43	278,4	751,7	445,9	426,6	102,6	15,7	< 0,0001*	0,0441	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Valores de referência: Plaquetas (150.000 – 450.000  $\mu$ L); Ureia (10 a 50 mg/dL); Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Desidrogenase láctea (DHL, 250 a 450mg/dL). EP: erro padrão; p1=resultado teste de normalidade, sendo (\*) indicativo de variável paramétrica. p2 = variável não paramétrica com p=< 0,05; Significância é o resultado do pós teste. \*\* Diferenças significativas entre os grupos de estudo, 1 ou Síndrome Hellp, 2 ou PE grave, e 3 ou PE sem gravidade.

Tabela 10: Associação de variáveis laboratoriais da gestante pós-parto com a gravidade da pré-eclâmpsia.

Variável Laboratorial	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	Valor de p1	Valor de p2	Significância**
<b>Plaquetas</b>	57	77000,0	1698000,0	257175,4	217000,0	216824,6	28719,1			
Síndrome Hellp	10	108000,0	289000,0	155600,0	137000,0	52673,4	16656,8			1 vs 2
PE grave	37	77000,0	588000,0	259432,4	246000,0	97377,4	16008,8			
PE sem gravidade	10	101000,0	1698000,0	350400,0	204000,0	480290,9	151881,3	< 0,0001*	0,0010	
<b>Ureia</b>	49	14,6	52,7	26,69	25	8,18	1,17			
Síndrome Hellp	9	19,1	34,2	29,54	31,5	5,06	1,69			
PE grave	30	14,6	52,7	26,77	25,7	8,63	1,58			
PE sem gravidade	10	14,8	43,2	23,9	22,45	8,79	2,78	0,2355	0,3310	
<b>Ácido Úrico</b>	44	2,8	8,5	5,1	5,1	1,3	0,2			
Síndrome Hellp	9	3,3	8,4	5,7	5,5	1,5	0,5			
PE grave	26	2,8	8,5	5,0	4,8	1,4	0,3			
PE sem gravidade	9	4,1	6,5	5,0	5,2	0,8	0,3	0,1368	0,3930	
<b>TGO</b>	48	10,6	155,3	30,12	26,15	22,02	3,18			
Síndrome Hellp	10	19,0	155,3	44,7	31,6	39,8	12,6			1 vs 2
PE grave	29	10,6	79,8	26,9	24,2	13,3	2,5			1 vs 3
PE sem gravidade	9	10,8	42,4	24,3	22,6	10,0	3,3	< 0,0001*	0,0517	
<b>TGP</b>	49	1,0	113,0	27,8	16,4	24,5	3,5			
Síndrome Hellp	10	11,6	113,0	44,1	31,2	31,0	9,8			1 vs 2
PE grave	30	1,0	93,4	23,7	14,8	21,8	4,0			
PE sem gravidade	9	7,0	67,9	23,0	15,6	19,6	6,5	0,3072	0,0584	
<b>DHL</b>	25	295,8	691,5	479,5	479,0	108,7	21,8			
Síndrome Hellp	4	434,8	549,7	492,4	492,5	49,4	24,7			
PE grave	14	295,8	691,5	493,4	489,6	121,3	32,4			
PE sem gravidade	7	313,8	621,1	444,3	405,2	110,5	41,8	0,2933	0,6210	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Valores de referência: Plaquetas (150.000 – 450.000  $\mu$ L); Ureia (10 a 50 mg/dL); Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Desidrogenase láctea (DHL, 250 a 450mg/dL). EP: erro padrão; p1=resultado teste de normalidade, sendo (\*) indicativo de variável paramétrica. p2 = variável não paramétrica com  $p < 0,05$ ; Significância é o resultado do pós teste. \*\* Diferenças significativas entre os grupos de estudo, 1 ou Síndrome Hellp, 2 ou PE grave, e 3 ou PE sem gravidade.

Quanto aos recém-nascidos, aqueles de mães com quadro de síndrome hellp apresentaram uma maior frequência de RNs de baixo peso ao nascer (50%,  $p=0,0095$ ) comparados a PE grave (14%) e PE sem gravidade (11%), com maior necessidade de intervenções durante o parto, como aspiração de vias aéreas ( $p=0,0017$ ), ventilação por pressão ( $p=0,0032$ ) e reanimação neonatal ( $p=0,0335$ ) (Tabela 11).

Tabela 11: Associação de variáveis neonatais com gravidade da pré-eclâmpsia.

Variáveis	Diagnóstico Final						p
	Pré						
	Síndrome Hellp		eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>Baixo Peso</b>							
1. < 2500	6	50	13	14,29	5	10,87	
2. ≥ 2500	6	50	78	85,71	41	89,13	0,0095
<b>Reanimação Neonatal</b>							
1. Sim	2	18,18	2	2,22	0	0	
2. Não	9	81,82	82	97,78	46	100	0,0335
<b>Ventilação Pressão</b>							
1. Sim	5	45,45	12	13,33	3	6,52	
2. Não	6	54,55	78	86,67	43	93,48	0,0032
<b>Aspiração Vias Aéreas</b>							
1. Sim	6	54,55	16	18,6	3	6,67	
2. Não	5	45,45	70	81,4	42	93,33	0,0017

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo. P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

### 7.3 COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS LABORATORIAIS NA EVOLUÇÃO DA PRÉ-ECLÂMPسيا

A análise do perfil dos marcadores solúveis na gestante à admissão e no pós-parto considerou os valores de referência das variáveis, devido a possibilidade de redução significativa de valores na faixa de normalidade, e não significativas de valores alterados nos dois momentos.

As análises comparativas dos marcadores hematológicos, renais e hepáticos no pré-parto e pós-parto das pacientes com síndrome hellp mostraram a redução

significativa dos níveis de hemoglobina ( $p=0.0002$ ) e hematócrito ( $p=0.0001$ ) para níveis inferiores aos de referência, mantendo níveis de plaquetas abaixo do valor de referência identificados ao diagnóstico. A função renal manteve-se conservada com níveis de ureia e creatinina dentro da normalidade. Por outro lado, apesar da significativa redução dos valores séricos das enzimas hepáticas TGO, TGP e DHL, após o parto, os seus níveis permaneceram acima dos valores de referência denotando o comprometimento da função hepática (Tabela 12).

*Tabela 12: Evolução das variáveis laboratoriais no pós-parto da Síndrome hellp*

<b>SÍNDROME HELLP</b>				
<b>VARIÁVEIS LABORATORIAIS DA GESTANTE</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média/mediana*</b>	<b>p</b>
Hemoglobina (g/dL) pré-parto	9,9	16,8	12,8	0,0002
Hemoglobina Pós-parto	6,3	12,7	9,3	
Hematócrito (%) pré-parto	30,0	50,7	38,6	0,0001
Hematócrito pós-parto	19,0	38,0	27,8	
Plaquetas (µL) pré-parto	96.000	322.000	149.000*	0,4316
Plaquetas pós-parto	108.000	289.000	137.000*	
Ureia (mg/dL) pré-parto	17,4	34,9	25,3	0,1490
Ureia pós-parto	19,1	34,2	29,5	
Creatinina (mg/dL) pré-parto	0,4	0,9	0,75*	0,0150
Creatinina pós-parto	0,6	1,4	0,8*	
Ácido úrico (mg/dL) pré-parto	5,1	11,3	6,57	0,1073
Ácido úrico pós-parto	3,3	8,4	5,6	
TGO (U/L) pré-parto	8,1	265,9	85,8	0,2754
TGO pós-parto	19,0	155,3	44,7	
TGP (U/L) pré-parto	7,7	278,9	80,4	0,1602
TGP pós-parto	11,6	113,0	44,0	
Bilirrubina total (mg/dL) pré-parto	0,3	1,4	0,5*	0,0355
Bilirrubina total pós-parto	0,2	0,6	0,3*	
Bilirrubina indireta (mg/dL) pré-parto	0,2	0,6	0,3	0,0225
Bilirrubina indireta pós-parto	0,1	0,3	0,1	
DHL(U/L) pré-parto	571,4	905,0	692,40	0.0541
DHL pós-parto	434,8	549,7	492,35	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Valores de referência: Hemoglobina (12 a 16 g/dL); Hematócrito (36 a 47%); Plaquetas (150.000 – 450.000 µL); Ureia (10 a 50 mg/dL); Creatinina (0.6 a 1,3mg/dL), Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Bilirrubina total (até 1,2 mg/dL); Bilirrubina indireta (até 0,8 mg/dL); DHL (250 a 450mg/dL) \*utilizado valor da mediana, P foi estimado pelo teste qui-quadrado de Pearson.

Gestantes com PE grave apresentaram no pré-parto níveis das enzimas hepáticas TGO e DHL acima dos valores referências, mas inferiores aos observados na síndrome hellp. Após o parto houve redução dos valores alterados, mas não atingiu a faixa normal de valores de referência. Os níveis de hemoglobina diminuíram significativamente após o parto, atingindo valores abaixo da normalidade. Os níveis de marcadores de função renal também foram reduzidos após o parto, mantendo-se dentro dos valores da normalidade antes e após o parto. (Tabela 13).

*Tabela 13: Avaliação das variáveis laboratoriais no pré e pós-parto na PE grave*

<b>PRÉ-ECLÂMPSIA GRAVE</b>				
<b>Variáveis laboratoriais</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média/mediana*</b>	<b>valor de p</b>
Hemoglobina (g/dL) pré-parto	9,9	15,5	12,8	< 0,0001
Hemoglobina Pós-parto	6,8	14,4	10,7	
Hematócrito (%) pré-parto	29,6	45,4	38,7	< 0,0001
Hematócrito pós-parto	21,2	43,0	32,2	
Plaquetas (µL) pré-parto	49.000	382.000	229.000*	0,1090
Plaquetas pós-parto	77.000	588.000	246.000*	
Ureia (mg/dL) pré-parto	6,2	41,7	23,9*	0,0027
Ureia pós-parto	14,6	52,7	25,7*	
Creatinina (mg/dL) pré-parto	0,4	1,6	0,7*	0,0048
Creatinina pós-parto	0,5	2,0	0,8*	
Ácido úrico (mg/dL) pré-parto	2,9	8,4	5,6*	0,0223
Ácido úrico pós-parto	2,8	8,5	4,8*	
TGO (U/L) pré-parto	10,1	429,2	30,1	1,000
TGO pós-parto	10,6	79,8	26,5	
TGP (U/L) pré-parto	4,6	260,2	19,4	0,5632
TGP pós-parto	1,0	93,4	23,2	
Bilirrubina total (mg/dL) pré-parto	0,1	1,4	0,3*	0,2582
Bilirrubina total pós-parto	0,1	1,8	0,3*	
Bilirrubina indireta (mg/dL) pré-parto	0,1	0,9	0,3	0,0481
Bilirrubina indireta pós-parto	0,1	0,7	0,2	
DHL (U/L) pré-parto	341,1	731,9	491,61	0.9448
DHL pós-parto	295,8	691,5	489,37	

Fonte: Elaborado pela autora, 2021. Valores de referência: Hemoglobina (12 a 16 g/dL); Hematócrito (36 a 47%); Plaquetas (150.000 – 450.000 µL); Ureia (10 a 50 mg/dL); Creatinina (0,6 a 1,3mg/dL), Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Bilirrubina total (até 1,2 mg/dL); Bilirrubina indireta (até 0,8 mg/dL), DHL (250 a 450mg/dL). \*utilizado valor da mediana, P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

As gestantes com PE sem gravidade apresentaram as variáveis hematológicas, renais e hepáticas dentro do limite da normalidade no pré e pós-parto (Tabela 14).

*Tabela 14: Avaliação das variáveis laboratoriais no pré e pós-parto na PE sem gravidade*

<b>PRÉ-ECLÂMPZIA SEM GRAVE</b>				
<b>Variáveis laboratoriais</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Média</b>	<b>valor de p</b>
Hemoglobina (g/dL) pré-parto	11,4	14,2	12,58	0,0150
Hemoglobina Pós-parto	8,0	13,8	11,14	
Hematócrito (%) pré-parto	34,6	43,9	38,46	0,0080
Hematócrito pós-parto	23,5	39,3	33,66	
Plaquetas (µL) pré-parto	118.000	427.000	225.500	0,9219
Plaquetas pós-parto	101.000	169.800	204.000	
Ureia (mg/dL) pré-parto	13,1	33,6	21,70	0,5609
Ureia pós-parto	14,8	43,2	23,90	
Creatinina (mg/dL) pré-parto	0,4	0,9	0,63	0,0107
Creatinina pós-parto	0,5	1,0	0,71	
Ácido úrico (mg/dL) pré-parto	3,3	5,7	4,74	0,3166
Ácido úrico pós-parto	4,1	6,5	5,04	
TGO (U/L) pré-parto	16,2	34,0	23,48	0,7720
TGO pós-parto	10,8	42,4	24,27	
TGP (U/L) pré-parto	7,2	49,2	18,59	0,2031
TGP pós-parto	7,0	67,9	22,99	
Bilirrubina total (mg/dL) pré-parto	0,2	1,2	0,46	0,8551
Bilirrubina total pós-parto	0,1	1,7	0,42	
Bilirrubina indireta (mg/dL) pré-parto	0,1	0,9	0,29	0,6716
Bilirrubina indireta pós-parto	0,0	1,2	0,27	
DHL (U/L) pré-parto	345,0	694,7	473,66	0,9375
DHL pós-parto	313,8	621,1	444,3	

Fonte: Elaborado pela autora, 2021. Valores de referência: Hemoglobina (12 a 16 g/dL); Hematócrito (36 a 47%); Plaquetas (150.000 – 450.000 µL); Ureia (10 a 50 mg/dL); Creatinina (0.6 a 1,3mg/dL), Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Bilirrubina total (até 1,2 mg/dL); Bilirrubina indireta (até 0,8 mg/dL), DHL (250 a 450mg/dL), P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

#### 7.4 ANÁLISE GENÉTICA DO PROMOTOR DO GENE *HLA-G*

A análise genética da região promotora do gene *HLA-G* das gestantes com pré-eclâmpsia, grave ou não, revelou que a presença dos genótipos -509 C/C (OR= 0,44;  $p= 0,0508$ ), -486 C/C (OR= 0,44;  $p= 0,0168$ ), -400 G/G (OR= 0,38;  $p= 0,0151$ ) e possivelmente o genótipo -391G/G (OR= 0,45;  $p= 0,0533$ ) estão relacionados a proteção contra a doença quando comparadas ao grupo controle formado por mulheres saudáveis sem histórico de câncer, doença autoimune, abortos ou pré-eclâmpsia na família. Por outro lado, o homocigoto A/A para o sítio -486 do gene *HLA-G* possivelmente está relacionado ao aumento do risco de desenvolver PE (OR= 1,80;  $p= 0,0554$ ) quando comparado ao grupo controle, pois apesar do intervalo de confiança incluir a unidade, o alelo C em homocigose está associado a proteção de forma significativa (Tabela 15).

Adicionalmente, a presença do alelo -1138 A em homocigose (OR= 2,97;  $p= 0,0317$ ) ou heterocigose (OR= 3,35;  $p= 0,0511$ ) está associada a um risco de 3X de apresentar a forma grave da doença. Ainda, a presença do genótipo -400 G/G, apesar de estar associado ao menor risco de desenvolver pré-eclâmpsia, pode estar relacionado a maior risco em desenvolver a forma grave da doença (OR= 2,85;  $p= 0,0570$ ). Nesse caso, foi observado um intervalo de confiança grande, sugerindo limitação da análise devido ao reduzido número de indivíduos apresentando uma das variáveis (Tabela 15).

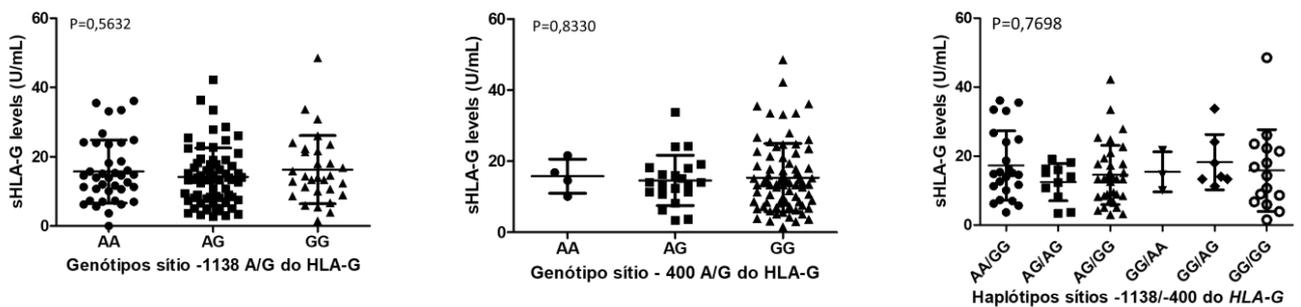
Quando construímos haplótipos formados pelos sítios polimórficos *HLA-G* -509 C/G; -400 A/G; -391A/G, cujos genótipos estiveram associados a proteção contra a doença, obtemos três haplótipos para o grupo controle e oito para o grupo de pacientes. O haplótipo *HLA-G* -509 CC/-400GG/-391GG foi o mais prevalente em ambos os grupos, e um fator associado a proteção contra a doença quando comparado ao grupo controle (78% vs 91%; OR= 0,36; IC= 0,16-0,83;  $p= 0,0184$ ) (Tabela 16).

Na avaliação de haplótipos formados a partir dos sítios polimórficos *HLA-G* -1138 A/G e -400 A/G associados à evolução da doença em pacientes que tem o diagnóstico de PE confirmado (PE grave e Síndrome Hellp comparados com PE sem gravidade) gerou seis possíveis haplótipos, dos quais cinco foram identificados no grupo de pacientes com PE sem gravidade, e quatro no grupo de gestantes com

doença grave. O haplótipo *HLA-G* -1138AA/-400GG foi associado ao maior risco para o desenvolvimento da forma grave da pré-eclâmpsia (OR= 3,38  $p= 0,0246$ ) (Tabela 17).

A influência das variantes genéticas associadas ao risco das formas graves da doença sob os níveis de sHLA-G foi examinada, e os resultados mostraram que os níveis de sHLA-G em sangue periférico dos portadores dos genótipos dos sítios *HLA-G* -1138 e -400 e os haplótipos formados por esses sítios não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 7), sugerindo que outras variáveis genéticas e clínicas devem ser consideradas na análise.

*Figura 7. Análise de associação entre genótipos e haplótipos do gene HLA-G associados a formas graves da pré-eclâmpsia e níveis de sHLA-G.*



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Nota: Influência do genótipo -1138 (gráfico à esquerda), genótipo -400 (gráfico do meio) e haplótipo composto pelos sítios -1138 e -400 (gráfico à direita) do gene *HLA-G* nos níveis de sHLA-G em sangue periférico de pacientes portadoras de pré-eclâmpsia. P valor determinado pelo teste Kruskal-Wallis.

*Tabela 15: Frequência genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene HLA-G em gestantes.*

	Controle	Síndrome Hellp	PE grave	PE sem gravidade	Total - PE	(Hellp + PE grave) x PE sem gravidade		Total-PE x Pop - FEM		
						OR	P- valor	OR	P- valor	
<b>-1138 (A/G)</b>										
AA	85	10	71	21	102	2.97 (1.14-7.70)	0.0317	0.78 (0.38-1.60)	0.5921	
AG	14	1	11	9	21	0.35 (0.13-0.95)	0.0511	1.24 (0.59-2.58)	0.5850	
GG	1	1	0	1	2	--	--	--	--	
total	100	12	82	31	125					
<b>-509 (C/G)</b>										
CC	103	8	59	24	91	2.28 (0.84-6.19)	0.1116	0.44 (0.19-0.99)	0.0508	
CG	10	2	8	9	19	0.40 (0.14-1.08)	0.0960	2.12 (0.94-4.81)	0.0750	
GG	0	1	0	0	1	--	--	--	--	
total	113	11	67	33	111					
<b>-486 (A/C)</b>										
AA	26	3	23	13	39	0.74 (0.32-1.74)	0.5172	1.80 (0.99-3.24)	0.0554	
AC	50	5	28	19	52	0.75 (0.34-1.63)	0.5514	1.09 (0.64-1.86)	0.7871	
CC	34	3	15	0	18	--	--	0.44 (0.23-0.84)	0.0168	
total	110	11	66	32	109	--	--			
<b>-400 (A/G)</b>										
AA	0	1	1	2	4	--	--	--	--	
AG	11	1	10	8	19	0.40 (0.14-1.14)	0.0914	2.05 (0.92-4.56)	0.0793	
GG	100	8	55	17	80	2.85 (1.07-7.62)	0.0570	0.38 (0.17-0.83)	0.0151	
total	111	10	66	27	103					
<b>-391 (A/G)</b>										
AA	0	1	2	1	4	--	--	--	--	
AG	11	1	9	6	16	0.51 (0.16-1.58)	0.3485	1.67 (0.73-3.81)	0.2242	
GG	98	8	54	19	81	1.76 (0.61-5.04)	0.3912	0.45 (0.20-1.00)	0.0533	
total	109	10	65	26	101					

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: OR: Odds ratio, P foi estimado pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 16: Haplótipo construído com genótipos associados a proteção contra doença

Haplótipo -509/-400/-391	Gestantes com pré-eclâmpsia		População controle		OR (IC)	P-valor
	n	%	n	%		
CC/AG/AG	3	3,09	2	1,85	--	--
CC/AG/GG	2	2,06	0	0,00	--	--
CC/GG/GG	76	78,35	98	--	0.36 (0.16-0.83)	0.0184
CC/GG/AG	0	0,00	0	0,00	--	--
CG/AG/AG	14	14,43	8	7,41	2.10 (0.84-5.27)	0.1182
CG/GG/GG	1	1,03	0	--	--	--
CG/GG/AG	0	0,00	0	0,00	--	--
CC/AG/GG	1	1,03	0	--	--	--
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>100,00</b>	<b>108</b>	<b>100,00</b>		

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confiança. P foi estimado pelo teste de Wilcoxon.

*Tabela 17: Haplótipo construído com genótipos associados a evolução da doença em gestantes com PE.*

	Gestantes com pré-eclâmpsia grave		Gestantes com pré-eclâmpsia SEM grave		OR (IC)	P-valor
	n	%	n	%		
Haplótipo -1138/-400						
AA/AA	0	0,00	1			
AA/GG	61	83,56	15	62,50	3.38 (1.23-9.32)	0.0246
AG/AA	1	1,37	0	--	--	--
AG/AG	10	13,70	7	29,17	0.40 (0.13-1.22)	0.1283
AG/GG	0	0,00	1	--	--	--
GG/AA	1	1,37	1	--	--	--
Total	73	100,00	24	100,00		

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confiança. P foi estimado pelo teste de Wilcoxon.

Adicionalmente, considerando que as gestantes com formas graves da doença possuem um maior risco de apresentar parto antes do termo da gestação (Tabela 18), nós avaliamos os níveis de sHLA-G nas gestações a termo e pré-termo, na admissão e após o parto das gestantes (Tabela 19). Os resultados mostram maiores níveis de sHLA-G na admissão em relação ao pós-parto, independente da paciente ter um parto a termo ou pré-termo.

*Tabela 18 - Associação da idade gestacional no parto em relação a gravidade da PE*

	Pré-eclâmpsia sem gravidade		Síndrome Hellp		Pré-eclâmpsia grave		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
<b>Pré Termo</b>	8	17,39	8	66,67	37	39,78	0,0016
<b>Termo</b>	38	82,61	4	33,33	56	60,22	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. N: número de participantes, P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

*Tabela 19 - Níveis de sHLA-G na admissão e após o parto em nascimentos pré-termo e termo*

Variável	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	valor de p1*	valor de p2
<b>sHLA-G Admissão</b>									
Termo	85	2.686	89.958	17,01	14,59	11,77	1,28	< 0,0001	0,1568
Pré Termo	49	3,17	36.333	14,14	13,32	7,46	1,07	0,0042	
<b>sHLA-G pós-parto</b>									
Termo	65	0	35.502	4,59	2,67	6,63	0,82	< 0,0001	0,0621
Pré Termo	36	0,001	13.249	5,25	5,55	4,29	0,72	0,0082	
<b>Termo</b>									
sHLA-G Admissão	62	3,048	89,958	17,56	15,15	12,95	1,64	< 0,0001	< 0,0001
sHLA-G pós-parto	62	0	35,502	4,67	2,67	6,78	0,86	< 0,0001	
<b>Pré Termo</b>									
sHLA-G Admissão	35	3,688	36,333	14,65	13,32	7,48	1,26	0,0083	< 0,0001
sHLA-G pós-parto	35	0,001	13,249	5,33	5,55	4,32	0,73	0,0083	
<b>Geral</b>									
sHLA-G Admissão	97	3,048	89,958	16,51	14,03	11,33	1,15	< 0,0001	< 0,0001
sHLA-G pós-parto	97	0	35,502	4,91	4,11	5,99	0,61	< 0,0001	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. N: número de participantes, EP: Erro padrão, p1=resultado teste de normalidade, sendo (\*) indicativo de variável paramétrica, p2 = variável não paramétrica com p=< 0,05.

## 7.5 EFEITO DO CORTICOIDE NOS NÍVEIS DE SHLA-G MATERNO NA PRÉ-ECLÂMPسيا GRAVE

No que diz respeito a corticoterapia antenatal, a droga utilizada foi a dexametasona e sua utilização foi necessária em 41,6% das pacientes com síndrome hellp e em 10,7% das pacientes com diagnóstico de PE grave demonstrando ser estatisticamente significativa ( $p=0,0147$ ) a utilização do corticoide em gestantes com risco de parto prematuro, dada a gravidade do quadro clínico (Tabela 20).

*Tabela 20: Relação entre uso de corticoide e gravidade da pré-eclâmpسيا*

Variáveis	Diagnóstico Final						p
	Síndrome Hellp		Pré-eclâmpسيا grave		Pré-eclâmpسيا sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>CORTICOTERAPIA</b>							
<b>Uso de Corticoide</b>							
1. Sim	5	41,67	10	10,75	4	8,16	0,0147
2. Não	7	58,33	83	89,25	45	91,84	
<b>Número de Doses</b>							
<b>0</b>	7	58,33	83	88,30	45	91,84	0,0147
<b>1</b>	1	8,33	2	2,13	0	0,00	
<b>2</b>	2	16,67	0	0,00	0	0,00	
<b>3</b>	1	8,33	3	3,19	2	4,08	
<b>4</b>	1	8,33	6	6,38	2	4,08	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. N: número de participantes, P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

Das 49 pacientes com apresentação clínica da pré-eclâmpسيا sem gravidade, 41 não fizeram uso de corticoides e tiveram gestação a termo, e apenas para quatro pacientes foi prescrito o uso de corticoide preventivo devido a gestação ser pré-termo.

Das 105 pacientes com pré-eclâmpسيا grave, incluindo síndrome hellp, 15 fizeram uso de corticoide devido a idade gestacional pré-termo. Das 90 gestantes com forma grave da doença, mas que não fizeram uso de corticoide, 63 estavam a termo e apenas 15 (incluindo uma síndrome hellp) a gestação era pré-termo entre 25-36 semanas de gestação.

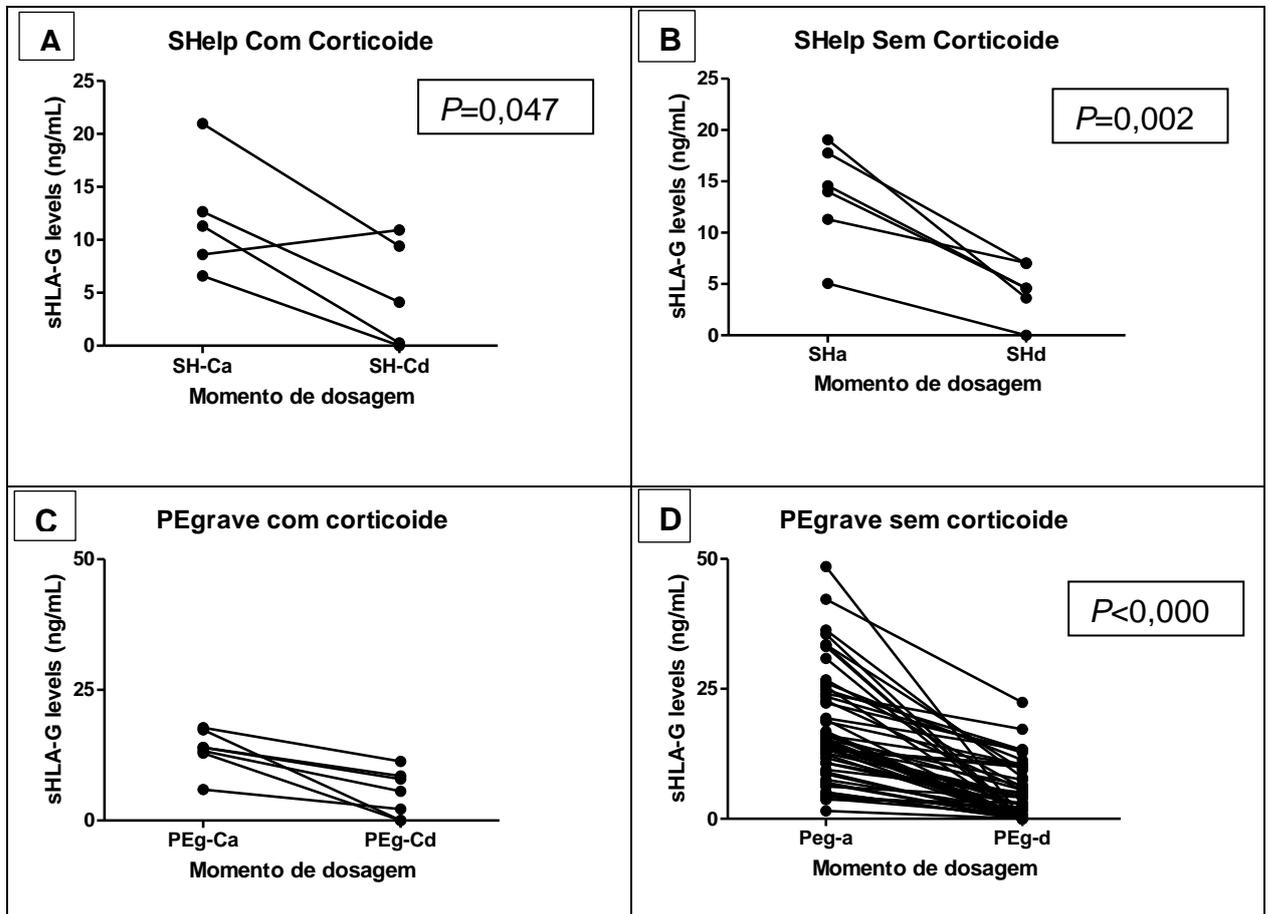
Os níveis circulantes de sHLA-G na gestante diminuíram significativamente após o parto, independentemente do uso preventivo de corticoide (Figura 8).

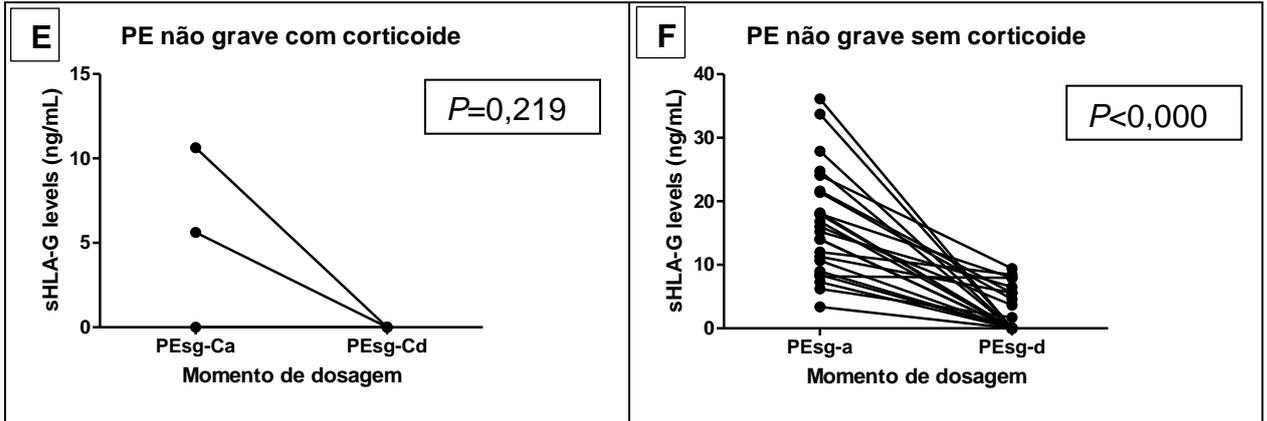
Considerando apenas os níveis de sHLA-G materno após o parto e comparando os dados das gestantes que receberam corticoide preventivo antes do parto, observamos que não houve diferença nos níveis de sHLA-G nas gestantes com

pré-eclâmpsia grave, incluindo a síndrome hellp. Entretanto, nas gestantes com a doença sem gravidade foi observado uma mediana nos níveis de sHLA-G superior naquelas que não fizeram uso de corticoide. Esse resultado deve ser visto com cautela devido ao reduzido número de gestantes com pré-eclâmpsia sem gravidade que fez uso de corticoide preventivo (Figura 9).

O reduzido número de amostras após o uso do corticoide e antes do parto não permitiu a avaliação do efeito direto do corticoide sobre os níveis circulantes de sHLA-G na gestante.

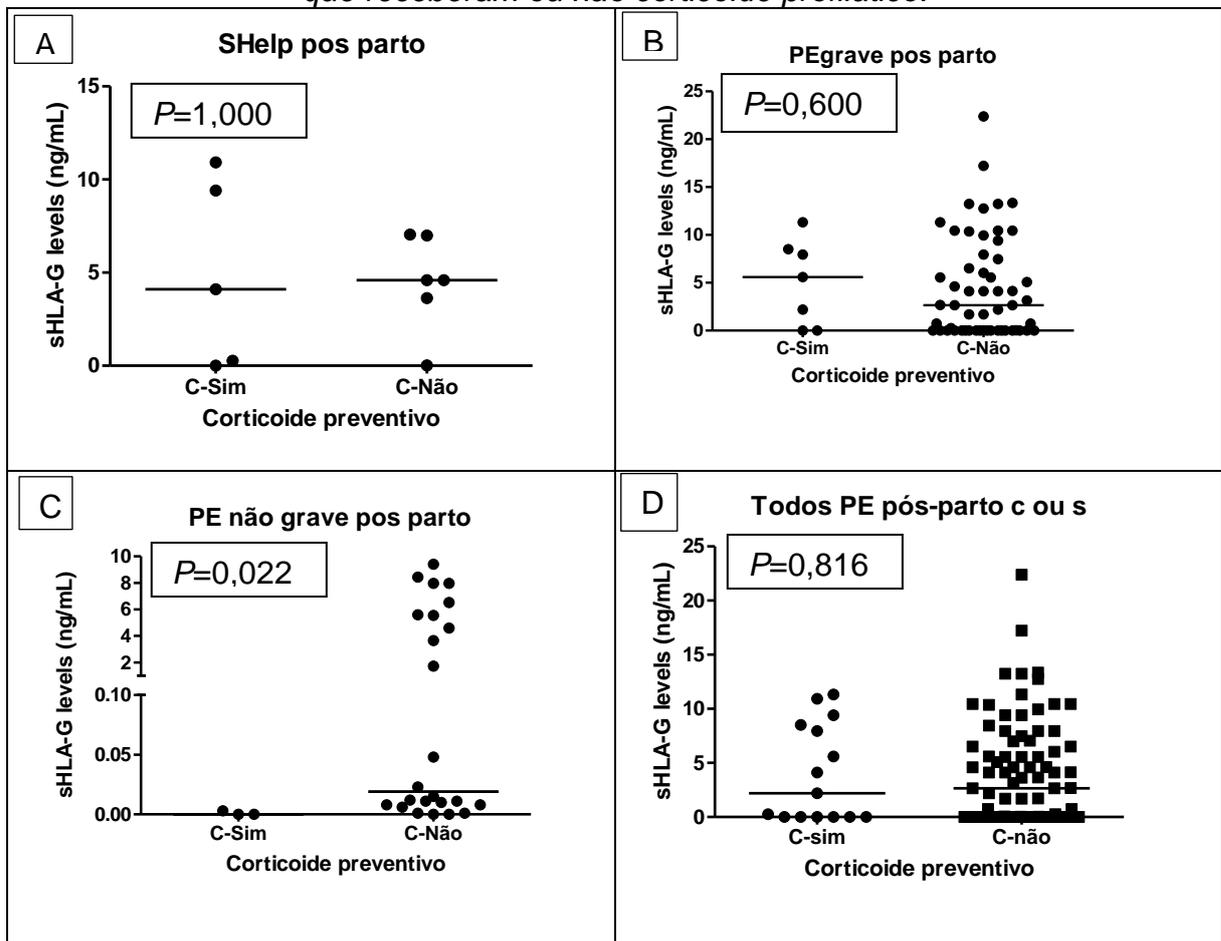
*Figura 8. Relação entre os níveis de sHLA-G no sangue periférico das gestantes com pré-eclâmpsia que fizeram ou não uso de corticoide preventivo em amostras pareadas antes e após o parto*





Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: Diferença na quantificação de sHLA-G em gestantes relacionado ao uso ou não do corticoide antes e depois do parto nas diferentes apresentações clínicas da Pré-eclâmpsia, onde (A) sHLA-G em pacientes com síndrome hellp (SH) que usaram corticoide antes (Ca) e depois (Cd) do parto; (B) dosagem de sHLA-G antes e depois do parto em pacientes com síndrome hellp que não fizeram uso de corticoide; (C) sHLA-G em pacientes com PE grave que fizeram uso de corticoide antes do parto (PEg-Ca) e 24h pós parto (PEg-Cd); (D) sHLA-G em pacientes com PE grave antes (PEg-a) e depois (PEg-d) do parto; (E) sHLA-G antes (PEsg-Ca) e depois (PEsg-Cd) do parto em gestantes com diagnóstico de PE sem gravidade que fizeram uso de corticoide; (F) sHLA-G antes (PEsg-a) e depois (PEsg-d) do parto em gestantes com PE sem gravidade que não fizeram uso de corticoide.

Figura 9. Relação entre os níveis de sHLA-G materno após o parto em gestantes que receberam ou não corticoide profilático.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: Diferença nos níveis de sHLA-G 24h após o parto de pacientes que receberam (C-sim) ou não (C-não) corticoide profilático com (A) diagnóstico de Síndrome hellp, (B) PE grave, (C) PE sem gravidade e (D) todas as pacientes do estudo.

## 8. DISCUSSÃO

A pré-eclâmpsia é uma doença com um componente genético que compromete a saúde placentária aumentando o risco de agressão ao feto, e perda do concepto, cuja patogênese está associada a diminuição de moléculas inibitórias, como a HLA-G, que tem por função impedir o reconhecimento pelo sistema imune materno do concepto, reconhecida pela mãe como estranha por conta da carga genética paterna (SHERER; POSILLICO; SCHWARZ, 2018). Fatores biológicos, como a idade materna e a raça, e comorbidades, como diabetes, hipertensão e obesidade, que levam a um estado inflamatório, além de alterações circulatórias na placenta também contribuem para a ocorrência e gravidade da doença (BARTSCH et al., 2016).

Em um estudo de coorte de 30 anos nos Estados Unidos da América, 2,9% das 106.522.492 gestações registradas evoluíram com eclampsia, estando associada a idade materna inferior a 15 anos (0,8%) e superior a 45 anos (0,5%), superior nas gestantes de raça negra (0,44%) comparadas as brancas (0,29%), portadoras de obesidade (0,38%) comparadas àquelas com sobrepeso (0,23%) e peso normal (0,16%), e gestação múltipla (0,83%) comparadas a gestação de um único feto (0,27%) (DONGARWAR et al., 2021). Na coorte no Reino Unido, dentre as 76.158 gestantes avaliadas, a média de idade foi de 31 anos, e a idade materna como variável continua não foi associada a pré-eclâmpsia, mas como variável categórica, gestantes acima de 35 anos apresentaram maior risco (1,5 vezes) de desenvolvimento de pré-eclâmpsia (KHALIL et al., 2020). Também dentre 23.291 gestantes francesas com média de idade e 31 anos, a idade materna acima de 45 anos aumentou em 3 vezes o risco de pré-eclâmpsia (5% x 16%,  $p=0,02$ ) (VANDEKERCKHOVE et al., 2021).

Na nossa casuística, as gestantes tinham idade média de 27,5 anos, e a idade não estava associada a gravidade da doença, possivelmente devido a limitação do número de gestantes com síndrome hellp que correspondia a 7,6% dos casos pré-eclâmpsia, e a não inclusão de gestantes menores de 18 anos no estudo. De forma semelhante, o estudo da África do Sul em 1.547 gestantes com pré-eclâmpsia e média de idade de 27 anos mostrou que 9,5% das pacientes evoluíram para eclampsia, mas

com maior risco para as gestantes com idade inferior a 20 anos (30% x 3,5%) (NATHAN et al., 2018).

Uma meta-análise envolvendo 92 estudos mostrou que a primigestação corresponde a 32,3% dos casos de pré-eclâmpsia, representando um aumento em duas vezes na chance de desenvolver a doença (LONG, ABELL, BEISCHER, 1979; BARTSCH et al., 2016). No nosso estudo, a frequência de primigesta na pré-eclâmpsia foi de 43%, mas não houve associação com a gravidade da doença.

A mesma meta-análise relatou um risco de pré-eclâmpsia de 2,9, 3,7 e 5,1 vezes para quem é obesa, diabética e tem hipertensão arterial sistêmica prévia, respectivamente. E um risco de 8,7 vezes para quem tem histórico de pré-eclâmpsia anterior (BARTSCH et al., 2016; FRICK, 2021). De forma semelhante, as gestantes com pré-eclâmpsia e familiares de primeiro grau referiram fatores de risco para a doença, como diabetes (4,7% e 82,6% dos casos), hipertensão (14% e 91,3%), e pré-eclâmpsia prévia (17% e 44%, respectivamente), com um risco superior a duas vezes associado ao diabetes e hipertensão, corroborando com outros estudos (KHALIL et al., 2013, CHEN et al., 2021).

Em relação aos sinais e sintomas referidos pelas pacientes, a FEBRASGO na sua última atualização em 2017, classifica a PE como grave quando o pico hipertensivo (PA igual ou maior que 160/110 mmHg) está associado a um ou mais sinais de eminência de eclâmpsia como transtornos cerebrais (cefaléia), transtornos gástricos (dor epigástrica e vômitos) e transtornos visuais (escotomas). A análise comparativa das frequências dessas variáveis entre casos mais leves e mais graves da PE foram estatisticamente significantes, confirmando que a presença dos sintomas citados acima na vigência do internamento está associado ao maior comprometimento placentário e, conseqüentemente, a gravidade da PE (KAHHALE et al., 2018). As associações entre o aumento da pressão arterial sistólica e da idade gestacional menor que 35 semanas na admissão com a gravidade da pré-eclâmpsia encontradas corroboram com outros estudos (KINAY et al., 2015; NDWIGA et al., 2020; CHEN et al., 2021; ZHU et al., 2021).

Em relação aos parâmetros hematológicos, os níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas na admissão hospitalar apresentaram variação, extrapolando os limites da normalidade na PE grave e síndrome hellp, mas apenas a redução dos

níveis de plaquetas estava associada a síndrome hellp. A associação da trombocitopenia com síndrome hellp e eclampsia já foi descrita por outros (KINAY et al., 2015; BERHAN; ENDESHAW, 2015). Após o parto a redução dos níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas ocorre em todas as gestantes, entretanto, a redução observada da hemoglobina e hematócrito foi significativamente superior na síndrome hellp comparadas a redução observada PE sem gravidade e PE grave. Os níveis de plaquetas também foram reduzidos, mas a diferença não atingiu a significância em nenhum grupo estudado, mas a trombocitopenia pós-parto continuou sendo um fator de gravidade associado apenas a síndrome hellp, corroborando o estudo que descreveu a anemia abaixo de 12mg/dL no pós-parto e a trombocitopenia abaixo de 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> no pré- e pós-parto associadas com a eclampsia (BERHAN; ENDESHAW, 2015).

Alteração em marcadores da função hepática (ácido úrico, TGO, TGP e DHL) estiveram associados a gravidade da pré-eclâmpsia na admissão, corroborando outros estudos (GRACIA, 2012; KINAY et al., 2015; NDWIGA et al., 2020; CHEN et al., 2021). Dentre esses, as enzimas hepáticas TGO e DHL foram os únicos que permaneceram com níveis elevados no pós-parto nas gestantes com síndrome hellp, e níveis discretamente acima do limite de referência nas gestantes com PE-grave. Essas enzimas são indicativas de lesão hepática, e o seu aumento representam risco para ruptura hepática associada a eclampsia (GRACIA, 2012), e a persistência de níveis duas vezes acima do valor referência no pós-parto sugere a gravidade da lesão hepática (BERHAN; ENDESHAW, 2015).

Em relação ao ácido úrico, ele apresentou diferença estatística significativa em nossas análises nas pacientes com PE grave, e estes resultados estão de acordo com outros estudos (Y, 2013; VAKARANAM, 2015; CHEN et al., 2021) que apontam uma associação entre os níveis de ácido úrico e agravamento da PE, pois o ácido úrico pode induzir a produção trofoblástica de interleucina-1 $\beta$  pró-inflamatória por meio da ativação de vias inflamatórias, agravando ainda mais a má perfusão existente na interface materno fetal em pacientes com PE.

Os níveis de bilirrubina total como variável contínua não apresentaram associação com gravidade da doença, provavelmente devido a pequena amostragem da síndrome hellp, e reduzido espectro de variação dos valores, que contribuíram para os níveis médios de bilirrubina total nos três grupos permanecerem dentro da faixa de

normalidade na admissão e após as 24 hs do parto. Entretanto, a bilirrubina total como variável categórica apresentou diferença significativa na proporção de gestantes com níveis de bilirrubina total superior a 0,7 mg/dL no grupo de gestantes com síndrome hellp, PE-grave e PE sem gravidade (33% x 15% x 12%;  $p=0,0006$ ), com a significativa redução nos níveis médios de bilirrubina observados nas gestantes com síndrome hellp após o parto. Níveis mais altos de bilirrubina é indicativo de hemólise, um dos critérios de classificação para síndrome hellp, e associados à mortalidade materna (KOZIK et al., 2011; MUNAZZA et al., 2011; KASRAEIAN, 2018; LODHI; ROY, 2018). Ainda, uma coorte britânica de 10 anos com 50.712 gestantes, sendo 925 portadoras de pré-eclâmpsia, mostrou que gestantes com pré-eclâmpsia e níveis de bilirrubina inferiores a 0,21 mg/dL possuem prognóstico materno e fetal mais reservado, por impor uma menor ação antioxidante da bilirrubina, mas não há uma discussão robusta sobre a questão (BRESLIN et al., 2013).

Em relação aos marcadores da função renal, os níveis plasmáticos de ureia estavam dentro da faixa de normalidade na admissão, mesmo assim os maiores níveis estavam associados com a gravidade da doença. Após o parto, um discreto aumento nos níveis de ureia foi observado em todos os grupos. Por outro lado, a creatinina plasmática apresentou níveis médios dentro da normalidade em todos os grupos, mas valores máximos acima da faixa de normalidade nas formas graves da doença. Na literatura há controvérsias na associação de níveis elevados de creatinina e a gravidade (BERHAN; ENDERCHAW, 2015); ZHU et al., 2021) ou não (KINAY et al., 2015) da pré-eclâmpsia. O comprometimento renal na eclampsia está principalmente associado ao aumento da pressão sistólica e coagulação intravascular disseminada e uma das causas de óbito na eclampsia (NATHAN et al., 2018).

Em relação as variáveis dos recém-nascidos, a idade gestacional pré-termo e o baixo peso ao nascer tiveram associação com a síndrome hellp, corroborando com outros estudos que associam a menor idade gestacional à eclampsia e ao aumento do risco de óbito fetal (NATHAN et al., 2018; NDWIGA et al., 2020). Em nosso estudo a maior parte dos recém-nascidos nasceram com peso adequado para a idade gestacional, no entanto 50% das pacientes com síndrome hellp tiveram bebês com baixo peso ao nascimento, resultado estatisticamente significativo, comprovando a relação entre a gravidade da doença e as repercussões no RN (GUZEL, 2011; NDWIGA et al., 2020). Em 2014, Coelho e colaboradores mostraram que 45,6% dos

recém-nascidos de mães com síndrome Hellp também foram pequenos para a idade gestacional. Outro dado observado pelo autor é que essas pacientes apresentaram maiores níveis de proteinúria, o que não foi pontuado em nosso estudo por falta de registro em prontuário desta informação. As intervenções mais registradas em artigos e encontradas no nosso estudo são aspiração de vias aéreas, ventilação por pressão e, nos casos mais graves, reanimação neonatal, evidenciando o impacto que a má perfusão placentária secundária a hipertensão tem na morbidade e prognóstico da mãe e RN (SIBAI, 2003; CHAIM, 2008; CASSIANO, 2017).

O histórico de pré-eclâmpsia nos parentes de primeiro grau, mãe ou irmã, em 45% das gestantes avaliadas demonstra a forte influência do componente genético no papel fisiopatológico dos distúrbios hipertensivos na gravidez (CHAPELL, 2021). Um estudo sueco realizado 2014 demonstrou que gestantes com histórico de mãe ou irmã com PE tem 3x mais chances de desenvolver a doença (NILSSON, 2014).

O nível de HLA-G é crucial para a manutenção da gravidez e níveis baixos placentários e circulantes estão associados a abortos de repetição e eclampsia (SIPAK, 2019; ROKHAFROOZ, 2018). Esses níveis são determinados a nível transcricional e pós-transcricional do gene *HLA-G*, através dos sítios polimórficos existentes principalmente nas regiões reguladoras do gene. Na região 5'URR existem 35 sítios polimórficos, alguns dos quais em sequencias alvo para fatores de transcrição (CASTELLI et al, 2014). Na região 3' não-traduzida existem oito sítios de polimorfismos (14bp Ins/Del, +3003 C/T, +3010 C/G, + 3027 A/C, +3035 C/T, +3142 C/G, +3187 C/G e +3196 C/G) (MARTELLI-PALLOMINO, 2013) mais prevalentes capazes de modular a expressão do gene através da mediação de microRNAs (CASTELLI et al., 2017). A variante genética mais estudada é a deleção / inserção de 14-pares de base (14-pb) na região 3' não-traduzida, com a inserção associada a diminuição de níveis de sHLA-G e ao risco de eclampsia (ROKHAFROOZ, 2018; SIPAK, 2019).

Comparamos as frequências alélicas e genotípicas de 20 polimorfismos entre a posição -1305 e - 369 da 5'URR do gene *HLA-G* de mulheres com pré-eclâmpsia e mulheres saudáveis, e identificamos três sítios polimórficos (-509/-400/-391) cujos alelos majoritários em homozigose estavam relacionados à proteção contra a doença, e outro apresentando uma tendência a significância (-486 G/G). Adicionalmente, observamos que o alelo A em homozigose -486A/A estava relacionado ao aumento

do risco de desenvolver PE. De forma semelhante, DURMANOVA e colaboradores em 2021, ao analisar polimorfismos na região HLA-G 5'URR em mulheres eslovacas com pré-eclâmpsia, encontraram uma associação significativa entre -486A/C e aborto espontâneo, sugerindo que o alelo A possa ser dominante. O mesmo estudo demonstrou que os genótipos -201AA foram significativamente mais frequentes em mulheres que desenvolveram pré-eclâmpsia, região não avaliada no nosso estudo.

Quando analisamos isoladamente as gestantes com pré-eclâmpsia, os presença dos genótipos -1138 A/A e -400 G/G e o haplótipo apresentou um risco três vezes superior para desenvolver formas graves da doença. Entretanto, não identificamos diferenças significativas associando os níveis circulantes de sHLA-G com essas variantes genéticas. Além da possibilidade de outros sítios polimórficos, como aqueles da região 3' não-traduzida, estarem simultaneamente interagindo na modulação da expressão do sHLA-G, deve-se considerar as alterações metabólicas, estresse e hipóxia que as gestantes na admissão hospitalar podem estar sujeitas, pois essas situações podem ativar fatores de transcrição com sítios na região promotora do gene *HLA-G* (FERREIRA, 2017a), fazendo com que os valores de sHLA-G sejam mais uniformes entre os grupos. Ademais, a forma de membrana da molécula HLA-G não foi quantificada nesse estudo. De acordo com Nilsson e colaboradores (2014), é provável que o genótipo materno em combinação com o genótipo fetal tenha uma interação que seja determinante para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia e/ou sua evolução para formas graves, no entanto o genótipo fetal não foi analisado em nosso estudo.

A redução dos níveis de sHLA-G após o parto foi observada em todos os grupos, mas dentre as gestantes com PE sem gravidade os níveis de sHLA-G foram maiores nas gestantes que não fizeram uso de corticoide preventivo. Esse achado é interessante, visto que a região 5'URR do gene *HLA-G* possui um sítio de ligação para corticoides no início do promotor (CASTELLI, 2014), mas que não foi identificado pelo sequenciamento, sendo necessário repetir o experimento para obter uma maior cobertura de sequenciamento. Outro sim, não é possível afastar a existência de fatores de confusão, como uso de cloreto de magnésio como medida preventiva para convulsão, oxigenoterapia, ou outro, que podem modular a regulação de sHLA-G a nível transcricional ou pós-transcricional.

## 9 CONCLUSÃO

Esse estudo contribuiu para a descrição do perfil de gestantes com pré-eclâmpsia atendidas no HC-UFPE, e o reconhecimento de que o protocolo de atendimento estabelecido na instituição tem permitido baixa taxa de complicação materna e fetal durante o curso da doença. A identificação de variantes genéticas associadas ao risco de desenvolvimento das formas graves cria oportunidades para o estudo de moléculas reguladoras, como miRNAs com alvo nesses sítios polimórficos, que permitam no futuro o desenho de fármacos que modulem os níveis de sHLA-G, que possam ser usados na gravidez antes da instalação das alterações estruturais na placenta, desta forma reduzindo ainda mais as complicações materno-fetais ainda associadas as síndromes hipertensivas na gestação.

Além disso, foi comprovada a importância das plaquetas, TGO, TGP e HDL como marcadores de risco para gravidade da doença durante a admissão da paciente no serviço de saúde. Adicionalmente, foi observado que há associação entre a gravidade da PE com o polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G*, entretanto não foi detectada diferença significativa na expressão da forma solúvel do HLA-G com a gravidade da doença, significando que outros fatores estão atuando simultaneamente na expressão do gene.

## REFERÊNCIAS

- AKHTER, A. et al. In vitro up-regulation of HLA-G using dexamethasone and hydrocortisone in first-trimester trophoblast cells of women experiencing recurrent miscarriage. **Tissue Antigens**, v. 80, n. 2, p. 126–135, 2012.
- ALEGRE, E. et al. Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: Longitudinal study during pregnancy. **Human Immunology**, v. 68, n. 8, p. 661–667, 2007.
- ALMEIDA, Renata dos Santos. **Avaliação do papel de moléculas imunológicas solúveis, polimorfismos genéticos e microRNA em leucemia linfoblástica aguda de células t da infância**. 2017. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2017.
- ALMEIDA, Renata Santos et al. MicroRNA Expression Profiles Discriminate Childhood T- from B-acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematological Oncology**, [s.l.], v. 37, n. 1, p.103-112, nov. 2018.
- ALVES, C. et al. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, n. 4, p. 357–363, 2008.
- ALVES, Cinthia Caroline. **Sítios polimórficos do gene HLA-G na asma brônquica**. 2016. 265 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2016.
- AREIA, A. L. et al. Corticotherapy for fetal lung maturation. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 12, n. 4, p. 311–313, 2018.
- BARTSCH, Emily et al. Clinical risk factors for pre-eclampsia determined in early pregnancy: Systematic review and meta-analysis of large cohort studies. **Bmj**, Canadá p. 1-12, 19 abr. 2016.
- BERHAN, Y; ENDESHAW, G. Maternal mortality predictors in women with hypertensive disorders of pregnancy: a retrospective cohort study. **Ethiopian Journal Of Health Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 89-98, 10 fev. 2015.
- BERRY, Casey; ATTA, Mohamed G. Hypertensive disorders in pregnancy. **World Journal of Nephrology**. Baltimore, p. 418-428. set. 2016.
- BRESLIN, Eamonn; KAUFMANN, Angelika; QUENBY, Siobhan. Bilirubin influences the clinical presentation of pre-eclampsia. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [S.L.], v. 170, n. 1, p. 111-113, set. 2013.
- BROSENS I, Puttemans P, Benagiano G. Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. **Am J Obstet Gynecol**, 221(5):437–56, 2019

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2008.

CASTELLI, E. C. et al. Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the HLA-G Gene. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

CASTELLI, E. C. et al. HLA-G variability and haplotypes detected by massively parallel sequencing procedures in the geographically distinct population samples of Brazil and Cyprus. **Molecular Immunology**, v. 83, p. 115–126, 2017.

CASSIANO, Alexandra do Nascimento. **Repercussões da pré-eclâmpsia grave nos defechos perinatais**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2017.

CHAIM SRP, Oliveira SMJV, Kimura AF. Hipertensão arterial na gestação e condições neonatais ao nascimento. **Acta Paul Enfermagem**; 21, 53-8, 2008.

CHAPPELL, Lucy C; A CLUVER, Catherine; KINGDOM, John; TONG, Stephen. Preeclampsia. **The Lancet**, [S.L.], v. 398, n. 10297, p. 341-354, jul. 2021.

CHEN, Yequn *et al.* Increased Uric Acid, Gamma-Glutamyl Transpeptidase and Alkaline Phosphatase in Early-Pregnancy Associated With the Development of Gestational Hypertension and Preeclampsia. **Frontiers In Cardiovascular Medicine**, China, v. 8, n. 15, p. 1-11, 15 out. 2021.

COELHO, Tarcísio Mota *et al.* Proteinúria nas síndromes, hipertensivas da gestação: prognóstico materno e perinatal. **Rev Assoc Med Bras**, São Paulo, v. 2, n. 50, p. 207-213, out. 2014.

DONADIO, M. V. F.; VARGAS, M. H. M. Efeitos do estresse no período gestacional em diferentes modelos experimentais: Uma revisão da literatura. **Revista Brasileira Ciências da Saúde - USCS**, v. 12, n. 41, p. 81–86, 2015.

DONGARWAR, Deepa *et al.* Trends and predictors of eclampsia among singleton and multiple gestations in the United States, 1989–2018. **Pregnancy Hypertension**, Houston, v. 25, p. 56-61, ago. 2021.

DURMANOVA, V.; DROBNY, J.; DLHOPOLCEK, J.; BUCOVA, M.. Analysis of HLA-G 5'URR regulatory polymorphisms in Slovak women with pre-eclampsia. **Bratislava Medical Journal**, [S.L.], v. 122, n. 12, p. 853-860, 2021.

EILAND, E.; NZERUE, C.; FAULKNER, M., Preeclampsia 2012. **Journal Of Pregnancy**. Nashville, p. 1-7. jun. 2012.

GRACIA, Paulino Vigil-De. Pre-eclampsia/eclampsia and hepatic rupture. **International Journal Gynecology e Obstetrics**. Panamá, p. 186-189. 19 jun. 2012.

GUZEL, Ali Irfan; KUYUMCUOGLU, Umur; CELIK, Yusuf. Are maternal and fetal parameters related to perinatal mortality in HELLP syndrome? **Archives Of**

**Gynecology And Obstetrics**, [S.L.], v. 283, n. 6, p. 1227-1232, 6 jun. 2010

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **SÉRIE ORIENTAÇÕES E RECOMENDAÇÕES FEBRASGO. N. 8: Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos**. São Paulo: Connexomm, 2017. 56 p.

FERREIRA, L. C. et al. The maternal 14 bp Ins/Del polymorphism in HLA-G is not associated with preeclampsia risk. **International Journal of Immunogenetics**, v. 44, n. 6, p. 350–355, 2017a.

FERREIRA, L. M. R. et al. HLA-G: At the Interface of Maternal–Fetal Tolerance. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 4, p. 272–286, 2017b.

FRICK, Alexander P. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcomes. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [S.L.], v. 70, p. 92-100, jan. 2021

HALL, John E.; GUYTON, Arthur C., **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151, 2017.

HENTSCHKE, Marta Ribeiro. **Pré-eclâmpsia: Avaliação de aspectos fisiopatológicos e clínicos**. 2014. 270 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Laboratório de Nefrologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

HUNT, Joan S; LANGAT, Daudi L. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. **Current Opinion In Pharmacology**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.462-469, ago. 2009.

HVIID, Thomas Vauvert F., HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Human Reproduction Update**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.209-232, 9 nov. 2016.

KAHHALE, S.; FRANCISCO, R. P. V.; ZUGAIB, M. Pré-eclâmpsia. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 2, p. 226, 2018.

KASRAEIAN, Maryam *et al.* Evaluation of serum biomarkers for detection of preeclampsia severity in pregnant women. **Pakistan Journal Of Medical Sciences**. Paquistão, p. 869-873. Julho, 2018.

KHALIL, A.; SYNGELAKI, A.; MAIZ, N.; ZINEVICH, Y.; NICOLAIDES, K. H.. Maternal age and adverse pregnancy outcome: a cohort study. **Ultrasound In Obstetrics & Gynecology**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 634-643, 24 nov. 2013.

KHALIL, A et al. Incidence of postpartum hypertension within 2 years of a pregnancy complicated by pre-eclampsia: a systematic review and meta analysis. **Bjog: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [S.L.], v. 128, n. 3, p. 495-503, 21 out. 2020.

KINAY, Tugba et al. Severe Preeclampsia versus HELLP Syndrome: maternal and perinatal outcomes at. **Balkan Medical Journal**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 359-363, 10 out. 2015.

KOZIC, Jennifer R, et al. Abnormal Liver Function Tests as Predictors of Adverse Maternal Outcomes in Women With Preeclampsia. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology Canada**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 995-1004, out. 2011.

LODHI, Rashid; ROY, Navanil. Liver function tests in patients of pre-eclampsia in Bhilai, Chhattisgarh, India: a clinical study. **IJRCOG**, [s. /], v. 7, n. 12, p. 1-5, out. 2018.

LONG, P. A.; ABELL, D. A.; BEISCHER, N. A.; Parity and Pre-Eclampsia. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynecology**. Melbourne, p. 203-206. nov. 1979.

LUO, S. et al. Decreased expression of JHDMID in placenta is associated with preeclampsia through HLA-G. **Journal of Human Hypertension**, v. 32, n. 6, p. 448–454, 2018.

MANDÒ, C. et al. Maternal and fetal HLA-G 14 bp gene polymorphism in pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, intrauterine growth restricted and normal pregnancies. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 29, n. 9, p. 1509–1514, 2016.

MARCUS, S. M.; HERINGHAUSEN, J. E. Depression in Childbearing Women: When Depression Complicates Pregnancy. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 1, p. 151–165, 2009.

MARTINS, A. C. S.; SILVA, L. S. Epidemiological profile of maternal mortality. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, p. 677–683, 2018.

MARTINS, A. L. Near miss e mulheres negras. **Saúde e Sociedade**, v. 25, n. 3, p. 573–588, 2016.

MICHAEL, A. E.; PAPAGEORGHIU, A. T. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 5, p. 497–517, 2008.

MISTRY, H. D. et al. Novel expression and regulation of voltage-dependent potassium channels in placentas from women with preeclampsia. **Hypertension**, v. 58, n. 3, p. 497–504, 2011.

MONDADORI, Andressa Grazziotin. **Imunorregulação da pré-eclâmpsia: papel da molécula HLA-G e funções celulares efetoras na gestação**. 2010. 89 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MONTENEGRO, Carlos Antônio Barbosa; REZENDE FILHO, Jorge de. **Obstetrícia Fundamental**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

MOORE, Keith L; II, Arthur F. Dalley. **Anatomia orientada para a clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

MUNAZZA, Bibi et al. Liver function tests in preeclampsia. **J Ayub Med Coll Abbottabad**.

[s. l.], v. 23, n. 4, p. 3-5, dez. 2011.

NATHAN, Hannah *et al.* Maternal and perinatal adverse outcomes in women with pre-eclampsia cared for at facility-level in South Africa: a prospective cohort study. **Journal Of Global Health**. South Africa, p. 1-10. dez. 2018.

NDWIGA, Charity *et al.* Clinical presentation and outcomes of pre-eclampsia and eclampsia at a national hospital, Quenia: A retrospective cohort study. **Plos One**. Kenya, p. 1-15. 5 jun. 2020.

NETO, C. N.; SOUZA, A. S. R.; AMORIM, M. M. R. Pre-eclampsia treatment according to scientific evidence. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 32, n. 9, p. 459–468, 2010.

NILSSON, Emma. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. **An International Journal Of Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 3, n. 111, p. 200-206, mar. 2014.

O'BRIEN, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D, Analysis of the role of HLA-G in preeclampsia. **Human Immunology**, [s.l.], v. 61, n. 11, p.1126-1131, nov. 2000.

PERSSON, G. et al. HLA class Ib in pregnancy and pregnancy-related disorders. **Immunogenetics**, v. 69, n. 8–9, p. 581–595, 2017.

PICCINNI, Marie-pierre et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nature Medicine**, Reino Unido, v. 4, p.1020-1024, set. 1998.

PINTO, Pedro Filipe Viana Ferreira et al. Avaliação da ministração de corticosteroides em situações de suspeita de parto pré-termo iminente: um estudo de coorte retrospectivo em um centro terciário. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [s.l.], v. 37, n. 10, p.467-472, out. 2015.

POLLARD, Jeffrey W., Uterine DCs are essential for pregnancy. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], p.3832-3835, 20 nov. 2008.

PORTO, Iane de Oliveira Pires. **Estrutura e variabilidade da região 3' não-traduzida dos genes HLA-A, HLA-C e HLA-G e perfil de ligação de microRNA**. 2018. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

RACKAITYTE, Elze; HALKIAS, Joanna. Mechanisms of fetal T Cell Tolerance and Immune Regulation. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-12, 9 abr. 2020.

RAJAGOPALAN, S. HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular

remodeling: Implications for reproduction. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 11, n. 5, p. 460–466, 2014.

REDMAN, C. W. Hypertension in pregnancy: the NICE guidelines. *Heart*, v. 97, n. 23, p. 1967-1969, 2011.

ROBERTS, J. M. ET AL. Hypertension in pregnancy; **American College of Obstetricians and Gynecologists**. [s.l: s.n.]. p. 88, 2013.

ROKHAFROOZ, S. et al. Association between HLA-G 14bp Gene Polymorphism and Serum sHLA-G Protein Concentrations in Preeclamptic Patients and Normal Pregnant Women. **Immunological Investigations**, v. 47, n. 6, p. 558–568, 2018.

SAITO, Shigeru; SASAKI, Yasushi; SAKAI, Masatoshi. CD4+CD25high regulatory T cells in human pregnancy. **Journal Of Reproductive Immunology**, [s.l.], v. 65, n. 2, p.111-120, abr. 2005.

SANTIAGO, Mariana Rodrigues. **Expressão das moléculas HLA-G em tecido placentário de mulheres infectadas ou não pelo HIV-1**. 2013. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Enfermagem, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

SHERER, M. L.; POSILLICO, C. K.; SCHWARZ, J. M. The psychoneuroimmunology of pregnancy. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 51, p. 25–35, October, 2018.

SIBAI BM. Diagnosis and management of gestacional hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol*; 102:181-92, 2003.

SIPAK, Olimpia et al, The Relationship between the HLA-G Polymorphism and sHLA-G Levels in Parental Pairs with High-Risk Pregnancy. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 16, n. 9, p. 1546, 2019.

STOJANOVSKA, Violeta; ZENCLUSSEN, Ana Claudia. Innate and Adaptive Immune Responses in HELLP Syndrome. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-15, 15 abr. 2020.

SZEKERES-BARTHO, J.; HALASZ, M.; PALKOVICS, T. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

THOM, E. A. et al. Antenatal Betamethasone for Women at Risk for Late Preterm Delivery. **The new england journal medicine**, 2016.

VANDEKERCKHOV, Mélanie; GUIGNARD, Mélanie; CIVADIER, Marie-Sophie. Impact of maternal age on obstetric and neonatal morbidity: a retrospective cohort study. **Bmc Pregnancy And Childbirth**, Paris, v. 732, n. 21, p. 2-7, mar. 2021.

VIANNA, Priscila. **Imunorregulação da Gestação: Rumo ao sucesso**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

VAKARANAM, Sapna; BHONGIR, Aparna; PATLOLLA, Dakshayani; CHINTAPALLY, Rekha. Study of serum uric acid and creatinine in hypertensive disorders of pregnancy. **International Journal Of Medical Science And Public Health**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 1424, 2015.

WATANABE, Maria Angelica Ehara et al. Gestação: Um desafio imunológico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.147-162, 21 set. 2014.

WERTASCHNIGG, Dagmar et al. Prenatal screening for pre-eclampsia: Frequently asked questions. **Australian And New Zealand Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, [s.l.], p.1-7, 22 maio 2019.

Y, Padma; B, Aparna; B, Kalpana; V, Ritika; R, Sudhakar. Renal markers in normal and hypertensive disorders of pregnancy in Indian women: a pilot study. **International Journal Of Reproduction, Contraception, Obstetrics And Gynecology**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 514, 2013.

Wilczyn'ski, J.R. Th1/Th2 cytokines balance—yin and yang of reproductive immunology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**; 122:136–143, 2005.

XU, Xiuxiu; ZHOU, Yonggang; WEI, Haiming. Roles of HLA-G in the Maternal-Fetal Immune Microenvironment. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, p. 1-11, 22 out. 2020.

ZHU, Dan; CHEN, Weiyu; PAN, Yuchen; LI, Tingcui; CUI, Ming; CHEN, Baoxia. The correlation between maternal age, parity, cardiac diastolic function and occurrence rate of pre-eclampsia. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-9, 23 abr. 2021.

## APENDICE A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos a senhora para participar como voluntária da pesquisa: *Imunorregulação da pré-eclâmpsia: polimorfismo da região promotora do gene HLA-G e resposta ao uso de corticoide durante tratamento da pré-eclâmpsia*, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Camila Rodrigues de Melo Barbosa, residente na Avenida Saldanha Marinho, 410 CEP 51190-660. Se a Sra sentir necessidade de entrar em contato com a pesquisadora responsável, poderá encontrá-lo no telefone 2101-2618.

Esta pesquisa está sob a orientação da Dra. Norma Lucena Cavalcante Licínio da Silva Telefone: 2101-2618 e-mail: nlucena@cpqam.fiocruz.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concordar com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas nos locais indicados e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você está livre para decidir participar ou recusar participar da pesquisa. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

Este estudo envolverá gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia no momento que chegar para se internar no Hospital das Clínicas e que não tenham feito nenhuma dose de corticoide (medicação que é usada para amadurecer o pulmão do feto), e os resultados serão comparados com os de gestantes sem nenhuma complicação de saúde. O objetivo deste estudo é esclarecer se o uso do corticoide durante o tratamento da pré-eclâmpsia está relacionado ao aumento dos níveis sanguíneos e placentário de uma proteína chamada HLA-G, e se esse aumento depende da dose dessa medicação, ajudando a entender quais os fatores que podem influenciar no desenvolvimento da doença, gerando, além de conhecimento científico, a possibilidade de utilização dos resultados desta pesquisa como marcadores de gravidade da pré-eclâmpsia, diminuindo complicações tanto das gestantes quanto de seus recém-nascidos.

Para responder essas perguntas, será necessário que a senhora responda a um questionário que será feito pela pesquisadora responsável pelo estudo, nos autorize a consultar seu prontuário, além de nos doar um pouco do seu sangue em diferentes momentos durante seu internamento, como também de sangue do cordão umbilical. O sangue será coletado nos seguintes momentos: 1- no momento que a Sra. for internada; 2- Após 24h depois da primeira dose de corticoide; 3- no momento do parto; e 4- 24h após o parto, antes da alta hospitalar. A quantidade de sangue em cada coleta será o equivalente a 4 ml (uma colher de sobremesa), armazenado em um tubo contendo substância conservante para podermos estudar sua característica genética e compará-la com pacientes que não tem pré-eclâmpsia. Além das amostras sanguíneas será necessário também um pequeno pedaço de aproximadamente 4 cm<sup>3</sup> (equivalente à 2 uvas) de placenta, que será coletado após o nascimento do seu bebê,

juntamente com o sangue do cordão umbilical (aproximadamente 4ml ou uma colher de sobremesa, como dito anteriormente).

A coleta do fragmento da placenta será realizado dentro do bloco obstétrico logo após o nascimento do seu bebê, e esse momento não trará nenhum tipo de desconforto ou dor para a senhora pois só será coletado após a saída da placenta de seu útero. Essa coleta tem o objetivo de estudar as mesmas moléculas que serão estudadas no seu sangue.

Em relação aos possíveis riscos, desconfortos e benefícios para a senhora, gostaríamos de mencionar que as amostras de sangue para esta pesquisa serão coletadas de seu braço durante a coleta de rotina do serviço para acompanhamento do tratamento que já serão feitas durante sua internação, não sendo necessário coleta de amostras além da necessária durante sua permanência no hospital, sendo utilizado material descartável, permitindo a coleta de várias amostras de sangue com apenas uma punção venosa (furada) por vez. Este procedimento pode trazer algum incômodo no momento da punção além de extravasamento de sangue, que será minimizado por pressão pós procedimento feito pelo profissional que realizará a coleta e compressas de gelo, se for necessário.

Os resultados deste estudo podem levar alguns anos para serem alcançados, por isso qualquer benefício decorrente de seus resultados não serão imediatos, porém depois de alcança-los, ajudarão a entender as causas da doença, fazer diagnóstico precoce e melhorar o tratamento de uma grande parcela de mulheres que podem desenvolver pré-eclâmpsia no futuro, inclusive a Sra. em uma futura gestação.

Caso você desista de participar, o atendimento neste hospital continuará ocorrendo da mesma forma. Você não gastará e nem ganhará nenhum dinheiro para participar deste estudo e serão garantidos o sigilo e anonimato do seu nome e do seu filho, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Todas as informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em arquivos próprios para esses tipos de dados sob a responsabilidade do pesquisador no endereço acima informado, pelo período de no mínimo 5 anos.

A Sra. poderá solicitar, se assim quiser, o relatório final da pesquisa que fez parte. Também, cópias de todos os resultados dos exames complementares realizados nesta pesquisa poderão ser solicitadas ao pesquisador.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do Instituto Aggeu Magalhães no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670- 420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 08:00 – 12:00 h / 13:00 – 15h. O CEP é responsável pela avaliação e

acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

\_\_\_\_\_  
(assinatura da pesquisadora)

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIA**

Eu, \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo *Imunorregulação da pré-eclâmpsia: polimorfismo da região promotora do gene HLA-G e resposta ao uso de corticoide durante tratamento da pré-eclâmpsia*, como voluntária. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade como interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste hospital. Autorizo também a utilização das amostras coletadas para esta pesquisa:  
( ) com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE;  
( ) dispenso a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura da participante: \_\_\_\_\_

Impressão  
digital

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite da voluntária em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):**

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:



34 – Genitor é parceiro fixo? 1. Sim 2. Não		35 – Tempo de relacionamento com o genitor ( meses):	
36 – Já usou anticoncepcional? 1. Sim 2. Não		36.1 – Tempo (meses)?	
37 – Gestação: _____	38 - Para: _____	39 - P. Vaginais: _____	42 – Gestações anteriores do mesmo genitor? 1. Sim 2. Não
40 – P. Cesárea: _____	41 – Abortos: 1. Não 2. Sim	41.1 espontâneos: _____ 41.2 provocados: _____	
43 – Classificação. sanguínea/RH:		44 – Prematuros: 1. Sim 2. Não	44.1 – quantas semanas? _____
45 – Pré-natal: 1. Sim 2. Não	46 – N° de consultas:	47 – Mês início:	48 – DUM:  49 – DPP:

VI – CONDIÇÃO CLÍNICA / SINTOMAS / PRÉ-ECLÂPSIA			
50 – Diagnóstico na admissão:		51 - IG na admissão:	
52 – Pressão arterial na admissão:		53– Proteinúria de fita:	
Medicação	Data de início	Dose	
54 -	54.1 -	54.2-	
55 -	55.1 -	55.2 -	
56 - Início de MgSO4: data:		57 – N° de Fases	
58 - Início corticoterapia: data:		59 - N° de doses:	60 – Corticoide usado:
Apresentou algum dos sintomas a seguir (gestação atual):			
61 - Edema em MMII:	1. Sim 2. Não	67 - Dispneia:	1. Sim 2. Não
62 - Escotomas:	1. Sim 2. Não	68 - Turvação visual:	1. Sim 2. Não
63 - Hemorragia:	1. Sim 2. Não	69 - Petéquias	1. Sim 2. Não
64 - Epigastralgia	1. Sim 2. Não	70 - Dor torácica	1. Sim 2. Não
65 - Convulsão	1. Sim 2. Não	71 – Enjoo / vômito	1. Sim 2. Não
66 – Cefaleia:	1. Sim 2. Não	72 - Outros	1. Sim 2. Não Qual:
VII - EXAMES DE IMAGEM:			
73 - USG obstétrica 1: 1. Sim 2. Não	73.1-data: (___/___/___)	73.2 – Achados	
74 - Raio X de tórax: 1. Sim 2. Não	74.1-data: (___/___/___)	74.2 - Achados:	

VIII - HISTÓRIA DO PARTO E DADOS DO RECÉM-NASCIDO			
<b>75 - Data do parto:</b>	<b>76 - Hora:</b>	<b>77 - Tipo de parto:</b> 1. Vaginal 2. Fórceps 3. Cesárea	
<b>78 - Sexo:</b> 1. Masculino 2. Feminino	<b>79 - Tempo de bolsa rota (em horas):</b>	<b>80 - Impregnação por mecônio?</b> 1. Sim 2. Não	
<b>81 - Líquido amniótico:</b> 1. Claro sem grumos 2. Claro com grumos 3. Sanguinolento 4. Purulento 5. Mecônio fluido 6. Mecônio espesso	<b>82 - Placenta:</b> 1. Sem alterações 2. Alteração, qual? _____	<b>83- Anestesia:</b> 1. Não 2. Regional 3. Geral 4. Analgesia	
<b>84 - Peso ao nascer:</b>	<b>85 - Idade gestacional:</b>	<b>86 - Gemelar:</b> 1. Sim 2. Não	<b>87 - Apgar:</b>
<b>88 - Mal formações:</b> 1. Sim 2. Não	<b>89 - Reanimação neonatal:</b> 1. Sim 2. Não	<b>90 - Ventilação por pressão:</b> 1. Sim 2. Não	
<b>88.1 - Quais:</b> _____ _____ _____	<b>91 - IOT:</b> 1. Sim 2. Não	<b>92 - Aspiração de Vias aéreas:</b> 1. Sim 2. Não	
<b>93 - Classificação Sanguínea/Rh do RN:</b>			

<b>IX PERFIL LABORATORIAL GENITORA – ROTINA PE</b>				
	Data	Data	Data	Data
<b>94 - Hemoglobina</b>				
<b>95 - Hematócrito</b>				
<b>96 - Leucograma</b>				
<b>97 - Plaquetas</b>				
<b>98 - Ureia</b>				
<b>99 - Creatinina</b>				
<b>100 - Ácido úrico</b>				
<b>101 - Ast / TGO</b>				
<b>102 - Alt / TGP</b>				
<b>103 - Bilirrubina total</b>				
<b>104 - B. direta</b>				
<b>105 - B. indireta</b>				
<b>106 - DHL</b>				

<b>TESTE RÁPIDO/ SOROLOGIAS</b>		
	DATA	RESULTADO
<b>107 - HIV</b>		
<b>108 - VDRL</b>		
<b>109 - HEP B</b>		
<b>110 - TOXO</b>		
<b>111 - RUBÉOLA</b>		
<b>112 - CMV</b>		

## APENDICE C RESULTADO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis categóricas - Análise estatística dos dados sociodemográficos e clínicos das pacientes do estudo.

Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>I – IDENTIFICAÇÃO E DADOS SÓCIOECONÔMICOS</b>							
<b>Cor</b>							
1. Branca	2	18,18	6	6,74	3	6,52	0,6319
2. Preta	1	9,09	8	8,99	4	8,70	
3. Parda	8	72,73	75	84,27	39	84,78	
<b>Estado Civil</b>							
1. Solteira	3	25,00	28	29,79	15	30,61	0,4131
2. Casada/União estável	9	75,00	66	70,21	32	65,31	
3. Separada	0	0,00	0	0,00	2	4,08	
<b>Escolaridade</b>							
2. 1ª a 4ª série	0	0,00	13	13,54	4	8,33	0,4869
3. 5ª a 8ª série	5	41,67	21	21,88	14	29,17	
4. Médio	6	50,00	54	56,25	28	58,33	
5. Superior incompleto	0	0,00	5	5,21	2	4,17	
6. Superior completo	1	8,33	3	3,12	0	0,00	
<b>Renda Mensal</b>							
1. Nenhuma renda	5	41,67	40	43,96	23	47,92	0,7370
2. Até 2 salários mínimos	3	25,00	34	37,36	17	35,42	
3. De 2 a 4 salários mínimos	4	33,33	17	18,68	8	16,67	
Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>II HÁBITOS</b>							
<b>Fumante</b>							
1. Sim	1	8,33	8	8,42	2	4,26	0,6040
2. Não	11	91,67	87	91,58	45	95,74	
<b>Etilismo</b>							
1. Sim	2	16,67	18	18,95	8	16,33	0,9453
2. Não	10	83,33	77	81,05	41	83,67	
<b>Drogas Ilícitas</b>							
1. Sim	0	0,00	2	2,11	1	2,08	1,0000
2. Não	12	100,00	93	97,89	47	97,92	

Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>III - HISTÓRICO PESSOAL</b>							
<b>Diabetes</b>							
1. Sim	2	16,67	2	2,11	3	6,12	
2. Não	10	83,33	93	97,89	46	93,88	<b>0,0475</b>
<b>HAS Antes Gestação</b>							
1. Sim	5	41,67	5	5,26	12	24,49	
2. Não	7	58,33	90	94,74	37	75,51	<b>0,0001</b>
<b>Pré Eclampsia</b>							
1. Sim	4	33,33	17	17,89	5	10,20	
2. Não	8	66,67	78	82,11	44	89,80	0,1385
<b>Eclampsia</b>							
1. Sim	0	0,00	2	2,15	1	2,04	
2. Não	12	100,00	91	97,85	48	97,96	1,0000
<b>Gemelaridade</b>							
1. Sim	0	0,00	2	2,13	3	6,12	
2. Não	12	100,00	92	97,87	46	93,88	0,5604
<b>DST</b>							
1. Sim	0	0,00	7	7,45	2	4,08	
2. Não	12	100,00	87	92,55	47	95,92	0,7584
<b>Asma</b>							
1. Sim	0	0,00	2	2,11	1	2,04	
2. Não	12	100,00	93	97,89	48	97,96	1,0000

Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>IV - HISTÓRICO FAMILIAR</b>							
<b>Hipertensão</b>							
1. Sim	9	75,00	79	83,16	41	83,67	0,7119
2. Não	3	25,00	16	16,84	8	16,33	
<b>Diabetes</b>							
1. Sim	11	91,67	89	93,68	43	87,76	0,3750
2. Não	1	8,33	6	6,32	6	12,24	
<b>Pre Eclampsia</b>							
1. Sim	6	50,00	37	40,22	26	53,06	0,3430
2. Não	6	50,00	55	59,78	23	46,94	
<b>Eclampsia</b>							
1. Sim	2	16,67	1	1,12	0	0,00	<b>0,0174</b>
2. Não	10	83,33	88	98,88	47	100,00	
<b>Doença Cardiovascular</b>							
1. Sim	0	0,00	3	3,33	1	2,13	1,0000
2. Não	12	100,00	87	96,67	46	97,87	

Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>V - HISTÓRICO SEXUAL / REPRODUTIVO / GESTACIONAL</b>							
<b>Genitor Parceiro Fixo</b>							
1. Sim	12	100,00	90	93,75	47	95,92	0,8526
2. Não	0	0,00	6	6,25	2	4,08	
<b>Usou Anticoncepcional</b>							
1. Sim	7	58,33	58	62,37	26	53,06	0,5794
2. Não	5	41,67	35	37,63	23	46,94	
<b>Gestação</b>							
Apenas 1	2	16,67	42	43,75	23	46,94	0,1515
2 ou 3	9	75,00	37	38,54	21	42,86	
4+	1	8,33	17	17,71	5	10,20	
<b>Para</b>							
0	5	41,67	48	50,00	29	59,18	0,2240
1 ou 2	7	58,33	31	32,29	15	30,61	
3+	0	0,00	17	17,71	5	10,20	
<b>Tipo de Parto</b>							
Não teve	5	41,67	48	50,00	28	57,14	0,2327
Cesarea	5	41,67	22	22,92	7	14,29	
Vaginal	2	16,67	15	15,62	12	24,49	
Vaginal + Cesarea	0	0,00	11	11,46	2	4,08	
<b>Abortos</b>							
1. Sim	5	45,45	19	20,21	11	22,92	0,1945
2. Não	6	54,55	75	79,79	37	77,08	
<b>Gestacoes_A_M_Genitor</b>							
1. Sim	7	70,00	32	52,46	15	55,56	0,6525
2. Não	3	30,00	29	47,54	12	44,44	
<b>Prematuros</b>							
1. Sim	1	9,09	5	5,56	1	2,08	0,4459
2. Não	10	90,91	85	94,44	47	97,92	
<b>Pré Natal</b>							
1. Sim	12	100,00	92	95,83	47	97,92	0,7767
2. Não	0	0,00	4	4,17	1	2,08	

Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>VI - CONDIÇÃO CLÍNICA/SINTOMAS PRÉ-ECLÂMPسيا</b>							
<b>Edema MMII</b>							
1. Sim	12	100	90	93,75	43	87,76	0,3374
2. Não	0	0	6	6,25	6	12,24	
<b>Escotomas</b>							
1. Sim	6	50	25	26,88	3	6,25	<b>0,0006</b>
2. Não	6	50	68	73,12	45	93,75	
<b>Hemorragia</b>							
1. Sim	2	16,67	0	0	0	0	<b>0,0057</b>
2. Não	10	83,33	93	100	48	100	
<b>Epigastralgia</b>							
1. Sim	9	75	24	25,53	4	8,16	<b>0,0124</b>
2. Não	3	25	70	74,47	45	91,84	
<b>Convulsão</b>							
1. Sim	1	8,33	0	0	0	0	0,0795
2. Não	11	91,67	91	100	48	100	
<b>Cefaleia</b>							
1. Sim	12	100	91	94,79	35	71,43	<b>0,0002</b>
2. Não	0	0	5	5,21	14	28,57	
<b>Dispneia</b>							
1. Sim	1	8,33	6	6,45	2	4,35	0,7577
2. Não	11	91,67	87	93,55	44	95,65	
<b>Turvação Visual</b>							
1. Sim	5	41,67	11	11,96	1	2,13	<b>0,0014</b>
2. Não	7	58,33	81	88,04	46	97,87	
<b>Enjoo / Vômito</b>							
1. Sim	6	50	42	45,16	14	29,79	0,1625
2. Não	6	50	51	54,84	33	70,21	

Variáveis	Diagnóstico Final						valor de p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>VIII - HISTÓRIA DO PARTO E DADOS DO RECÉM-NASCIDO</b>							
<b>Tipo de Parto</b>							
1. Vaginal	1	8,33	19	20,21	25	51,02	<b>0,0002</b>
2. Cesárea	11	91,67	75	79,79	24	48,98	
<b>Sexo</b>							
1. Masculino	6	50	45	47,87	27	56,25	0,6263
2. Feminino	6	50	49	52,13	21	43,75	
<b>Impregnação</b>							
1. Sim	1	9,09	2	2,27	1	2,04	0,3637
2. Não	10	90,91	86	97,73	48	97,96	
<b>Baixo Peso</b>							
1. < 2500	6	50	13	13,83	5	10,2	<b>0,0066</b>
2. ≥ 2500	6	50	81	86,17	44	89,8	
<b>Reanimação Neonatal</b>							
1. Sim	2	18,18	2	2,15	0	0	<b>0,0336</b>
2. Não	9	81,82	91	97,85	49	100	
<b>Ventilação Pressão</b>							
1. Sim	5	45,45	12	12,9	3	6,12	<b>0,0053</b>
2. Não	6	54,55	81	87,1	46	93,88	
<b>IOT</b>							
1. Sim	1	9,09	0	0	1	2,04	<b>0,0511</b>
2. Não	10	90,91	93	100	48	97,96	
<b>Aspiração Vias Aéreas</b>							
1. Sim	6	54,55	16	17,98	3	6,25	<b>0,0014</b>
2. Não	5	45,45	73	82,02	45	93,75	

**Variáveis contínuas - Análise estatística dos dados clínicos das pacientes do estudo**

Variável	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	p1	p2
<b>I – IDENTIFICAÇÃO E DADOS SÓCIOECONÔMICOS</b>									
<b>Idade</b>	157	15,00	45,00	27,29	27,00	6,72	0,54		
Síndrome Hellp	12	19,00	38,00	28,50	30,00	6,19	1,79		
PE grave	96	15,00	42,00	27,57	27,50	6,76	0,69		
PE sem gravidade	49	17,00	45,00	26,43	25,00	6,80	0,97	0,92370,5080	
<b>II HÁBITOS</b>									
<b>Peso</b>	152	47,00	145,00	81,16	79,00	15,24	1,24		
Síndrome Hellp	12	58,00	112,00	84,58	86,00	17,16	4,95		
PE grave	93	49,00	124,00	80,56	79,00	14,59	1,51		
PE sem gravidade	47	47,00	145,00	81,48	79,00	16,19	2,36	0,60380,6840	
<b>Altura</b>	150	1,45	1,78	1,61	1,61	0,06	0,00		
Síndrome Hellp	12	1,46	1,78	1,61	1,62	0,09	0,03		
PE grave	92	1,45	1,75	1,60	1,60	0,06	0,01		
PE sem gravidade	46	1,47	1,73	1,62	1,63	0,06	0,01	0,13770,3040	

Variável	N	Min	Max	Média	Median		EP	p1	p2
					a	Desvio			
<b>V - HISTÓRICO SEXUAL / REPRODUTIVO / GESTACIONAL</b>									
<b>Tempo de Relacionamento</b>									
	155	0,17	29,00	5,25	3,00	5,12	0,41		
Síndrome Hellp	12	0,83	16,00	5,99	4,00	4,49	1,30		
PE grave	95	0,17	20,00	5,13	3,00	4,85	0,50		
PE sem gravidade	48	0,25	29,00	5,29	3,00	5,84	0,84	0,2715	0,8630
<b>Tempo de Uso Anticoncepcional</b>									
	88	0,08	20,00	6,00	5,00	4,96	0,53		
Síndrome Hellp	7	0,17	20,00	7,45	8,00	6,99	2,64		
PE grave	55	0,08	16,00	5,43	5,00	4,02	0,54		
PE sem gravidade	26	0,25	20,00	6,81	5,50	6,08	1,19	0,0177	0,8095
<b>Gestação</b>									
	157	1,00	14,00	2,31	2,00	1,96	0,16		
Síndrome Hellp	12	1,00	4,00	2,25	2,00	0,87	0,25		
PE grave	96	1,00	14,00	2,42	2,00	2,22	0,23		
PE sem gravidade	49	1,00	9,00	2,12	2,00	1,58	0,23	0,0003	0,5459
<b>Para</b>									
	157	0,00	8,00	0,95	0,00	1,33	0,11		
Síndrome Hellp	12	0,00	2,00	0,75	1,00	0,75	0,22		
PE grave	96	0,00	5,00	1,06	0,50	1,34	0,14		
PE sem gravidade	49	0,00	8,00	0,78	0,00	1,40	0,20	0,1	0,4080
<b>Parto Vaginal</b>									
	157	0,00	8,00	0,61	0,00	1,40	0,11		
Síndrome Hellp	12	0,00	2,00	0,25	0,00	0,62	0,18		
PE grave	96	0,00	8,00	0,71	0,00	1,56	0,16		
PE sem gravidade	49	0,00	7,00	0,51	0,00	1,17	0,17	0,0010	0,6872
<b>Parto Cesárea</b>									
	157	0,00	3,00	0,41	0,00	0,71	0,06		
Síndrome Hellp	12	0,00	1,00	0,42	0,00	0,51	0,15		
PE grave	96	0,00	3,00	0,48	0,00	0,75	0,08		
PE sem gravidade	49	0,00	3,00	0,27	0,00	0,64	0,09	0,1748	0,2270

Variável	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	p1	p2
<b>VI - CONDIÇÃO CLÍNICA/SINTOMAS PRÉ-ECLÂMPZIA</b>									
	15								
<b>IG Admissão</b>	7	24,00	41,00	37,30	38,00	3,34	0,27		
Síndrome Hellp	12	25,00	39,00	34,08	35,50	4,76	1,37		
PE grave	96	24,00	41,00	37,38	38,00	3,16	0,32		
PE sem gravidade	49	26,00	41,00	37,94	39,00	2,87	0,41	0,061	
	15							8	<b>0,0012</b>
<b>PA Sistólica Adm</b>	6	116,00	200,00	156,19	160,00	17,59	1,41		
Síndrome Hellp	12	140,00	180,00	166,67	170,00	13,03	3,76		
PE grave	95	116,00	200,00	159,38	160,00	18,02	1,85		
PE sem gravidade	49	116,00	200,00	147,45	140,00	14,10	2,01	0,097	
	15							2	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>PA Diastólica Adm</b>	6	80,00	130,00	100,26	100,00	11,80	0,94		
Síndrome Hellp	12	80,00	120,00	104,17	100,00	13,79	3,98		
PE grave	95	80,00	120,00	101,26	100,00	11,23	1,15		
PE sem gravidade	49	80,00	130,00	97,35	90,00	12,04	1,72	0,596	
								0	0,0820

Variável	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	p1	p2
<b>VIII - HISTÓRIA DO PARTO E DADOS DO RECÉM-NASCIDO</b>									
<b>Peso</b>	155	560	4600	3070,5	3215	768,7	61,74		
Síndrome Hellp	12	560	4560	2405,4	2610	1347,6	389,01		
PE grave	94	1020	4555	3072,5	3090	668,66	68,97		
PE sem gravidade	49	560	4600	3229,7	3250	690,59	98,66	<b>0,0247</b>	<b>0,0451</b>
<b>Idade Gestacional</b>	151	25	41	37,69	38	2,77	0,23		
Síndrome Hellp	12	25	40	34,25	35,5	4,75	1,37		
PE grave	90	31	41	37,95	38	2,04	0,22		
PE sem gravidade	49	26	41	38,05	39	2,82	0,4	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,0055</b>

Variável	Tempo	N	Min	Max	Média	Mediana	p
<b>IX PERFIL LABORATORIAL DA GENITORA</b>							
<b>Hemoglobina</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	9,9	16,8	12,9	12,8	0,0002
Síndrome Hellp	T2	10	6,3	12,7	9,4	9,6	
PE grave	T1	93	9,9	15,5	12,9	12,9	< 0,0001
PE grave	T2	39	6,8	14,4	10,8	11,1	
PE sem gravidade	T1	48	10,7	120,6	15,3	12,8	0,0244
PE sem gravidade	T2	10	8,0	13,8	11,1	11,6	
<b>Hematócrito</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	30,0	50,7	38,5	37,7	0,0001
Síndrome Hellp	T2	10	19,0	38,0	27,9	28,4	
PE grave	T1	92	29,6	45,4	38,8	39,1	< 0,0001
PE grave	T2	39	21,2	43,0	32,5	33,0	
PE sem gravidade	T1	48	32,3	49,5	38,8	38,0	0,0178
PE sem gravidade	T2	10	23,5	39,3	33,7	34,8	
<b>Plaquetas</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	96.000	322.000	186916,7	173000,0	0,4316
Síndrome Hellp	T2	10	108.000	289.000	155600,0	137000,0	
PE grave	T1	94	49.000	400.000	232478,7	230000,0	0,0583
PE grave	T2	39	77.000	588.000	261435,9	251000,0	
PE sem gravidade	T1	48	118.000	427.000	236041,7	225500,0	0,9219
PE sem gravidade	T2	10	101.000	1.698.000	350400,0	204000,0	
<b>Ureia</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	17,4	34,9	24,4	22,5	0,1490
Síndrome Hellp	T2	9	19,1	34,2	29,54	31,5	
PE grave	T1	91	0,5	46,8	19,0	18,3	0,0016
PE grave	T2	32	14,6	52,7	26,5	25,7	
PE sem gravidade	T1	47	9,3	36,9	19,2	18,1	0,8457
PE sem gravidade	T2	10	14,8	43,2	23,9	22,45	
<b>Creatinina</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	0,4	0,9	0,68	0,75	0,0150
Síndrome Hellp	T2	10	0,6	1,4	0,9	0,8	
PE grave	T1	91	0,2	1,6	0,64	0,6	0,0048
PE grave	T2	32	0,5	2,0	0,8	0,7	
PE sem gravidade	T1	47	0,4	0,9	0,57	0,6	0,0340
PE sem gravidade	T2	10	0,5	1,0	0,7	0,7	
<b>Ácido Úrico</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	3,0	11,3	6,2	6,0	0,1073
Síndrome Hellp	T2	9	3,3	8,4	5,7	5,5	
PE grave	T1	91	2,2	8,4	5,0	4,9	0,0067
PE grave	T2	28	2,8	8,5	4,9	4,7	
PE sem gravidade	T1	47	2,5	40,9	5,4	4,4	0,3008
PE sem gravidade	T2	9	4,1	6,5	5,0	5,2	

Variável	Tempo	N	Min	Max	Média	Mediana	p
<b>IX PERFIL LABORATORIAL DA GENITORA</b>							
<b>TGO</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	8,1	265,9	77,4	37,0	
Síndrome Hellp	T2	10	19,0	155,3	44,7	31,6	
PE grave	T1	92	10,0	429,2	30,1	20,6	1,0000
PE grave	T2	31	10,6	79,8	26,5	24,1	
PE sem gravidade	T1	46	9,3	39,9	19,3	17,8	0,9102
PE sem gravidade	T2	9	10,8	42,4	24,3	22,6	
<b>TGP</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	7,7	278,9	72,3	47,2	0,1602
Síndrome Hellp	T2	10	11,6	113,0	44,1	31,2	
PE grave	T1	91	4,6	260,2	19,4	12,6	0,5632
PE grave	T2	32	1,0	93,4	23,2	14,8	
PE sem gravidade	T1	46	5,6	64,9	14,1	11,6	0,2031
PE sem gravidade	T2	9	7,0	67,9	23,0	15,6	
<b>BT</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	0,3	1,4	0,6	0,4	0,0355
Síndrome Hellp	T2	10	0,2	0,6	0,3	0,3	
PE grave	T1	91	0,1	1,4	0,4	0,3	0,2233
PE grave	T2	30	0,1	1,8	0,4	0,3	
PE sem gravidade	T1	47	0,1	1,3	0,4	0,3	0,8551
PE sem gravidade	T2	9	0,1	1,7	0,4	0,2	
<b>BD</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	0,1	0,9	0,2	0,2	0,1967
Síndrome Hellp	T2	10	0,0	0,3	0,1	0,1	
PE grave	T1	86	0,0	1,0	0,1	0,1	0,6883
PE grave	T2	30	0,0	1,1	0,2	0,1	
PE sem gravidade	T1	47	0,0	0,7	0,2	0,1	0,4227
PE sem gravidade	T2	9	0,1	0,5	0,2	0,1	
<b>BI</b>							
Síndrome Hellp	T1	12	0,1	0,6	0,3	0,3	0,0225
Síndrome Hellp	T2	10	0,1	0,3	0,2	0,2	
PE grave	T1	87	0,0	0,9	0,3	0,2	0,0739
PE grave	T2	30	0,1	0,7	0,2	0,2	
PE sem gravidade	T1	47	0,1	0,9	0,3	0,2	0,6716
PE sem gravidade	T2	9	0,0	1,2	0,3	0,1	

	Pré eclâmpsia sem gravidade		Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Valor de p
	N	%	N	%	N	%	
Pré Termo	8	17,39	8	66,67	37	39,78	
Termo	38	82,61	4	33,33	56	60,22	0,0016

### Variáveis contínuas - Análise estatística dos dados de sHLA-G

Variável	N	Min	Max	Média	Mediana	Desvio	EP	valor de p1	valor de p2
HLAG_Admissao									
Termo	85	2.686	89.958	17,01	14,59	11,77	1,28	< 0,0001	0,1568
Pré Termo	49	3,17	36.333	14,14	13,32	7,46	1,07	0,0042	
HGLA_pos_parto									
Termo	65	0	35.502	4,59	2,67	6,63	0,82	< 0,0001	0,0621
Pré Termo	36	0,001	13.249	5,25	5,55	4,29	0,72	0,0082	
Termo									
HLAG_Admissao	62	3,048	89,958	17,56	15,15	12,95	1,64	< 0,0001	< 0,0001
HGLA_pos_parto	62	0	35,502	4,67	2,67	6,78	0,86	< 0,0001	
Pré Termo									
HLAG_Admissao	35	3,688	36,333	14,65	13,32	7,48	1,26	0,0083	< 0,0001
HGLA_pos_parto	35	0,001	13,249	5,33	5,55	4,32	0,73	0,0083	
Geral									
HLAG_Admissao	97	3,048	89,958	16,51	14,03	11,33	1,15	< 0,0001	< 0,0001
HGLA_pos_parto	97	0	35,502	4,91	4,11	5,99	0,61	< 0,0001	

## APÊNDICE D ARTIGO PARA SUBMISSÃO

### IMUNORREGULAÇÃO DA PRÉ-ECLÂMPsia: POLIMORFISMO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *HLA-G* E NÍVEIS SOROLÓGICOS DE sHLA-G ASSOCIADOS A GRAVIDADE DA DOENÇA.

Camila Rodrigues de Melo Barbosa<sup>1</sup>, Paulin Sonon<sup>1</sup>, Norma Lucena-Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia do Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife PE, Brasil

<sup>2</sup> Hospital de Ensino, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, PE, Brasil

#### RESUMO

A pré-eclâmpsia é a síndrome hipertensiva gestacionais com repercussões nas mulheres e nos recém-nascidos a identificação de fatores genéticos relacionados a modulação da resposta imune contribuem para a avaliação da susceptibilidade e gravidade da doença e o desenvolvimento de estratégias de prevenção, detecção precoce e terapêuticas. Apesar do conhecimento do efeito terapêutico do uso de glicocorticoides no período gestacional e da presença de elemento genético de resposta ao corticoide no promotor do gene *HLA-G*, ainda não existe relatos sobre a associação de polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G* com os níveis de HLA-G em resposta ao uso de corticoide no tratamento da pré-eclâmpsia. Este estudo irá esclarecer se o polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G* e os níveis sorológicos de sHLA-G está associado ao aumento da gravidade da doença. 151 gestantes participaram da pesquisa, onde foi realizado avaliação epidemiológica, estudo genético e imunológico. 61,5% das pacientes tinham PE grave, 30,4% PE sem gravidade e 7,6% síndrome hellp. Na admissão as gestantes com síndrome hellp apresentaram alteração nas taxas de plaquetas ( $p=0,0367$ ), ureia (0,0478), ácido úrico (0,0061), TGO ( $p<0,0001$ ), TGP ( $p<0,0001$ ) e DHL ( $p<0,0001$ ), com valores superiores aos da PE grave e PE sem gravidade demonstrando risco de desenvolver formas graves. A análise genética do promotor do gene *HLA-G* para o sítio -486 A/A possivelmente está relacionada ao aumento do risco de desenvolver PE e a presença do alelo -1138 A está associada a um risco 3 vezes maior de apresentar a forma grave da doença. Foi identificado que o haplótipo *HLA-G* -509CC/-400GG/-391GG foi associado a proteção contra a doença ( $p=0,0184$ ), enquanto o *HLA-G* -1138AA/-400GG está relacionado a formas graves ( $p=0,0246$ ). Foi observado maiores níveis de sHLA-G na admissão em relação ao pós-parto, e não houve diferença nos níveis de sHLA-G nas pacientes com PE grave, incluindo a síndrome hellp nas gestantes que usaram corticoide. Este estudo ressaltou a importância das plaquetas, ureia, ácido úrico, TGO, TGP e HDL como marcadores de risco para gravidade da doença durante a admissão da paciente no serviço de saúde.

**Palavras Chave:** Pré-eclâmpsia, Antígenos HLA-G, Glicocorticóides

#### ABSTRACT

Preeclampsia is a gestational hypertensive syndrome with repercussions on women and newborns. The identification of genetic factors related to the modulation of the immune response contribute to the assessment of the susceptibility and severity of the disease and the

development of prevention strategies, early detection and therapeutics. Despite the knowledge of the therapeutic effect of the use of glucocorticoids in the gestational period and the presence of a genetic element of response to corticosteroids in the promoter of the HLA-G gene, there are still no reports on the association of polymorphism in the promoter region of the HLA-G gene with the HLA-G levels in response to corticosteroid use in the treatment of preeclampsia. This study will clarify whether polymorphism in the promoter region of the HLA-G gene and serological levels of sHLA-G is associated with increased disease severity. 151 pregnant women participated in the research, where an epidemiological assessment, genetic and immunological study was carried out. 61.5% of patients had severe PE, 30.4% had no severe PE and 7.6% had hellp syndrome. At admission, pregnant women with hellp syndrome showed changes in platelet rates ( $p=0.0367$ ), urea (0.0478), uric acid (0.0061), TGO ( $p<0.0001$ ), TGP ( $p<0.0001$ ) and LDH ( $p<0.0001$ ), with values higher than those of severe PE and non-severe PE, demonstrating a risk of developing severe forms. The genetic analysis of the promoter of the HLA-G gene for the -486 A/A site is possibly related to an increased risk of developing PE, and the presence of the -1138 A allele is associated with a 3-fold increased risk of having the severe form of PE. disease. It was identified that the HLA-G -509CC/-400GG/-391GG haplotype was associated with protection against the disease ( $p=0.0184$ ), while the HLA-G -1138AA/-400GG is related to severe forms ( $p=0.0246$ ). Higher sHLA-G levels were observed at admission compared to postpartum, and there was no difference in sHLA-G levels in patients with severe PE, including hellp syndrome in pregnant women who used corticosteroids. This study highlighted the importance of platelets, urea, uric acid, TGO, TGP and HDL as risk markers for disease severity during patient admission to the health service.

**Keywords:** Pre-eclampsia, HLA-G Antigens, Glucocorticoids

## INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia é a doença mais comum dentre as síndromes hipertensivas gestacionais com repercussões nas mulheres e nos recém-nascidos em todo o mundo, e por possuir um componente imunológico, a identificação de fatores genéticos relacionados a modulação da resposta imune podem contribuir para a avaliação da susceptibilidade e gravidade da doença e o desenvolvimento de estratégias de prevenção, detecção precoce e terapêuticas (MONDADORI, 2010).

Como mecanismo imunológico na gestação está a influência da progesterona sobre o sistema imune da mãe participando do bloqueio da proliferação de linfócitos, prolongamento da sobrevivência de aloenxerto, modulação na produção de anticorpos além de redução na produção de citocinas pró-inflamatórias com a mudança no perfil de produção de citocinas para o tipo Th2 (WILCZYN´SKI, 2005; SZEKERES-BARTHO; HALASZ; PALKOVICS, 2009).

O antígeno leucocitário humano (HLA)-G é uma molécula do complexo de histocompatibilidade de classe I, não clássica, que exerce atividade de modulação da resposta imune, através da ligação a diferentes receptores inibitórios em diversas células imunes (CASTELLI, 2014). O gene *HLA-G* é pouco polimórfico, mas a presença de polimorfismos na

regulação reguladora 3' e 5' não traduzidas tem sido associada à alteração na expressão da proteína, cuja redução está associado a pré-eclâmpsia, abortos de repetição (CAROSELLA et al., 2008, MORANDI et al., 2016).

A Pré-eclâmpsia Grave (PEG) é definida como a PE associada a complicações materno-fetais que são graves o suficiente para que haja risco iminente de comprometimento de vida materno-fetal. É considerada grave quando um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas estão presentes: 1) pressão arterial igual ou acima de 160/110 mmHg, confirmada em pelo menos duas tomadas, com intervalo de seis horas; 2) proteinúria de 5 g ou mais em urina de 24 horas (3 ou 4+ em teste de tira); 3) oligúria ou diurese menor do que 400 ml por dia; 4) sintomatologia de iminência de eclampsia, ou seja, cefaleia, dor epigástrica e transtornos visuais; 5) cianose e edema pulmonar; além de 6) dor no hipocôndrio direito; 7) trombocitopenia ou plaquetas abaixo de 100.000/ mm<sup>3</sup>; 8) anemia hemolítica microangiopática decorrente da hemólise; 9) icterícia e/ou elevação das enzimas hepáticas e 10) restrição do crescimento fetal (FEBRASGO, 2017; KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018)

Apesar do conhecimento (1) do efeito terapêutico do uso de glicocorticoides no período gestacional trazendo benefícios tanto para a mãe quanto para o feto (AREIA et al., 2018), (2) da presença de elemento genético de resposta ao corticoide no promotor do gene *HLA-G* (CASTELLI, 2014), e (3) o fato do sítio de ligação do corticoide ao promotor ser polimórfico, ainda não existe relatos sobre a associação de polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G* com os níveis de HLA-G em resposta ao uso de corticoide no tratamento da pré-eclâmpsia.

Este estudo irá esclarecer se o polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G* e os níveis sorológicos de HLA-G está associado ao aumento da gravidade da doença, contribuindo para elucidar questionamentos relacionados aos fatores que podem interferir na expressão deste gene, gerando, além de conhecimento científico, a possibilidade de utilização dos achados como marcadores de gravidade da pré-eclâmpsia relevantes, diminuindo morbidade e mortalidade tanto das gestantes quanto de seus recém-nascidos.

## **MATERIAS E MÉTODOS**

### **Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado em 30/10/2019 pelo Comitê de ética em Pesquisa (CEP) do Aggeu Magalhães com o CAAE 17910719.1.0000.5190 e em 07/11/2019 pelo CEP do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), CAAE 17910719.1.3001.8807 conforme recomendado pela legislação brasileira de pesquisa com seres

humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. As pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

### **Seleção de pacientes**

Participaram do estudo 151 gestantes maiores de 18 anos, atendidas no período de 01 de abril a 30 de setembro de 2020 no Centro Obstétrico do HC da UFPE.

### **Coleta de dados clínicos e amostras**

A coleta dos dados clínicos foi realizada a partir de questionário semiestruturado aplicado diretamente à paciente pela pesquisadora. Dados referentes a internação assim como resultados de exames foram obtidos através de consulta ao prontuário médico.

Foram coletados em média 8 mL de sangue materno em tubo contendo EDTA de cada paciente, na admissão hospitalar e 24h pós-parto. As amostras foram processadas no Laboratório de Imunogenética/IAM/ FIOCRUZ.

### **Extração de DNA genômico humano**

O DNA genômico foi isolado das células mononucleares com o reagente DNazol (Invitrogen, California - USA), utilizando o protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em DNazol e o DNA precipitado com etanol 100%. Após a centrifugação a 12.000 x g, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 75% por duas vezes e diluído em 8 mM NaOH. O DNA isolado foi utilizado nos estudos de variabilidade genética.

### **Determinação do polimorfismo genético**

Foi amplificada a região 5'UTR do gene *HLA-G* a partir do DNA genômico das pacientes utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores HLAGF 5'-ACACTCATAATTCATTCATTCAGC-3'; HLAGR 5'-TCTTCTGATAACACAGGAACTTC -3' e a enzima DNA-polimerase Primestart<sup>®</sup> GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc, Kusatsu, Shiga, Japão).

O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da reação antes de serem encaminhados para sequenciamento, que foi realizado de acordo com o protocolo do Big Dye Terminator v3.1, e no equipamento ABI GeneticAnalyser 3100 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) localizado na plataforma tecnológica na Fiocruz-PE.

Os cromatogramas obtidos com o sequenciamento das regiões de interesse foram analisados com o programa Lasergene SeqMan 7.0 (DNASTAR Inc., Madison, EUA) para contagem dos SNP (*Single nucleotide polymorphism*).

As frequências genéticas observadas nas gestantes portadoras de doença grave, incluindo aquelas com síndrome HELLP, foram comparadas com as frequências observadas nas gestantes apresentando doença sem gravidade. Ainda foram comparadas as frequências determinadas considerando todas as mulheres com pré-eclâmpsia, independente da gravidade da doença, com as frequências em mulheres saudáveis sem histórico de câncer, doença autoimune, aborto ou pré-eclâmpsia na família determinadas em estudos anteriores do Laboratório de Imunogenética da Fiocruz-PE.

### **5.8 Detecção de HLA-G solúvel por ELISA**

A detecção de HLA-G solúvel (sHLA-G) (isoformas G5 e G6) no plasma foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal anti-HLA-G MEM-G/9 (Exbio, Praga, República Checa) de captura, pelo método de ELISA sanduíche. Uma curva padrão de cinco pontos (12,5-200 ng/mL) construída com o antígeno expresso em linhagem celular M8 foi utilizada para determinar os níveis circulantes de sHLA-G e os resultados foram expressos em ng/mL.

## **6. ANÁLISE ESTATÍSTICA E PROCESSAMENTO DE DADOS**

As variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais foram descritas com medidas de dispersão central para as variáveis contínuas e por valores absolutos e percentuais de contagem para as variáveis categóricas, estimadas com o programa GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, CA, EUA), e o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020). As frequências alélicas e genótípicas também foram analisadas com o programa R. Para todos os resultados, os valores de  $P < 0,05$  são considerados significativos.

## **RESULTADOS**

De acordo com a análise das pacientes que participaram do estudo, a idade das gestantes (média de 27,5 anos) não esteve associada a gravidade da doença ( $p=0,4820$ ). As gestantes com formas graves da pré-eclâmpsia na admissão hospitalar apresentaram menores idades gestacionais, sendo para a síndrome hellp, PE grave e PE sem gravidade, respectivamente 34, 37 e 38 semanas ( $p=0.0018$ ).

Constatou-se que a pressão sistólica na admissão foi significativamente maior na gestante com síndrome hellp e PE grave em relação a PE sem gravidade (167 x 160 x 148,

$p < 0,00001$ ), e que o histórico de hipertensão arterial ( $p = 0,0002$ ) e de diabetes ( $p = 0,0492$ ) aumenta o risco para desenvolvimento de síndrome hellp (Tabela 1).

Apesar da proporção de gestantes com histórico de pré-eclâmpsia ter aumentado nas gestantes com formas grave da doença atual, não há uma relação significativa entre a ocorrência de pré-eclâmpsia em gestações pregressa e futura.

*Tabela 1: Associação de comorbidades a gravidade da pré-eclâmpsia*

Variáveis	Diagnóstico Final						p
	Síndrome Hellp		Pré eclâmpsia grave		Pré eclâmpsia sem gravidade		
	N	%	N	%	N	%	
<b>HAS anterior</b>							
1. Sim	5	41,67	5	5,43	11	23,91	0,0002
2. Não	7	58,33	90	94,57	35	76,09	
<b>PE anterior</b>							
1. Sim	4	33,33	16	17,39	5	10,87	0,1633
2. Não	8	66,67	76	82,61	41	89,13	
<b>Diabetes anterior</b>							
1. Sim	2	16,67	2	2,17	3	6,52	0,0492
2. Não	10	83,33	90	97,83	43	93,48	

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: N: número de participantes deste estudo. P foi estimado pelo teste exato de Fisher.

Na admissão as gestantes com síndrome hellp apresentou alteração nas taxas de TGO, TGP e DHL, com valores superiores aos da PE grave e da PE sem gravidade (Tabela 2). Avaliando o pós-parto, as plaquetas ainda estavam alteradas em pacientes com PE grave. TGO e DHL mantiveram alteração pós-parto na PE grave e Síndrome hellp, apresentando diferença estatística significativa nas plaquetas e TGO (Tabela 3).

*Tabela 2: Associação de variáveis laboratoriais na admissão com a gravidade da pré-eclâmpsia.*

Variável Laboratorial	N	Min	Max	Média	Mediana	p1	p2
<b>Plaquetas</b>	148	49.000	427.000	230.331,1	229.000		
Síndrome Hellp	12	96.000	322.000	186.916,7	173.000		
PE grave	91	49.000	400.000	232.626,4	230.000		
PE sem gravidade	45	118.000	427.000	237.266,7	226.000	0,7711	0,0367
<b>Ácido Úrico</b>	144	2,2	40,9	5,2	4,9		
Síndrome Hellp	12	3,0	11,3	6,2	6,0		
PE grave	88	2,2	8,4	5,0	4,8		
PE sem gravidade	44	2,5	40,9	5,5	4,5	< 0,0001*	0,0061
<b>TGO</b>	144	8,1	429,2	31,0	20,4		

Síndrome Hellp	12	8,1	265,9	77,4	37,0		
PE grave	89	10,0	429,2	30,3	20,5		
PE sem gravidade	43	9,3	39,9	19,5	18,0	< 0,0001*	0,0002
<b>TGP</b>	143	4,6	278,9	22,4	12,8		
Síndrome Hellp	12	7,7	278,9	72,3	47,2		
PE grave	88	4,6	260,2	19,5	12,6		
PE sem gravidade	43	5,6	64,9	14,3	11,6	< 0,0001*	0,0002
<b>DHL</b>	139	268,1	2116,9	482,2	438,7		
Síndrome Hellp	11	364,8	1180,4	612,7	571,4		
PE grave	85	268,1	2116,9	483,6	446,9		
PE sem gravidade	43	278,4	751,7	445,9	426,6	< 0,0001*	0,0441

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Valores de referência: Plaquetas (150.000 – 450.000  $\mu$ L); Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Desidrogenase láctea (DHL, 250 a 450mg/dL).  $p1$ =resultado teste de normalidade, sendo (\*) indicativo de variável paramétrica.  $p2$  = variável não paramétrica com  $p < 0,05$ ; Significância é o resultado do pós teste. \*\*

*Tabela 3: Frequência genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene HLA-G em gestantes.*

Variável Laboratorial	N	Min	Max	Média	Mediana	p1	p2
<b>Plaquetas</b>	57	77000,0	1698000,0	257175,4	217000,0		
Síndrome Hellp	10	108000,0	289000,0	155600,0	137000,0		
PE grave	37	77000,0	588000,0	259432,4	246000,0		
PE sem gravidade	10	101000,0	1698000,0	350400,0	204000,0	< 0,0001*	0,0010
<b>Ácido Úrico</b>	44	2,8	8,5	5,1	5,1		
Síndrome Hellp	9	3,3	8,4	5,7	5,5		
PE grave	26	2,8	8,5	5,0	4,8		
PE sem gravidade	9	4,1	6,5	5,0	5,2	0,1368	0,3930
<b>TGO</b>	48	10,6	155,3	30,12	26,15		
Síndrome Hellp	10	19,0	155,3	44,7	31,6		
PE grave	29	10,6	79,8	26,9	24,2		
PE sem gravidade	9	10,8	42,4	24,3	22,6	< 0,0001*	0,0517
<b>TGP</b>	49	1,0	113,0	27,8	16,4		
Síndrome Hellp	10	11,6	113,0	44,1	31,2		
PE grave	30	1,0	93,4	23,7	14,8		
PE sem gravidade	9	7,0	67,9	23,0	15,6	0,3072	0,0584
<b>DHL</b>	25	295,8	691,5	479,5	479,0		
Síndrome Hellp	4	434,8	549,7	492,4	492,5		
PE grave	14	295,8	691,5	493,4	489,6		
PE sem gravidade	7	313,8	621,1	444,3	405,2	0,2933	0,6210

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Valores de referência: Plaquetas (150.000 – 450.000  $\mu$ L); Ácido úrico (3,0 a 7,0mg/dL) TGO (até 25U/L); TGP (até 55 U/L); Desidrogenase láctea (DHL,

250 a 450mg/dL).  $p_1$ =resultado teste de normalidade, sendo (\*) indicativo de variável paramétrica.  $p_2$  = variável não paramétrica com  $p < 0,05$ ; Significância é o resultado do pós teste. \*\*

A presença do alelo -1138 A em homozigose (OR= 2,97;  $p= 0,0317$ ) ou heterozigose (OR= 3,35;  $p= 0,0511$ ) está associada a um risco de 3X de apresentar a forma grave da doença. Ainda, a presença do genótipo -400 G/G, apesar de estar associado ao menor risco de desenvolver pré-eclâmpsia, pode estar relacionado a maior risco em desenvolver a forma grave da doença (OR= 2,85;  $p= 0,0570$ ). Nesse caso, foi observado um intervalo de confiança grande, sugerindo limitação da análise devido ao reduzido número de indivíduos apresentando uma das variáveis (Tabela 4).

*Tabela 4: Frequência genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene HLA-G*

	Total - PE	(Hellp + PE grave) x PE sem gravidade		Total-PE x Pop - FEM	
		OR	P- valor	OR	P- valor
<b>-1138 (A/G)</b>					
AA	102	2.97 (1.14-7.70)	0.0317	0.78 (0.38-1.60)	0.5921
AG	21	0.35 (0.13-0.95)	0.0511	1.24 (0.59-2.58)	0.5850
GG	2	--	--	--	--
total	125				
<b>-509 (C/G)</b>					
CC	91	2.28 (0.84-6.19)	0.1116	0.44 (0.19-0.99)	0.0508
CG	19	0.40 (0.14-1.08)	0.0960	2.12 (0.94-4.81)	0.0750
GG	1	--	--	--	--
total	111				
<b>-486 (A/C)</b>					
AA	39	0.74 (0.32-1.74)	0.5172	1.80 (0.99-3.24)	0.0554
AC	52	0.75 (0.34-1.63)	0.5514	1.09 (0.64-1.86)	0.7871
CC	18	--	--	0.44 (0.23-0.84)	0.0168
total	109	--	--		
<b>-400 (A/G)</b>					
AA	4	--	--	--	--
AG	19	0.40 (0.14-1.14)	0.0914	2.05 (0.92-4.56)	0.0793
GG	80	2.85 (1.07-7.62)	0.0570	0.38 (0.17-0.83)	0.0151
total	103				
<b>-391 (A/G)</b>					
AA	4	--	--	--	--
AG	16	0.51 (0.16-1.58)	0.3485	1.67 (0.73-3.81)	0.2242
GG	81	1.76 (0.61-5.04)	0.3912	0.45 (0.20-1.00)	0.0533
total	101				

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. Legenda: OR: Odds ratio, P foi estimado pelo teste de Mann-Whitney.

Quando construímos haplótipos formados pelos sítios polimórficos *HLA-G* -509 C/G; -400 A/G; -391A/G, cujos genótipos estiveram associados a proteção contra a doença, obtemos três haplótipos para o grupo controle e oito para o grupo de pacientes. O haplótipo *HLA-G* -509 CC/-400GG/-391GG foi o mais prevalente em ambos os grupos, e um fator associado a

proteção contra a doença quando comparado ao grupo controle (78% vs 91%; OR= 0,36; IC= 0,16-0,83;  $p= 0,0184$ ) (Tabela 5).

Na avaliação de haplótipos formados a partir dos sítios polimórficos *HLA-G* -1138 A/G e -400 A/G associados à evolução da doença em pacientes que tem o diagnóstico de PE confirmado (PE grave e Síndrome Hellp comparados com PE sem gravidade) gerou seis possíveis haplótipos, dos quais cinco foram identificados no grupo de pacientes com PE sem gravidade, e quatro no grupo de gestantes com doença grave. O haplótipo *HLA-G* -1138AA/-400GG foi associado ao maior risco para o desenvolvimento da forma grave da pré-eclâmpsia (OR= 3,38  $p= 0,0246$ ) (Tabela 6).

*Tabela 5: Haplótipo construído com genótipos associados a proteção contra doença*

Haplótipo - 509/-400/-391	Gestantes com pré-eclâmpsia		População controle		OR (IC)	P-valor
	n	%	n	%		
CC/AG/AG	3	3,09	2	1,85	--	--
CC/AG/GG	2	2,06	0	0,00	--	--
CC/GG/GG	76	78,35	98	--	0.36 (0.16-0.83)	0.0184
CC/GG/AG	0	0,00	0	0,00	--	--
CG/AG/AG	14	14,43	8	7,41	2.10 (0.84-5.27)	0.1182
CG/GG/GG	1	1,03	0	--	--	--
CG/GG/AG	0	0,00	0	0,00	--	--
CC/AG/GG	1	1,03	0	--	--	--
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>100,00</b>	<b>108</b>	<b>100,00</b>		

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confiança. P foi estimado pelo teste de Wilcoxon.

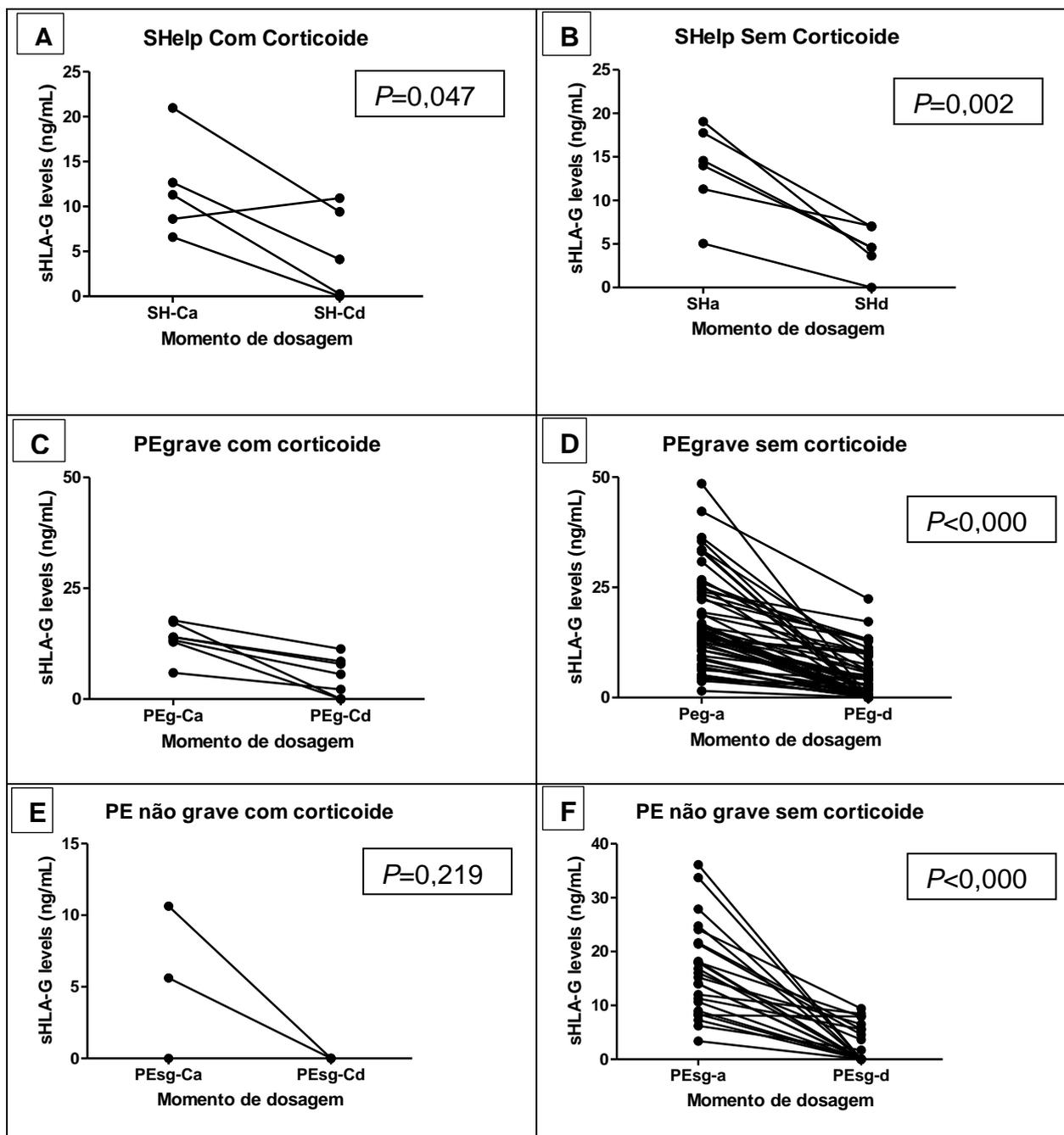
*Tabela 6: Haplótipo construído com genótipos associados a evolução da doença em gestantes com PE.*

Haplótipo -1138/- 400	Gestantes com pré-eclâmpsia grave		Gestantes com pré-eclâmpsia SEM grave		OR (IC)	P-valor
	n	%	n	%		
AA/AA	0	0,00	1			
AA/GG	61	83,56	15	62,50	3.38 (1.23-9.32)	0.0246
AG/AA	1	1,37	0	--	--	--
AG/AG	10	13,70	7	29,17	0.40 (0.13-1.22)	0.1283
AG/GG	0	0,00	1	--	--	--
GG/AA	1	1,37	1	--	--	--
<b>Total</b>	<b>73</b>	<b>100,00</b>	<b>24</b>	<b>100,00</b>		

Fonte: Elaborado pela autora, 2022. OR: Odds ratio, IC: Intervalo de confiança. P foi estimado pelo teste de Wilcoxon.

Os níveis circulantes de sHLA-G na gestante diminuíram significativamente após o parto, independentemente do uso preventivo de corticoide (Figura 1).

*Figura 1. Relação entre os níveis de sHLA-G das gestantes com pré-eclâmpsia que fizeram ou não uso de corticoide preventivo antes e após o parto*



## DISCUSSÃO

Na nossa casuística, as gestantes tinham idade média de 27,5 anos, e a idade não estava associada a gravidade da doença, possivelmente devido a limitação do número de gestantes com síndrome hellp que correspondia a 7,6% dos casos pré-eclâmpsia, e a não inclusão de gestantes menores de 18 anos no estudo. De forma semelhante, o estudo da África do Sul em 1.547 gestantes com pré-eclâmpsia e média de idade de 27 anos mostrou que 9,5% das pacientes evoluíram para eclampsia, mas com maior risco para as gestantes com idade inferior a 20 anos (30% x 3,5%) (NATHAN et al., 2018).

A mesma meta-análise relatou um risco de pré-eclâmpsia de 2,9, 3,7 e 5,1 vezes para quem é obesa, diabética e tem hipertensão arterial sistêmica prévia, respectivamente. E um risco de 8,7 vezes para quem tem histórico de pré-eclâmpsia anterior (BARTSCH et al., 2016; FRICK, 2021). De forma semelhante, as gestantes com pré-eclâmpsia e familiares de primeiro grau referiram fatores de risco para a doença, como diabetes (4,7% e 82,6% dos casos), hipertensão (14% e 91,3%), e pré-eclâmpsia prévia (17% e 44%, respectivamente), com um risco superior a duas vezes associado ao diabetes e hipertensão, corroborando com outros estudos (KHALIL et al., 2013, CHEN et al., 2021).

Em relação aos parâmetros hematológicos, os níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas na admissão hospitalar apresentaram variação, extrapolando os limites da normalidade na PE grave e síndrome hellp, mas apenas a redução dos níveis de plaquetas estava associada a síndrome hellp. A associação da trombocitopenia com síndrome hellp e eclampsia já foi descrita por outros (KINAY et al., 2015; BERHAN; ENDESHAW, 2015). Após o parto a redução dos níveis de hemoglobina, hematócrito e plaquetas ocorre em todas as gestantes, entretanto, a redução observada da hemoglobina e hematócrito foi significativamente superior na síndrome hellp comparadas a redução observada PE sem gravidade e PE grave. Os níveis de plaquetas também foram reduzidos, mas a diferença não atingiu a significância em nenhum grupo estudado, mas a trombocitopenia pós-parto continuou sendo um fator de gravidade associado apenas a síndrome hellp, corroborando o estudo que descreveu a anemia abaixo de 12mg/dL no pós-parto e a trombocitopenia abaixo de 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> no pré- e pós-parto associadas com a eclampsia (BERHAN; ENDESHAW, 2015).

Alteração em marcadores da função hepática (ácido úrico, TGO, TGP e DHL) estiveram associados a gravidade da pré-eclâmpsia na admissão, corroborando outros estudos (GRACIA, 2012; KINAY et al., 2015; NDWIGA et al., 2020; CHEN et al., 2021). Dentre esses, as enzimas hepáticas TGO e DHL foram os únicos que permaneceram com níveis elevados no pós-parto nas gestantes com síndrome hellp, e níveis discretamente acima do limite de

referência nas gestantes com PE-grave. Essas enzimas são indicativas de lesão hepática, e o seu aumento representam risco para ruptura hepática associada a eclampsia (GRACIA, 2012), e a persistência de níveis duas vezes acima do valor referência no pós-parto sugere a gravidade da lesão hepática (BERHAN; ENDESHAW, 2015).

O nível de HLA-G é crucial para a manutenção da gravidez e níveis baixos placentários e circulantes estão associados a abortos de repetição e eclampsia (SIPAK, 2019; ROKHAFROOZ, 2018). Esses níveis são determinados a nível transcricional e pós-transcricional do gene *HLA-G*, através dos sítios polimórficos existentes principalmente nas regiões reguladoras do gene. Na região 5'URR existem 35 sítios polimórficos, alguns dos quais em sequências alvo para fatores de transcrição (CASTELLI et al, 2014). Na região 3' não-traduzida existem oito sítios de polimorfismos (14bp Ins/Del, +3003 C/T, +3010 C/G, + 3027 A/C, +3035 C/T, +3142 C/G, +3187 C/G e +3196 C/G) MARTELLI-PALLOMINO, 2013) mais prevalentes capazes de modular a expressão do gene através da mediação de microRNAs (CASTELLI et al., 2017). A variante genética mais estudada é a deleção / inserção de 14-pares de base (14-pb) na região 3' não-traduzida, com a inserção associada a diminuição de níveis de sHLA-G e ao risco de eclampsia (ROKHAFROOZ, 2018; SIPAK, 2019).

Comparamos as frequências alélicas e genótípicas de 20 polimorfismos entre a posição -1305 e -369 da 5'URR do gene *HLA-G* de mulheres com pré-eclâmpsia e mulheres saudáveis, e identificamos três sítios polimórficos (-509/-400/-391) cujos alelos majoritários em homozigose estavam relacionados à proteção contra a doença, e outro apresentando uma tendência a significância (-486 G/G). Adicionalmente, observamos que o alelo A em homozigose -486A/A estava relacionado ao aumento do risco de desenvolver PE. De forma semelhante, DURMANOVA e colaboradores em 2021, ao analisar polimorfismos na região HLA-G 5'URR em mulheres eslovacas com pré-eclâmpsia, encontraram uma associação significativa entre -486A/C e aborto espontâneo, sugerindo que o alelo A possa ser dominante. O mesmo estudo demonstrou que os genótipos -201AA foram significativamente mais frequentes em mulheres que desenvolveram pré-eclâmpsia, região não avaliada no nosso estudo.

Quando analisamos isoladamente as gestantes com pré-eclâmpsia, os presença dos genótipos -1138 A/A e -400 G/G e o haplótipo apresentou um risco três vezes superior para desenvolver formas graves da doença. Entretanto, não identificamos diferenças significativas associando os níveis circulantes de sHLA-G com essas variantes genéticas. Além da possibilidade de outros sítios polimórficos, como aqueles da região 3' não-traduzida, estarem

simultaneamente interagindo na modulação da expressão do sHLA-G, deve-se considerar as alterações metabólicas, estresse e hipóxia que as gestantes na admissão hospitalar podem estar sujeitas, pois essas situações podem ativar fatores de transcrição com sítios na região promotora do gene *HLA-G* (FERREIRA, 2017a), fazendo com que os valores de sHLA-G sejam mais uniformes entre os grupos. Ademais, a forma de membrana da molécula HLA-G não foi quantificada nesse estudo.

A redução dos níveis de sHLA-G após o parto foi observada em todos os grupos, mas dentre as gestantes com PE sem gravidade os níveis de sHLA-G foram maiores nas gestantes que não fizeram uso de corticoide preventivo. Esse achado é interessante, visto que a região 5'URR do gene *HLA-G* possui um sítio de ligação para corticoides no início do promotor (CASTELLI, 2014), mas que não foi identificado pelo sequenciamento, sendo necessário repetir o experimento para obter uma maior cobertura de sequenciamento. Outro sim, não é possível afastar a existência de fatores de confusão, como uso de cloreto de magnésio como medida preventiva para convulsão, oxigenoterapia, ou outro, que podem modular a regulação de sHLA-G a nível transcricional ou pós-transcricional.

## CONCLUSÃO

Esse estudo contribuiu para a descrição do perfil de gestantes com pré-eclâmpsia atendidas no HC-UFPE, e o reconhecimento de que o protocolo de atendimento estabelecido na instituição tem permitido baixa taxa de complicação materna e fetal durante o curso da doença. A identificação de variantes genéticas associadas ao risco de desenvolvimento das formas graves cria oportunidades para o estudo de moléculas reguladoras, como miRNAs com alvo nesses sítios polimórficos, que permitam no futuro o desenho de fármacos que modulem os níveis de sHLA-G, que possam ser usados na gravidez antes da instalação das alterações estruturais na placenta, desta forma reduzindo ainda mais as complicações materno-fetais ainda associadas as síndromes hipertensivas na gestação.

Além disso, foi comprovada a importância das plaquetas, TGO, TGP e HDL como marcadores de risco para gravidade da doença durante a admissão da paciente no serviço de saúde. Adicionalmente, foi observado que há associação entre a gravidade da PE com o polimorfismo na região promotora do gene *HLA-G*, entretanto não foi detectada diferença significativa na expressão da forma solúvel do HLA-G com a gravidade da doença, significando que outros fatores estão atuando simultaneamente na expressão do gene.

## REFERENCIAS

AREIA, A. L. et al. Corticotherapy for fetal lung maturation. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 12, n. 4, p. 311–313, 2018.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2008.

CASTELLI, E. C. et al. Transcriptional and Posttranscriptional Regulations of the HLA-G Gene. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **SÉRIE ORIENTAÇÕES E RECOMENDAÇÕES FEBRASGO. N. 8: Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos**. São Paulo: Connexomm, 2017. 56 p.

KAHHALE, S.; FRANCISCO, R. P. V.; ZUGAIB, M. Pré-eclâmpsia. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 2, p. 226, 2018.

MONDADORI, Andressa Grazziotin. **Imunorregulação da pré-eclâmpsia: papel da molécula HLA-G e funções celulares efetoras na gestação**. 2010. 89 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MORANDI, F. et al. Recent advances in our understanding of HLA-G biology: Lessons from a wide spectrum of human diseases. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2016, 2016.

SZEKERES-BARTHO, J.; HALASZ, M.; PALKOVICS, T. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

Wilczyn'ski, J.R. Th1/Th2 cytokines balance—yin and yang of reproductive immunology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**; 122:136–143, 2005.

## ANEXO 1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IAM



Continuação do Parecer: 3.670.978

### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Estudar a associação do polimorfismo da região promotora do gene HLA-G e resposta ao uso de corticoide durante tratamento da pré-eclâmpsia.

Objetivos secundários:

- Avaliação das variáveis clínico-epidemiológica e laboratoriais associadas a gravidade e desfecho da pré-eclâmpsia;
- Identificação de sítios polimórficos na regiões reguladoras do gene HLA-G associadas a gravidade da doença;
- Avaliação das diferenças nos níveis da forma solúvel de HLA-G em sangue periférico, cordão umbilical e placenta e associada a gravidade da doença;
- Associação de alelos dos sítios polimórfico das regiões reguladoras com níveis de sHLA-G e HLA-G placentário;
- Associação da resposta ao uso de corticoide na pré-eclâmpsia com níveis sanguíneos de sHLA-G;
- Associação da resposta ao uso de corticoide na pré-eclâmpsia com o alelo do sítio de ligação de corticoide no promotor do gene HLA-G;
- Avaliação da resposta imune placentária de gestante com pré-eclâmpsia e síndrome HELLP

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O procedimento de coleta de sangue periférico pode trazer algum incômodo como dor no momento da punção, além de extravasamento de sangue, que será minimizado por pressão pós punção feito pelo profissional que realizará a coleta.

Benefícios:

Os resultados deste estudo podem levar alguns anos para serem alcançados, por isso qualquer benefício decorrente de seus resultados não serão imediatos, porém depois de alcança-los, ajudarão a entender as causas da doença, fazer diagnóstico precoce e melhorar o tratamento de uma grande parcela de mulheres que podem desenvolver pré-eclâmpsia no futuro.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será aplicado questionário e realizado coleta de amostra de sangue periférico, fragmento de placenta e sangue do cordão umbilical para realização dos testes propostos. Etapas da coleta das amostras:

- 1- Questionário e consulta ao prontuário;

Endereço:	Av. Prof. Moraes Rego, s/nº	CEP:	50.670-420
Bairro:	Cidade Universitária		
UF:	PE	Município:	RECIFE
Telefone:	(81)2101-2639	Fax:	(81)2101-2639
		E-mail:	comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.670.978

- 2- Coleta de sangue periférico da gestante, no momento da admissão hospitalar, antes da primeira dose de corticoide;
- 3- Coleta sangue periférico 24h após a primeira dose de corticoide;
- 4- Coleta de amostra de sangue periférico no momento do parto e sangue do cordão umbilical;
- 5- Coleta de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup> de fragmento de tecido placentário;
- 6- Coleta de amostra sanguínea no mínimo 24h após o parto, antes da alta hospitalar. As coletas de amostras sanguíneas seguirão o protocolo de acompanhamento de pacientes com pré-eclâmpsia da instituição, não sendo necessário a coleta de amostra além da necessária durante seu tratamento.

**Critério de Inclusão:** Critério de inclusão do grupo controle: Mulheres admitidas no serviço com histórico de pré natal de baixo risco que não apresentem qualquer doença crônico-degenerativa; Critério de inclusão do grupo caso: Mulheres admitidas no serviço com diagnóstico de pré-eclâmpsia e que aceitem participar da pesquisa com assinatura do TCLE.

**Critério de Exclusão:** Critério de exclusão das mulheres do grupo controle: Histórico pessoal de hipertensão, pré-eclâmpsia ou diabetes gestacional anterior e histórico familiar de câncer e doença autoimune; Critério de exclusão do grupo caso: Paciente referir uso prévio de corticoide no último mês e apresentar déficit cognitivo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos entregues sem pendências.

**Recomendações:**

A carta de Anuência anexada pela pesquisadora é do setor onde será realizada a pesquisa no hospital, e não documento assinado pelo Diretor geral do hospital. Observar se esse é o procedimento para anuência de coparticipante por parte do HC.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.floacruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 3.670.978

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Vale ressaltar que, em relação ao protocolo de pesquisa, é previsto na Resolução 466/2012 no item XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, que o pesquisador deve apresentar ao CEP relatórios parciais e finais (subitem: d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final). Pede-se que o pesquisador entregue os relatórios como previsto no texto da resolução. Informamos que a entrega dos relatórios parciais precisam ser feitas a cada semestre, conforme cronograma de execução da pesquisa, via Plataforma Brasil.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1389996.pdf	18/10/2019 16:35:42		Aceito
Outros	cartarespostaaspendenciasversao2.pdf	18/10/2019 16:23:39	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	CurriculoLattesNormaLucena.pdf	18/10/2019 16:07:21	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoversao2.pdf	18/10/2019 15:49:58	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	camilabarbosaprojetoversao2.pdf	18/10/2019 00:36:18	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEverao2.pdf	18/10/2019 00:34:00	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	Cartadeanuencia.pdf	01/09/2019 20:34:25	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	fichadeentrevista.pdf	27/08/2019 13:28:22	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termobiorrepositorio.pdf	08/08/2019 16:17:36	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	declaracaodecompromissorelatorios.pdf	22/07/2019 14:08:19	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	declaracaoequipeprojeto.pdf	22/07/2019 14:07:46	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	lattesCamilaBarbosa.pdf	22/07/2019 14:04:21	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.670.978

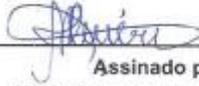
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

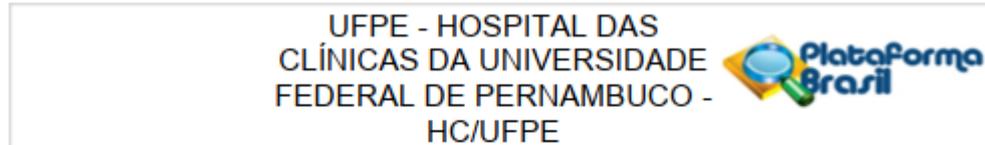
RECIFE, 30 de Outubro de 2019



Assinado por:  
Maria Almerice Lopes da Silva  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetico@cpqam.focruz.br

## ANEXO 2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Imunorregulação da pré-eclâmpsia: Polimorfismo da região promotora do gene HLA-G e resposta ao uso de corticoide durante tratamento da pré-eclâmpsia

**Pesquisador:** Camila Rodrigues de Melo Barbosa

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 17910719.1.3001.8807

**Instituição Proponente:** EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES - EBSERH

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.691.333

##### Apresentação do Projeto:

O projeto trata-se de uma dissertação, cuja hipótese é verificar se o efeito do uso de corticoide no tratamento de pré-eclâmpsia está associado ao aumento de HLA-G soluvel, interferindo na expressão do gene HLAG.

Tem como desenho de estudo transversal, e terá uma amostra de 200 pacientes, sendo 100 casos e 100 controles.

Tem como hipótese, O efeito do uso de corticoide no tratamento de pré-eclâmpsia está associado ao aumento de HLA-G soluvel, interferindo na expressão do gene HLAG.

**Critério de inclusão do grupo controle:** Mulheres admitidas no serviço com histórico de pré natal de baixo risco que não apresentem qualquer doença crônico-degenerativa; **Critério de inclusão do grupo caso:**

Mulheres admitidas no serviço com diagnóstico de pré-eclâmpsia e que aceitem participar da pesquisa com assinatura do TCLE.

**Critério de exclusão das mulheres do grupo controle:** Histórico pessoal de hipertensão, pré-eclâmpsia ou diabetes gestacional anterior e histórico familiar de câncer e doença autoimune.

**Critério de exclusão do grupo caso:** Paciente referir uso prévio de corticoide no último mês e apresentar déficit cognitivo.

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-3743 **E-mail:** cephcufpe@gmail.com

UFPE - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO -  
HC/UFPE



Continuação do Parecer: 3.691.333

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo primário: Estudar a associação do polimorfismo da região promotora do gene HLA-G e resposta ao uso de corticoide durante tratamento da pré-eclâmpsia.

Objetivos secundários:

- Avaliação das variáveis clínico-epidemiológica e laboratoriais associadas a gravidade e desfecho da pré-eclâmpsia;
- Identificação de sítios polimórficos na regiões reguladoras do gene HLA-G associadas a gravidade da doença;
- Avaliação das diferenças nos níveis da forma solúvel de HLA-G em sangue periférico, cordão umbilical e placenta e associada a gravidade da doença;
- Associação de alelos dos sítios polimórfico das regiões reguladoras com níveis de sHLA-G e HLA-G placentário;
- Associação da resposta ao uso de corticoide na pré-eclâmpsia com níveis sanguíneos de sHLA-G;
- Associação da resposta ao uso de corticoide na pré-eclâmpsia com o alelo do sítio de ligação de corticoide no promotor do gene HLA-G;
- Avaliação da resposta imune placentária de gestante com pré-eclâmpsia e síndrome HELLP

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O procedimento de coleta de sangue periférico pode trazer algum incômodo como dor no momento da punção, além de extravasamento de sangue, que será minimizado por pressão pós punção feito pelo profissional que realizará a coleta.

Benefícios:

Os resultados deste estudo podem levar alguns anos para serem alcançados, por isso qualquer benefício decorrente de seus resultados não serão imediatos, porém depois de alcança-los, ajudarão a entender as causas da doença, fazer diagnóstico precoce e melhorar o tratamento de uma grande parcela de mulheres que podem desenvolver pré-eclâmpsia no futuro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Será aplicado questionário e realizado coleta de amostra de sangue periférico, fragmento de placenta e sangue do cordão umbilical para realização dos testes propostos. Etapas da coleta das amostras:

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-901  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-3743 E-mail: cepcufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO -  
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.691.333

- 1- Questionário e consulta ao prontuário;
  - 2- Coleta de sangue periférico da gestante, no momento da admissão hospitalar, antes da primeira dose de corticoide;
  - 3- Coleta sangue periférico 24h após a primeira dose de corticoide;
  - 4- Coleta de amostra de sangue periférico no momento do parto e sangue do cordão umbilical;
  - 5- Coleta de aproximadamente 2 cm<sup>3</sup> de fragmento de tecido placentário;
  - 6- Coleta de amostra sanguínea no mínimo 24h após o parto, antes da alta hospitalar. As coletas de amostras sanguíneas seguirão o protocolo de acompanhamento de pacientes com pré-eclâmpsia da instituição, não sendo necessário a coleta de amostra além da necessária durante seu tratamento.
- Critério de Inclusão:** Critério de inclusão do grupo controle: Mulheres admitidas no serviço com histórico de pré natal de baixo risco que não apresentem qualquer doença crônico-degenerativa; Critério de inclusão do grupo caso: Mulheres admitidas no serviço com diagnóstico de pré-eclâmpsia e que aceitem participar da pesquisa com assinatura do TCLE.
- Critério de Exclusão:** Critério de exclusão das mulheres do grupo controle: Histórico pessoal de hipertensão, pré-eclâmpsia ou diabete gestacional anterior e histórico familiar de câncer e doença autoimune; Critério de exclusão do grupo caso: Paciente referir uso prévio de corticoide no último mês e apresentar déficit cognitivo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em conformidade com as normas vigentes.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

PROJETO APROVADO PELO CEP

O Protocolo foi avaliado e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Caso a pesquisa seja realizada no âmbito do Hospital das Clínicas, o pesquisador principal deve comparecer ao NAP e solicitar a Carta de Encaminhamento. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-3743 **E-mail:** cep@ufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO -  
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.691.333

Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP HC/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil. Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP HC/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1462107.pdf	05/11/2019 00:17:59		Aceito
Outros	printpagina5.pdf	05/11/2019 00:17:12	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	parecer_aprovado_assinado.pdf	05/11/2019 00:13:08	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_vistoHC.pdf	05/11/2019 00:12:13	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	cartarespostaaspendenciasversao2.pdf	18/10/2019 16:23:39	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	CurriculoLattesNormaLucena.pdf	18/10/2019 16:07:21	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	camilabarbosaprojetoversao2.pdf	18/10/2019 00:36:18	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEverao2.pdf	18/10/2019 00:34:00	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermarias)  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-901  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-3743 E-mail: cephoufpe@gmail.com

**UFPE - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PERNAMBUCO -  
HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 3.691.333

Outros	Cartadeanuencia.pdf	01/09/2019 20:34:25	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	fichadeentrevista.pdf	27/08/2019 13:28:22	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termobiorrepositorio.pdf	08/08/2019 16:17:36	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	declaracaodecompromissorelatorios.pdf	22/07/2019 14:08:19	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	declaracaoequipeprojeto.pdf	22/07/2019 14:07:46	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito
Outros	lattesCamilaBarbosa.pdf	22/07/2019 14:04:21	Camila Rodrigues de Melo Barbosa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 07 de Novembro de 2019

---

**Assinado por:  
José Ângelo Rizzo  
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, S/N, 3º andar do prédio principal (enfermaria)  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-901  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-3743 E-mail: cephoufpe@gmail.com

