

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina

Campus de Botucatu

**Polimorfismo do gene *IL6* candidato à predisposição à
Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e ao
Trabalho de Parto Pré-Termo.**

Niele Dias Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, Unesp, para obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**Botucatu
2012**

Niele Dias Mendes

**Polimorfismo do gene IL6 candidato à predisposição à
Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e ao
Trabalho de Parto Pré-Termo.**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista, Unesp, Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Botucatu 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Mendes, Niele Dias.

Polimorfismo do gene IL6 candidato à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e ao trabalho de parto pré-termo / Niele Dias Mendes. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008

1. Polimorfismo (Genética). 2. Parto (Obstetrícia). 3. Prematuros.

Palavras-chave: Gene da IL6; Inflamação; Parto Prematuro; Polimorfismo;
Rotura Prematura de Membranas.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Márcia Guimarães da Silva, por todo conhecimento passado a mim e por me incentivar a querer sempre mais.

À Bruna Ramos, a minha segunda professora dentro do laboratório, que sempre procurou me ajudar e a me ensinar com toda paciência do mundo, mais do que uma colega, uma amiga.

Às meninas do laboratório, Jossimara Polettini, Mariana Greatti, Larissa Marcolino, Ana Carolina Pereira, Natália Moço, Camila Marconi, Laura Martin, Nathália Nicolau e Amanda Coletta que com muita paciência me ajudaram com o que era possível e algumas vezes com o impossível.

À FAPESP, pela bolsa de Iniciação Científica concedida (Processo 2011/19183-2).

Ao Departamento de Patologia por toda atenção recebida.

*“Se o infinito não quisesse que
o homem fosse sábio, não teria
lhe dado a faculdade de saber”*
Manly P. Hall

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Tania e Devaldir e à minha irmã Nice, família que eu tanto amo e não consigo viver sem, por todo o esforço que fizeram por mim e por serem meus melhores amigos.

Aos meus avós Dionísia e Deco por todo o carinho e preocupação.

A minha vó Leonisa, que mesmo não estando mais entre nós continua me guiando.

Aos meus tios Mara, Maurício, Pércio e Fátima que sempre me ajudaram com o que podiam.

Aos meus padrinhos Delvair e Perci por sempre torcerem por mim.

Aos meus primos, Conrado, Camila, Nicole e Natali meus camaradas, que nunca se esqueceram de mim e sempre me apoiaram.

As minhas amigas Tica, Bruna e Larissa que me deram força e um motivo a mais para voltar para casa.

Às meninas de casa Carolina e Mara por me aturarem nos meus momentos mais taciturnos e sempre me oferecerem um ombro amigo

“Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.”

Confúcio

Sumário

1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	3
4. OBJETIVO	9
5. PACIENTES E MÉTODOS.....	9
5.1. Pacientes	9
5.2. Coleta de dados.....	10
5.3. Coleta das amostras	10
5.4. Extração de DNA genômico.....	10
5.5. Genotipagem dos polimorfismos.....	10
5.6. Análise dos resultados	11
6. RESULTADOS	12
7. DISCUSSÃO.....	15
8. BIBLIOGRAFIA	17
Anexos.....	21

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados sócio-demográficos das mulheres incluídas no estudo.....	13
Tabela 2. Genotipagem do gene IL-6-174 nas mulheres incluídas no estudo.....	14
Tabela 3. Fenotipagem do gene IL-6-174 nas mulheres incluídas no estudo.....	14

1. RESUMO

Introdução: O Trabalho de Parto Pré-Termo (TPP) e a Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) acarretam severas complicações para o binômio materno-fetal. Entre os fatores de risco associados ao TPP e à RPM-PT, a predisposição genética vem ganhando importância. Contudo, a associação entre genes polimórficos e a patogênese do TPP e da RPM-PT permanece alusiva. A maior compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes a estas complicações gestacionais poderá viabilizar a identificação de pacientes de maior risco, minimizando os efeitos deletérios da prematuridade. **Objetivo:** Determinar a associação entre polimorfismo do gene *IL6* materno e a ocorrência de TPP e de RPM-PT. **Pacientes e Métodos:** Foram incluídas no estudo 109 pacientes que apresentaram TPP e bolsa íntegra ou RPM-PT e apresentaram parto pré-termo como desfecho gestacional, entre os anos de 2003 e 2012, atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O grupo controle foi constituído por 68 pacientes com gestações resolvidas a termo. Foram coletados *swabs* bucais das pacientes para as análises dos polimorfismos gênicos por PCR. Os dados clínicos, étnicos e sócio-demográficos do grupo controle e do grupo estudo foram comparados pelo Teste T de student e pelo teste de Mann Whitney e os dados obtidos da genotipagem do polimorfismo IL-6-174 foi analisado pelo teste exato de Fisher. O software utilizado foi o SigmaStat 3.0 e o nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5%. **Resultados:** As características sócio-demográficas entre os dois grupos se apresentaram homogeneamente distribuídas. O alelo polimórfico C, associado à menor produção de IL-6, esteve presente em 32,5% das pacientes do grupo estudo e em 30,9% das pacientes do grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa. **Conclusão:** Considerando o tamanho amostral incluído no estudo, a frequência do alelo polimórfico

C, associado à menor produção de IL-6, é similar em pacientes que apresentaram gestações de termo e em pacientes com complicações gestacionais como TPP e RPM-PT.

2. ABSTRACT

Introduction: Preterm Labor (PTL) and Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM) cause severe complications for both mother and fetus. Among the risk factors associated with preterm labor and PPRM, genetic predisposition has been gaining importance. However, the association between polymorphic genes and the pathogenesis of PTL and PPRM remains elusive. A better understanding of the genetic mechanisms underlying these adverse pregnancy outcomes may enable the identification of high risk patients and allow new approaches to minimize the deleterious effects of prematurity.

Aim: To determine the association between maternal IL-6 polymorphism gene and the occurrence of PTL and PPRM. **Patients and Methods:** The study included 109 patients with prior history of PL and/or PPRM that delivered prematurely at the Obstetrical Unit Care of Botucatu Medical School, UNESP between 2003 and 2012. The control group consisted of 68 patients that delivered at term, matched to the case group by age, ethnicity, and sex of the newborn. Oral swabs (Cath-AllTM – Epicentre Biotechnologies) were collected for analysis of genetic polymorphisms by PCR. Statistical tests were performed to compare genotype, clinical and socio-demographic data from the groups. A p-value of <0.05 was considered significant. **Results:** The sociodemographic characteristics in both groups were homogeneously distributed. The frequency of the polymorphic allele C, associated with less production of IL-6, and therefore thought to be protective against PTL and PPRM, was 32,5% in the study group and 30,9% in the control group, without statistically significant differences. **Conclusion:** Considering the sample size included in this study, the frequency of the mutated allele is similar in pregnant women who delivered at term and gestational complications as PTL and PPRM.

3. INTRODUÇÃO

O trabalho de parto pré-termo (TPP) é uma intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações e constitui importante problema de saúde pública em todo o mundo¹⁻³. É caracterizado pela presença de uma ou mais contrações a cada 10 minutos, acompanhada por esvaecimento cervical ou dilatação cervical igual ou superior a 2 cm com idade gestacional entre 22 e 37 semanas⁴. A prematuridade decorrente do TPP refratário à tocolise é responsável por cerca de 70% dos índices de mortalidade e morbidade perinatais e acarreta severas complicações para o binômio materno-fetal^{3,5}.

Apesar de o TPP ser extensamente estudado, as taxas de prematuridade, mesmo em países desenvolvidos, não têm diminuído com o passar dos anos. Recém-nascidos em idade gestacional inferior a 37 semanas têm probabilidades significativamente aumentadas de apresentar morbidades como dano cerebral, displasia pulmonar, enterocolite necrozante, retinopatia, entre outras, que podem acarretar sequelas irreversíveis, diminuindo a qualidade de vida do neonato⁶.

Outra complicação obstétrica comumente preditora de resultados adversos da gestação é a Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT). A RPM-PT, definida como rotura das membranas fetais em idade gestacional inferior a 37 semanas, é sem dúvida, um importante fator de risco para o TPP, estando presente em 30 a 40% dos casos⁷. A concomitância destas intercorrências gestacionais agrava significativamente a morbimortalidade no binômio materno-fetal. A RPM-PT também pode ocorrer na ausência do TPP, neste caso acometendo aproximadamente 1% das gestações⁷.

Estas complicações gestacionais possuem etiologia multifatorial e, embora muitos avanços já tenham sido alcançados nesta área, inúmeros aspectos concernentes à sua patogenia ainda não foram completamente elucidados. Dentre os fatores

conhecidamente associados ao TPP e à RPM-PT, podemos destacar placenta prévia, polidramnia, sangramento vaginal durante a gestação, vaginose bacteriana e infecção intra-amniótica⁸⁻¹¹, sendo que mais de um mecanismo pode estar presente ao mesmo tempo nessas complicações gestacionais. Independente do fator ou fatores causais, todos, em última instância, deflagram importante resposta inflamatória¹¹.

Essa resposta é intrínseca ao desfecho gestacional, seja favorável ou adverso¹¹. Em desfechos gestacionais favoráveis, níveis crescentes de citocinas pró-inflamatórias são secretados pelos tecidos gestacionais à proximidade do termo¹²⁻¹⁴. Esses mediadores inflamatórios desencadeiam a produção de prostaglandinas, endotelinas e metaloproteinases, responsáveis por induzir contratilidade miometrial, apagamento cervical e rotura das membranas fetais¹⁵⁻¹⁷. Na presença de bactérias na cavidade amniótica, mesmo na presença de infecção subclínica, ou em decorrência de estresse materno ou polidramnia, por exemplo, a maior produção de citocinas como Interleucina (IL)-1 β , IL-6 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α é deflagrada precocemente. Desta maneira, níveis elevados destes mediadores nos tecidos materno-fetais contribuem para o desencadeamento do TPP e da RPM-PT^{14, 16}.

Outro fator de risco para essas complicações gestacionais que vem sendo discutido na literatura é a predisposição genética. Gestantes com história prévia de TPP ou RPM possuem risco significativamente elevado de apresentarem recorrência destas complicações^{18, 19}. Da mesma maneira, mulheres que nasceram prematuras têm maior probabilidade de se tornarem gestantes que apresentarão TPP ou RPM²⁰. Esses fatos, aliados à disparidade entre as taxas de prematuridade entre populações de diferentes etnias^{21, 22}, nos permitem entrever a grande influência da predisposição genética sobre o desfecho gestacional a que pacientes estarão submetidas.

Crescentes evidências sugerem correlação entre a presença de variáveis gênicas específicas e resultados gestacionais adversos²³⁻²⁵. Os maiores alvos destas pesquisas recaem sobre os genes associados à resposta imune, como genes envolvidos no reconhecimento de patógenos, nas vias de ativação intracelular, e, principalmente, nos produtos finais da resposta imune, como os genes codificadores de citocinas.

Dentre as inúmeras variações genéticas encontradas no genoma humano, os polimorfismos de único nucleotídeo (single nucleotide polymorphisms - SNPs), definidos como substituições de um único nucleotídeo de uma sequência de DNA codificante, são as alterações mais comuns, podendo ocorrer em qualquer sequência gênica *de novo* ou ser herdados. Já foram descritos SNPs em muitos genes codificadores de citocinas e de outras proteínas implicadas no desfecho gestacional^{23, 25}. Esses polimorfismos frequentemente se localizam na região regulatória destes genes e algumas variações alélicas afetam sua ativação transcricional. Polimorfismos funcionais podem aumentar ou diminuir a transcrição gênica e, conseqüentemente, a tradução da proteína correspondente em resposta a determinados estímulos e desta maneira podem afetar a resposta imune²⁶.

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por uma variedade de células do organismo, em especial leucócitos, em resposta a diferentes estímulos, atuando como mediadoras do sistema imune. Dentre as citocinas associadas a complicações gestacionais, uma das mais importantes é, sem dúvida, a IL-6.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica secretada como proteína de 26 kDa que é produzida por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, monócitos/macrófagos, adipócitos, células endoteliais, células endometriais e células decíduais²⁷. Entre suas funções no sistema imune, destaca-se a propriedade de regulação da resposta

inflamatória. A IL-6 pode exercer ambos os efeitos pró e anti-inflamatórios, dependendo da célula-alvo e de suas concentrações nestes microambientes^{28, 29}.

A sinalização desta citocina se dá através de sua ligação ao complexo formado pelo receptor de IL-6 (IL-6R) e por duas moléculas da glicoproteína de membrana 130 (gp130) na superfície celular. Alternativamente, a IL-6 pode primeiramente formar um complexo com a forma solúvel do receptor de IL-6 (sIL-6R), originado a partir da clivagem do IL-6R ou por *splicing* alternativo. A ligação do complexo IL-6-sIL-6R à gp130 é denominada trans-sinalização³⁰. A co-existência dessas vias de sinalização explica a amplitude de ação desta citocina, uma vez que a gp130, contrariamente ao IL-6R que é expresso por um número restrito de tipos celulares como hepatócitos, neutrófilos, macrófagos, leucócitos e trofoblasto, é ubiquamente expressa^{31, 32}.

A IL-6 possui importante função durante a gestação e no parto e sua atividade está intimamente relacionada ao seu receptor. Diversos trabalhos descrevem o envolvimento desta citocina na implantação embrionária, no desenvolvimento placentário e nos estágios tardios da gestação³³⁻³⁶. Segundo Keelan et al.¹⁶ a IL-6 contribui para eventos que culminam no parto através de suas interações com a via de produção de prostaglandina (PG). *In vitro*, esta molécula regula positivamente a produção de PGE₂, PGF_{2α} e do receptor de PGF_{2α} em células amnióticas e deciduais^{37, 38}, além de estimular contratilidade miometrial por indução da expressão de receptores para ocitocina³⁹.

A IL-6 também atua no parto em condições patológicas e é a principal molécula preditora do TPP, além de estar associada à RPM-PT⁴⁰⁻⁴². Níveis elevados de IL-6 na secreção cervical de pacientes com parto pré-termo estão relacionados com RPM⁴⁰. Concentrações aumentadas desta citocina também foram detectadas no líquido amniótico de gestantes em TPP⁴³.

O polimorfismo do gene codificador da IL-6, descrito na região promotora do *IL6* (7p21), na posição -174, influencia a produção de IL-6 com o genótipo G/G associado à produção aumentada da proteína e o genótipo C/C associado ao decréscimo desta^{44, 45}. Em população acometida por periodontite, Dashash et al.⁴⁶ não encontraram associação significativa entre polimorfismo do gene IL-6 e parto pré-termo. Em contrapartida, Kalinka et al.²⁴ descrevem que pacientes com genótipos GG e GC para o polimorfismo *IL6-174* possuem risco multiplicado de apresentar TPP quando portadoras do alelo *IL1RN*2*. Velez et al.⁴⁷, por sua vez, relatam forte associação entre presença de SNP sinônimo no gene fetal codificador do receptor de IL-6 e TPP com membranas intactas.

Dessa maneira, polimorfismo do gene *IL6* é importante candidato a marcador de resultado gestacional adverso e sua identificação em gestantes acometidas por RPM-PT e TPP é de particular interesse no âmbito clínico-obstétrico.

4. OBJETIVO

Investigar a associação do polimorfismo -174 do gene *IL6* candidato à predisposição à Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e ao Trabalho de Parto Pré-Termo.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1. Pacientes

Foram incluídas no estudo 109 mulheres com histórico de TPP e bolsa íntegra ou RPM-PT que culminaram em parto pré-termo e 68 mulheres com gestações resolvidas a termo. Todas as pacientes foram atendidas no Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP entre os anos de 2003 e 2012.

Todas as pacientes envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos 1 e 2). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo CEP 3858-2011).

Foram excluídas da pesquisa pacientes que tenham apresentado complicações gestacionais como eclâmpsia ou pré-eclâmpsia, hipertensão gestacional, síndrome anticorpos anti-fosfolípides, diabetes gestacional, síndrome HELLP, incompetência istmo-cervical, descolamento prévio de placenta, placenta prévia, incompatibilidade de RH, trauma mecânico, corioamnionite clínica, oligoâmnio ou polidrâmnio. Gestantes com restrição de crescimento intra-uterino, má formação fetal ou óbito fetal, gestação múltipla, pólipos endocervicais, acometidas por doenças ou infecções sistêmicas como lúpus eritematoso sistêmico, hipertensão arterial crônica, doenças na tireóide, diabetes mellitus ou soropositividade para HIV, assim como pacientes que tenham sido

submetidas à amniocentese ou fertilização *in vitro* ou que façam uso de drogas e álcool também foram excluídas do estudo.

5.2. Coleta de dados

Os dados sócio-demográficos e resultados obstétricos foram obtidos dos prontuários médicos das pacientes. Em adição à essa consulta, foram aplicados questionários para aferição das informações contidas nos prontuários e para obtenção de dados inexistentes (Anexo 3).

5.3. Coleta das amostras

Amostras de células epiteliais da mucosa bucal das pacientes incluídas no estudo foram coletadas utilizando-se Catch-All Sample Collection Swab (Epicentre®, Madison) para extração do DNA genômico. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento do processamento.

5.4. Extração de DNA genômico

Os *swabs* bucais foram descongelados à temperatura ambiente e acondicionados em tubos contendo 500µL de PBS estéril (*phosphate-buffered saline solution*) e homogeneizados para extração do DNA total utilizando-se o QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN®), de acordo com as instruções do fabricante.

5.5. Genotipagem dos polimorfismos

A identificação do polimorfismo *IL6-174 G>C* (rs1800795) foi realizada por PCR específico, utilizando-se os *primers* IL-6 C (5'- GCA CTT TTC CCC CTA GTT GTG TCT TAC G -3'), IL-6 G (5'- ATG ACG ACC TAA GCT TTA CTT TTC CCC

CTA GTT GTG TCT TGA C -3') e IL-6 GPS (5' - ATA AAT CTT TGT TGG AGG GTG AGG -3') de acordo com protocolo adaptado de Schluter et al. (2002).

5.6. Análise dos resultados

Os dados clínicos, étnicos e sócio-demográficos do grupo controle e do grupo estudo foram comparados pelo Teste T e pelo teste de Mann Whitney e os dados obtidos da genotipagem do polimorfismo IL-6-174 foi analisado pelo teste exato de Fisher. O software utilizado foi o SigmaStat 3.0 e o nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5%.

6. RESULTADOS

As características sócio-demográficas das mulheres incluídas no estudo apresentaram-se distribuídas homogeneamente entre os grupos estudo e controle. A mediana da idade das pacientes foi de 22 anos (14-39) para o grupo estudo e 23 anos (15-43) para o grupo controle. As medianas da idade gestacional no momento do parto foram de 35s1d e 39s4d, respectivamente (Tabela 1). De acordo com o reportado, 63,9% das pacientes do grupo estudo e 48,5% do grupo controle se consideram brancas, 36,1% das pacientes do grupo estudo e 51,5% grupo controle se consideram pardas ou negras.

A extração de DNA e análise do polimorfismo IL-6-174 foram realizadas em todas as 109 amostras do grupo estudo e das 68 amostras do grupo controle. No grupo estudo, o alelo polimórfico C, associado à menor produção de IL-6, esteve presente em 33,0% das pacientes do grupo estudo (27,5% CG e 5,5% CC) com a frequência alélica de 19,3 enquanto 30,9% das pacientes do grupo controle foram genotipadas com o mesmo alelo (22,1% CG e 8,8% CC) com a frequência alélica de 19,9 (Tabelas 2 e 3). A análise da porcentagem de cada genótipo e a frequência alélica não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 1. Dados sócio-demográficos das mulheres incluídas no estudo.

Variáveis	Grupo Estudo (n=109)	Grupo Controle (n=68)
Idade (anos) *	22 (14 – 39) ^a	23 (15 – 43) ^a
IG no momento do parto (dias) *	246 (172 – 258) ^a	277 (259 – 293) ^b
Estado civil		
Solteira	19,3% (21/109) ^a	22,0%(15/68) ^a
União Estável	67,9% (74/109) ^a	51,5% (35/68) ^a
NA	12,8 % (14/109)	26,5% (18/68)
Etnia		
Branca	63,3% (69/109) ^a	48,5% (33/68) ^a
Não branca	35,8% (39/109) ^a	51,5% (35/68) ^a
NA	0,9% (01/109)	-
Paridade		
Primigesta	32,1% (35/109) ^a	38,2% (26/68) ^a
Multigesta	66,1% (72/109) ^a	61,8% (42/68) ^a
NA	1,8% (02/109)	
Tabagismo		
Fumante	27,5% (30/109) ^a	10,3% (7/68) ^a
Não Fumante	68,8% (75/109) ^a	88,2% (60/68) ^a
NA	3,7% (04/109)	1,5% (01/68)
Escolaridade		
Analfabeta	-	1,5% (01/68)
Fundamental Incompleto	28,4% (31/109) ^a	8,8% (6/68) ^a
Fundamental Completo	29,4% (32/109) ^a	29,4% (20/68) ^a
Médio Completo	22,9% (25/109) ^a	20,6% (14/68) ^a
Superior Completo	0,9% (01/109) ^a	2,9% (02/68) ^b
NA	18,4% (20/109)	36,8% (25/68)

Na comparação dos grupos foram utilizadas letras minúsculas, considerando-se que as proporções seguidas de, pelo menos, uma mesma letra não diferem. Teste t na comparação entre os grupos em relação às variáveis discretas; * variáveis apresentadas em medianas (mínimo-máximo) e Teste de Mann Whitney. NA = não avaliada

Tabela 2. Genotipagem do gene IL-6-174 nas mulheres incluídas no estudo.

	GG N (%)	CG N(%)	CC N(%)
Grupo estudo	73 (67,0)	30 (27,5)	6 (5,5)
Grupo controle	47 (69,1)	15 (22,1)	6 (8,8)

N= número de mulheres com as respectivas freqüências alélicas para o gene IL-6-174.
 (%)= porcentagem de mulheres com as respectivas freqüências alélicas para o gene IL-6-174.

Tabela 3. Fenotipagem do gene IL-6-174 nas mulheres incluídas no estudo.

	G (%)	C (%)
Grupo estudo	80,7	19,3
Grupo controle	80,1	19,9

(%)= porcentagem da freqüências alélicas para o gene IL-6-174.

7. DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi investigar a associação do polimorfismo -174 do gene *IL6* candidato à predisposição à Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e ao Trabalho de Parto Pré-Termo.

A IL-6 é uma importante citocina reguladora da resposta inflamatória e níveis elevados deste mediador são frequentemente associados ao TPP e à RPM-PT⁴⁰⁻⁴². A presença do alelo G na região promotora deste gene está associada à elevada produção de IL-6 durante a resposta imune em comparação ao alelo C, tanto *in vitro* quanto *in vivo*⁴⁹. Em adição, vários estudos demonstraram a relevância deste polimorfismo em outras patologias⁵⁰⁻⁵¹. Entretanto, os resultados aqui apresentados demonstram que a frequência alélica da mutação estudada não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudo e controle, achado que está de acordo com o descrito por Dashash et al⁴⁶.

Entretanto, o tamanho amostral incluído no estudo até o momento foi inferior à maioria dos estudos similares, o que pode ter diminuído o poder de predição da técnica realizada. Dentre os anos de 2003 e 2012 no Hospital das Clínicas da FMB, temos catalogadas 516 pacientes com as complicações gestacionais citadas como de interesse para o estudo, que serão rastreadas para a identificação do polimorfismo *IL6-174 G>C*, constituindo um tamanho amostral adequado. Adicionalmente, a pesquisa de outros polimorfismos é de grande interesse, uma vez que as interações genéticas presentes em complicações multifatoriais, como o TPP e a RPM-PT, também devem ser consideradas. Kalinka et al.²⁴ correlacionaram a presença do alelo C *IL6-174* com maior risco de TPP em pacientes portadoras de mutação em outro gene, o *IL1RN*2*. Similarmente, Velez et al.⁴⁸ observaram correlação entre determinados haplótipos de

IL6 e *IL6R* e parto prematuro. Neste sentido o polimorfismo do receptor de IL-6 será estudado e sua padronização encontra-se em curso em nosso laboratório.

Desta maneira, a realização de estudos genéticos mostra-se de grande importância para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes ao TPP e à RPM-PT. No futuro, esta ferramenta pode possibilitar a identificação de pacientes com maior predisposição a estas complicações e rastreá-las ao longo da gestação, a fim de minimizar os efeitos deletérios advindos da prematuridade.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):75-84.
2. Tracy SK, Tracy MB, Dean J, Laws P, Sullivan E. Spontaneous preterm birth of liveborn infants in women at low risk in Australia over 10 years: a population-based study. *BJOG*. 2007 Jun;114(6):731-5.
3. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz DA, Kaufman JS, Garrett JM, et al. The epidemiology of threatened preterm labor: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Apr;192(4):1325-9; discussion 9-30.
4. Gestação de Alto Risco / Secretaria de Políticas, Área Técnica da Saúde da Mulher. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 164 p.
5. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med*. 1985 Jan 10;312(2):82-90.
6. Arpino C, D'Argenzio L, Ticconi C, Di Paolo A, Stellin V, Lopez L, et al. Brain damage in preterm infants: etiological pathways. *Ann Ist Super Sanita*. 2005;41(2):229-37.
7. Parry S, Strauss JF, 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med*. 1998 Mar 5;338(10):663-70.
8. Lo CC, Hsu JJ, Hsieh CC, Hsieh TT, Hung TH. Risk factors for spontaneous preterm delivery before 34 weeks of gestation among Taiwanese women. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007 Dec;46(4):389-94.
9. Varma R, Gupta JK, James DK, Kilby MD. Do screening-preventative interventions in asymptomatic pregnancies reduce the risk of preterm delivery--a critical appraisal of the literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006 Aug;127(2):145-59.
10. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004 Nov 15;117 Suppl 1:S2-5.
11. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG*. 2006 Dec;113 Suppl 3:17-42.
12. Ammala M, Nyman T, Salmi A, Rutanen EM. The interleukin-1 system in gestational tissues at term: effect of labour. *Placenta*. 1997 Nov;18(8):717-23.
13. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Nov;189(5):1433-8.
14. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol*. 2008 Oct;79(1):50-7.
15. Kamel RM. The onset of human parturition. *Arch Gynecol Obstet*. Jun;281(6):975-82.
16. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition--a review. *Placenta*. 2003 Apr;24 Suppl A:S33-46.
17. Baggia S, Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Novy MJ. Interleukin-1 beta intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin production, and preterm contractions in pregnant rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Investig*. 1996 May-Jun;3(3):121-6.
18. Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, Meis PJ, Iams JD, Das AF, et al. The preterm prediction study: effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. National Institute of Child Health and Human

Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 Nov;181(5 Pt 1):1216-21.

19. Adams MM, Elam-Evans LD, Wilson HG, Gilbertz DA. Rates of and factors associated with recurrence of preterm delivery. *JAMA.* 2000 Mar 22-29;283(12):1591-6.

20. Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The risk of preterm birth across generations. *Obstet Gynecol.* 1997 Jul;90(1):63-7.

21. Kistka ZA, Palomar L, Lee KA, Boslaugh SE, Wangler MF, Cole FS, et al. Racial disparity in the frequency of recurrence of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Feb;196(2):131 e1-6.

22. Menon R, Velez DR, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Williams SM, et al. Ethnic differences in key candidate genes for spontaneous preterm birth: TNF-alpha and its receptors. *Hum Hered.* 2006;62(2):107-18.

23. Menon R, Merialdi M, Betran AP, Dolan S, Jiang L, Fortunato SJ, et al. Analysis of association between maternal tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism (-308), tumor necrosis factor concentration, and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Nov;195(5):1240-8.

24. Kalinka J, Bitner A. [Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women]. *Ginekol Pol.* 2009 Feb;80(2):111-7.

25. Chaves JH, Babayan A, Bezerra Cde M, Linhares IM, Witkin SS. Maternal and neonatal interleukin-1 receptor antagonist genotype and pregnancy outcome in a population with a high rate of pre-term birth. *Am J Reprod Immunol.* 2008 Oct;60(4):312-7.

26. Himes KP, Simhan HN. Genetic susceptibility to infection-mediated preterm birth. *Infect Dis Clin North Am.* 2008 Dec;22(4):741-53, vii.

27. Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, May LT. Cytokine-induced production of IFN-beta 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 beta. *J Immunol.* 1989 May 1;142(9):3134-9.

28. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):311-20.

29. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol.* 2006 Aug;80(2):227-36.

30. Lee SY, Buhimschi IA, Dulay AT, Ali UA, Zhao G, Abdel-Razek SS, et al. IL-6 trans-signaling system in intra-amniotic inflammation, preterm birth, and preterm premature rupture of the membranes. *J Immunol.* Mar 1;186(5):3226-36.

31. Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K, Kameda T, Taniguchi T, Takagi T, et al. Trophoblast-derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Aug;71(2):436-41.

32. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets.* 2007 May;11(5):613-24.

33. Robertson SA, Christiaens I, Dorian CL, Zaragoza DB, Care AS, Banks AM, et al. Interleukin-6 is an essential determinant of on-time parturition in the mouse. *Endocrinology.* Aug;151(8):3996-4006.

34. Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Apr;87(8):3092-6.
35. De M, Sanford TH, Wood GW. Detection of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the uterus during the second half of pregnancy in the mouse. *Endocrinology*. 1992 Jul;131(1):14-20.
36. Hondo E, Kokubu K, Kato K, Kiso Y. Localization of interleukin-6 receptor mRNA in the pregnant and non-pregnant mouse uterus. *J Reprod Dev*. 2005 Dec;51(6):777-81.
37. Mitchell MD, Dudley DJ, Edwin SS, Schiller SL. Interleukin-6 stimulates prostaglandin production by human amnion and decidual cells. *Eur J Pharmacol*. 1991 Jan 3;192(1):189-91.
38. Olson DM, Ammann C. Role of the prostaglandins in labour and prostaglandin receptor inhibitors in the prevention of preterm labour. *Front Biosci*. 2007;12:1329-43.
39. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*. 2009 Feb;16(2):206-15.
40. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinski R, Casal D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 1994 Oct;171(4):1097-102.
41. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol*. 2000 Jun;95(6 Pt 2):1056-64.
42. Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, Bokstrom H, Holst RM, Nikolaitchouk N, et al. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003 May;82(5):423-31.
43. Wenstrom KD, Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, DuBard MB, Cliver SP. Elevated second-trimester amniotic fluid interleukin-6 levels predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Mar;178(3):546-50.
44. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998 Oct 1;102(7):1369-76.
45. Unfried G, Bocskor S, Endler G, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2003 Feb;18(2):267-70.
46. Dashash M, Nugent J, Baker P, Tansinda D, Blinkhorn F. Interleukin-6 -174 genotype, periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a pilot study. *J Clin Immunol*. 2008 May;28(3):237-43.
47. Velez DR, Fortunato S, Thorsen P, Lombardi SJ, Williams SM, Menon R. Spontaneous preterm birth in African Americans is associated with infection and inflammatory response gene variants. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Feb;200(2):209 e1-27.
48. Velez DR, Fortunato SJ, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet*. 2008 Jun 1;17(11):1619-30.
49. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al: The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102:1369–1376

50. Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, et al: An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood* 2000; 96:2562–2567
51. Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, et al: A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999; 45:666–668



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A senhora está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “**Polimorfismos em genes pró e anti-inflamatórios candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e trabalho de parto pré-termo**” tem como objetivo entender participação da herança genética, que é passada de pais para filhos, na presença de complicações importantes na gestação como o rompimento das bolsas das águas prematuramente assim como o parto antes do tempo. Essa pesquisa será realizada pela pós-graduanda Bruna Ribeiro de Andrade Ramos do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, orientada pela Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva, também do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP além de outros pesquisadores colaboradores.

Fui informada que, por ter apresentado uma dessas complicações em minha gestação anterior, estarei constituindo o **grupo estudo** da pesquisa. Assim concordo que seja realizada em mim e em meu(s) filho(s) nascido(s) de gestação(ões) complicada(s) a coleta de material bucal utilizando-se um cotonete. Estou ciente de que essa coleta de material bucal não é dolorosa e o desconforto se restringe à pressão do cotonete contra a bochecha, não ocasionando sangramentos nem feridas locais. Adicionalmente, responderei a um breve questionário, que levará de 5 a 10 minutos.

Eu,, após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa, juntamente com meu(minha) filho(a), podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo ao atendimento que necessitarmos. Também fui informada de que nossos nomes não aparecerão quando os resultados forem divulgados. Estou ciente ainda de que não receberemos qualquer ajuda financeira para a participação no projeto, entretanto haverá o ressarcimento do transporte para a vinda ao hospital, para coleta do material, quando necessário. Estou ciente também de que este trabalho não trará benefícios imediatos para mim ou para meu(s) filho(s), mas será importante para o entedimento de complicações que podem ocorrer na gestação.

Qualquer dúvida adicional, vocês poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone (14) 3811 6143. Esse documento, após a aprovação do CEP, será elaborado em 2 vias, sendo uma entregue aos sujeitos da pesquisa e outra será mantida em arquivo do pesquisador.

Botucatu, de de 2011.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura do Pesquisador
Niele Dias Mendes

Endereço: Rua Dr. Ranimiro Lotufo, 593 Apto 14A, Botucatu
Telefone (14) 3814 58 48

Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Endereço do Pesquisador: Rua Izidoro Bertaglia, 746 – Jardim Chácara dos Pinheiros
Telefone (14) 3815 25 51/ 3815 24 17



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

A senhora está sendo convidada a participar da pesquisa intitulada “**Polimorfismos em genes pró e anti-inflamatórios candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e trabalho de parto pré-termo**” tem como objetivo entender participação da herança genética, que é passada de pais para filhos, na presença de complicações importantes na gestação como o rompimento das bolsas das águas prematuramente assim como o parto antes do tempo. Essa pesquisa será realizada pela pós-graduanda Bruna Ribeiro de Andrade Ramos do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, orientada pela Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva, também do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP além de outros pesquisadores colaboradores.

Fui informada que estarei constituindo o **grupo controle** da pesquisa por não ter apresentado complicações gestacionais. Assim concordo que seja realizada tanto em mim como em meu(s) filho(s) nascido(s) de gestação(ões) de termo a coleta de material bucal utilizando-se um cotonete. Estou ciente de que essa coleta de material bucal não é dolorosa e o desconforto se restringe à pressão do cotonete contra a bochecha, não ocasionando sangramentos nem feridas locais. Adicionalmente, responderei a um breve questionário, que levará de 5 a 10 minutos.

Eu,, após ser devidamente esclarecida, aceito participar do projeto de pesquisa, juntamente com meu(minha) filho(a), podendo a qualquer momento esclarecer dúvidas e desistir de participar do mesmo, sem prejuízo ao atendimento que necessitarmos. Também fui informada de que nossos nomes não aparecerão quando os resultados forem divulgados. Estou ciente ainda de que não receberemos qualquer ajuda financeira para a participação no projeto, entretanto haverá o ressarcimento do transporte para a vinda ao hospital, para coleta do material, quando necessário. Estou ciente também de que este trabalho não trará benefícios imediatos para mim ou para meu(s) filho(s), mas será importante para o entedimento de complicações que podem ocorrer na gestação.

Qualquer dúvida adicional, vocês poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do telefone (14) 3811 6143. Esse documento, após a aprovação do CEP, será elaborado em 2 vias, sendo uma entregue aos sujeitos da pesquisa e outra será mantida em arquivo do pesquisador.

Botucatu, de de 2011.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura do Pesquisador
Niele Dias Mendes

Endereço: Rua Dr. Ranimiro Lotufo, 593 Apto 14A, Botucatu
Telefone (14) 3814 58 48

Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Endereço do Pesquisador: Rua Izidoro Bertaglia, 746 – Jardim Chácara dos Pinheiros
Telefone (14) 3815 25 51/ 3815 24 17

Data _____

Amostra _____

Questionário

Projeto: “Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e ao trabalho de parto pré-termo”

Paciente: _____

Idade: _____

Etnia reportada: _____

RG: _____

Filho: _____

Idade: _____

Data nascimento: _____

RG: _____

Acompanhamento médico: Sim _____ Não

1) Existe histórico familiar de TPP ou RPM? Grau de parentesco?

Sim ____ Não Parentesco: _____

2) Possui história anterior de TPP, RPM ou outras complicações?

G __ P __ A __ C __ TPP anterior __ RPM anterior __

Complicações: _____

3) Uso de álcool, drogas ou tabagismo? Frequência?

Sim _____ Não

4) Possui alguma doença sistêmica?

Sim _____ Não

5) Informações adicionais

6) Contato: _____

Data _____

Controle _____

Questionário

Projeto: "Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e ao trabalho de parto pré-termo"

Paciente: _____

Idade: _____

Etnia reportada: _____

RG: _____

Estado Civil:

Solteira

Casada/União estável

Escolaridade: _____

Filho: _____

Idade: _____

Data nascimento: _____

RG: _____

Acompanhamento médico: Sim _____

Não

2) Possui história prévia de TPP, RPM ou outras complicações?

G_P_A_C_ TPP anterior___ RPM anterior___

Complicações: _____

3) Uso de álcool, drogas ou tabagismo? Frequência?

Sim _____

Não

4) Possui alguma doença sistêmica?

Sim _____

Não

5) Informações adicionais

6) Contato: _____