



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

**Polimorfismos de Genes Pró e Anti-
inflamatórios Candidatos à Predisposição à
Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo e
ao Trabalho de Parto Pré-Termo.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de
Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Steven Witkin

**Botucatu
2015**

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

**Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios
candidatos à predisposição à rotura prematura de
membranas pré-termo e ao trabalho de parto pré-
termo.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Steven Witkin

Botucatu
2015

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

**Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios
candidatos à predisposição à rotura prematura de
membranas pré-termo e ao trabalho de parto pré-
termo.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Patologia.

**Botucatu
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Ramos, Bruna Ribeiro de Andrade.

Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios
candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas
pré-termo e ao trabalho de parto pré-termo / Bruna Ribeiro
de Andrade Ramos. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Márcia Guimarães da Silva
Coorientador: Steven Witkin
Capes: 40103005

1. Hereditariedade. 2. Agentes anti-inflamatórios. 3.
Trabalho de parto. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Membranas
fetais, Ruptura prematura.

Palavras-chave: Marcadores de ancestralidade; Polimorfismos
de base única; Resposta Inflamatória; Rotura prematura de
membranas pré-termo; Trabalho de parto pré-termo.

Resumo

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, ancestralidade e a patogênese do TPP e da RPM-PT permanece alusiva. **Objetivo:** Determinar a associação entre marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes da Interleucina-1 beta (*IL1B*), *IL6*, Receptor de IL6 (*IL6R*), Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNFA*), Receptor de TNF alpha (*TNFR*), *IL10*, Receptor Toll-like 2 (*TLR2*), *TLR4*, Metaloproteinase 9 (*MMP9*), Inibidor de Metaloproteinase 1 (*TIMP1*) e *TIMP2* maternos e fetais e o TPP e a RPM-PT. **Pacientes e Métodos:** Foram coletados *swabs* bucais de gestantes com TPP e/ou RPM-PT e DE seus filhos (TPP: 137 mulheres e 88 filhos; RPM-PT: 64 mulheres e 44 filhos) atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, entre os anos de 2003 e 2014. O grupo controle foi constituído por 201 mulheres que tiveram gestações resolvidas a termo e seus 201 filhos, pareadas ao grupo caso por idade materna e sexo do recém-nascido. O DNA total foi extraído dos *swabs* bucais e submetido à identificação de AIMs por análise de fragmentos e genotipagem de SNPs utilizando *Taqman® SNP Genotyping Assays* (Applied Biosystems) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O *software* Structure v2.3.4 foi utilizado para estimar mistura étnica materna. Teste de desequilíbrio de ligação e proporção da Hardy-Weinberg foram testados com Genepop 3.4 e haplótipos inferidos com Phase. Os dados sociodemográficos e biológicos foram comparados utilizando os testes de χ^2 , teste exato de Fisher, Regressão Logística, Manova, Mann-Whitney e Odds Ratio. **Resultados:** Nas amostras maternas, o TPP foi associado a maior ancestralidade europeia e hábito

tabagista, enquanto maior ancestralidade africana foi protetora para este fenótipo. Ainda em relação à ancestralidade, a etnia autodeclarada só explicou 20% e 15% da variação global das contribuições africana e europeia, respectivamente. Os alelos fetais *IL10-592 C* e *IL10-819 C* também foram associados ao TPP. A presença dos alelos *IL10-1082 G* e *TLR2 A* nas amostras maternas aumentou o risco de RPM-PT, enquanto o alelo *TNFA-238 A* apresenta papel protetor. O haplótipo *IL10-1082A-819T-592A* foi mais frequente no grupo controle e *TNFA-308A-238G* no grupo TPP. História familiar de TPP e/ou RPM-PT foi significativamente maior no grupo caso, e o período de latência após TPP ou RPM-PT foi influenciado pela presença de *IL1B-31 T* e *TLR4-299 G*. **Conclusão:** Existe associação entre maior ancestralidade europeia e hábito tabagista e o TPP. A presença de SNPs que modificam a resposta inflamatória aumenta a susceptibilidade à RPM-PT. A associação entre histórico familiar de TPP/RPM-PT e sua ocorrência reforça o papel da predisposição genética nas intercorrências estudadas. Adicionalmente, a etnia autodeclarada não é um método classificatório confiável para a população brasileira e há necessidade de investigação de AIMs em estudos de doenças com base genética.

Abstract

Abstract

Introduction: A genetic predisposition to Preterm Labor (PTL) and Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM) has been suggested; however the relevance of polymorphisms and ancestry to susceptibility to PTL and PPRM in different populations remains unclear. **Objective:** To evaluate the association between Ancestry Informative Markers (AIM) and Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Interleukin-1 beta (*IL1B*), *IL6*, IL6 Receptor (*IL6R*), Tumor Necrosis Factor Alpha (*TNFA*), TNF Receptor (*TNFR*), *IL10*, Toll Like Receptor 2 (*TLR2*), *TLR4*, Metalloproteinase 9 (*MMP9*), Tissue Inhibitors of Metalloproteinase 1 (*TIMP1*) and *TIMP2* genes and the susceptibility to PTL and PPRM in Brazilian women. **Patients and Methods:** Oral swabs were collected from women with PTL and/or PPRM and their babies (PTL: 137 women and 88 babies; PPRM: 64 women and 44 babies) seen at the Botucatu Medical School's Hospital, between 2003 and 2014. Control group included 402 mother-babies pairs of term deliveries, matched to case group by age and newborn gender. After DNA extraction, AIMs were identified by fragment analysis and SNPs by Taqman® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems) and *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The software Structure v2.3.4 was used to estimate ethnic admixture of mothers. Linkage Disequilibrium and Hardy-Weinberg proportions were tested with Genepop 3.4 and haplotypes inferred using Phase. Mann-Whitney, χ^2 , Fisher's exact test, Logistic Regression models, Odds Ratio and Manova were used in data analysis. **Results:** Regarding maternal samples, PTL was associated to European ancestry and smoking and African ancestry was protective. Regarding ancestry analysis, self-reported ethnicity only explained 20% and 15% of the global variation in African and European contributions, respectively. Fetal *IL10-592 C* and *IL10-819 C* were also associated to PTL. Maternal alleles *IL10-1082 G* and *TLR2 A* increased the risk for

PPROM while *TNFA*-238 A was protective. The haplotype *IL10*-1082A-819T-592A was associated to controls and *TNFA*-308A-238G to PTL. Family history of PTL/PPROM was higher in cases, and delivery latency was influenced by *IL1B*-31 T and *TLR4*-299 G. **Conclusion:** We show association between European ancestry and smoking habits and PTL. The presence of SNPs that modify the inflammatory response increase the susceptibility to PPRM. The association with family history of PTL/PPROM reinforces a role for genetic polymorphisms in susceptibility to these outcomes. Moreover, the self-reported ethnicity is not a reliable indicator of genomic ancestry in Brazilian population and that the evaluation of AIMS can be of great value in assessments of genetic-based diseases.

Abreviaturas e Siglas

Abreviaturas e Siglas

ASK1	Quinase 1 regulatória da sinalização de apoptose
COX2	Ciclooxigenase 2
HLA	Antígeno leucocitário humano
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL1RN	Antagonista do receptor da interleucina 1
IFN- γ	Interferon gama
IMC	Índice de massa corpórea
I κ B	Inibidor do fator de transcrição nuclear κ B
LA	Líquido amniótico
MMP	Metaloproteinase
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
NF κ B	Fator de transcrição nuclear κ B
NK	Células Natural Killers
p38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PG	Prostaglandina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM-PT	Rotura prematura de membranas pré-termo
TIMP	Inibidor da metaloproteinase
TLR	Toll-like receptor
Th	T helper
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
TPP	Trabalho de parto pré-termo

Sumário

Sumário

Capítulo I – Revisão de Literatura

1. Introdução	01
1.1. Bases imunológicas da gestação e do trabalho de parto a termo	01
1.2. Trabalho de Parto Pré-Termo (TPP) e Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT)	08
1.3. Polimorfismos de nucleotídeo único e marcadores informativos de ancestralidade no TPP e na RPM-PT.	15
2. Referências	21

Capítulo II – Artigos Científicos

1. Artigo I	32
1.1. Abstract	33
1.2. Introduction	34
1.3. Methods	35
1.4. Results	38
1.2. Discussion	41
1.3. Conclusion	45
1.4. References	47
1.5. Tables	51
2. Artigo II	56
2.1. Abstract	57
2.2. Introduction	58
2.3. Patients and Methods	60
2.4. Results	61
2.5. Discussion and Conclusion	64
2.6. References	67

Conclusão	69
------------------	----

Anexos	70
---------------	----

Capítulo I

Revisão de Literatura

Bases Imunológicas da Gestação e do Trabalho de Parto a Termo

A gestação é uma fase caracterizada por alterações fisiológicas, hormonais e imunológicas do organismo materno. O embrião implantado é um aloenxerto e para que a mulher se adapte a essa nova condição e a gestação seja viável, é necessário que ocorra um complexo e dinâmico balanço entre mediadores da resposta imune, que se modifica ao longo de todo o período gestacional.

No início da gestação, as células mais abundantes na interface materno-fetal são células *Natural Killers* decíduais (dNK). Este grupo celular difere das células NK circulantes molecularmente e também quanto ao seu perfil transcricional. A maior parte das NK circulantes apresenta as moléculas de superfície CD56^{bright} e CD16⁺, enquanto as dNK apresentam CD56^{bright} e CD16⁻ (1) e expressam maior variedade de citocinas e fatores angiogênicos quando comparadas às NK circulantes (2-4). A principal função dessas células é remodelar as arteríolas espiraladas da decídua em vasos de baixa resistência para permitir a perfusão das vilosidades coriônicas e as consequentes trocas nutricionais e gasosas entre embrião e organismo materno. A deficiência no remodelamento das arteríolas espiraladas é a base fisiopatológica da pré-eclâmpsia e da restrição de crescimento intra-uterino (5).

As células dNK são pouco citotóxicas quando comparadas às NK circulantes (6). Ainda assim, a inibição do seu efeito citotóxico é essencial para o desenvolvimento normal da gestação. Células trofoblásticas produzem citocinas anti-inflamatórias que aumentam a expressão de receptores inibidores na superfície destas células - os *Killer Inhibitory Receptors* - KIR, suprimindo sua citotoxicidade (7). A atividade NK também é inibida pelo fator bloqueador induzido pela progesterona, sintetizado por linfócitos T a

partir da ação do hormônio progesterona sobre este grupo celular (8, 9). A falta de inibição da atividade citotóxica está relacionada a casos de abortos recorrentes, hipótese reforçada pela observação de número elevado de células NK ativadas na decídua de pacientes com esta complicação (10).

Em condições fisiológicas, diversos mecanismos garantem a tolerância imunológica observada no compartimento materno-fetal, que impede a rejeição ao aloenxerto e permite o desenvolvimento embrionário. A camada trofoblástica interna, o citotrofoblasto, não expressa moléculas de HLA classe I ou classe II e, portanto, não é alvo de resposta citotóxica. Entretanto, a região externa do trofoblasto, o sinciotrofoblasto, expressa em sua superfície moléculas de HLA-C, HLA-E e HLA-G – tipos de molécula de HLA classe I – de origem paterna. Essa expressão induz à produção de anticorpos bloqueadores do tipo imunoglobulina G (IgG) que se ligam às células trofoblásticas. Estes anticorpos não possuem a capacidade de ativar o complemento devido à glicosilação de uma de suas regiões Fab, que resulta em uma conformação assimétrica. Desta maneira, a ligação de anticorpos bloqueadores às células de origem embrionária não leva aos eventos de *clearance* antigênico e fagocitose normalmente mediados por IgGs, o que resultaria em rejeição fetal, ao contrário, protege o trofoblasto da resposta citotóxica materna (11).

Outras populações celulares como macrófagos e células T (CD8+, CD4+) também são integrantes importantes dos leucócitos presentes na interface materno-fetal (12). Os macrófagos estimulados desempenham papel na fase inicial de ativação de NKs, enquanto linfócitos T são os principais responsáveis pela secreção das moléculas envolvidas na regulação e manutenção gestacional (13, 14). Os leucócitos também atuam nas cascatas desencadeadoras do trabalho de parto (15, 16).

O paradigma de que o sucesso da gestação dependia do predomínio de resposta imune de perfil Th2, enquanto a resposta imune de perfil Th1 era associada a resultados gestacionais adversos, foi aceito por muitos anos pela comunidade científica (17, 18). Atualmente, reconhece-se a importância do balanço entre os padrões Th1 e Th2 de resposta para a manutenção da gestação. Adicionalmente, estudos recentes indicam a participação de outros tipos celulares, diferenciados a partir de células T *helper* indiferenciadas (Th0) em células produtoras de IL-17 – chamadas Th17 – e em células CD4⁺ CD25⁺ – denominadas T regulatórias (Treg) – na manutenção da homeostasia durante a gestação (19, 20). Estes grupos celulares devem auxiliar na regulação da resposta imune, entretanto, pouco se conhece a respeito de sua influência em gestações saudáveis. Estudos sugerem que a IL-17 possa ter papel na angiogênese durante a implantação embrionária (21, 22). Corroborando para esta hipótese, Saito et al. (19) detectaram elevada população Th17 no tecido decidual em comparação a amostras de sangue periférico de gestantes saudáveis. As células Treg também se encontram em número elevado na decídua humana e acredita-se que sejam importantes na regulação da rejeição materna ao feto (23-25) e na modulação do balanço Th1/Th2/Th17 através da inibição da proliferação celular e do bloqueio da síntese de citocinas pró- e anti-inflamatórias (26, 27).

O primeiro trimestre da gestação é marcado pela resposta imune de perfil Th1. Nesse primeiro estágio o microambiente inflamatório torna-se necessário para permitir a remodelação das arteríolas espiraladas, o correto reparo do epitélio uterino, o qual sofre danos consequentes da implantação do feto, e a remoção de *debris* celulares. No segundo trimestre, o predomínio passa a ser da resposta imune de perfil Th2 (28, 29), com aumento de citocinas de atividade anti-inflamatória, importantes para a manutenção da gestação. No terceiro trimestre e no momento do parto, o perfil Th1

volta a ser preponderante tanto sistemicamente (30), quanto no tecido placentário (31) e no líquido amniótico (LA) (32). A partir do terceiro trimestre de gestação, níveis crescentes de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (33-36) são secretados pelos tecidos gestacionais e viabilizam o parto. Segundo Gotsch et al. (37), o trabalho de parto espontâneo é caracterizado pela superprodução de citocinas pró-inflamatórias no ambiente intrauterino.

As citocinas são polipeptídeos secretados por células da imunidade inata e adaptativa, que atuam de maneira autócrina ou parácrina sobre as diferentes células do organismo. A principal via intracelular induzida pela ativação dos receptores de superfície de citocinas é a do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Quando inativo, NF- κ B se encontra no citosol ligado à sua proteína inibidora, I κ B (38). A fosforilação do I κ B leva à liberação do NF- κ B e deixa livre sua sequência de localização nuclear, permitindo sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo celular, seu sítio de ligação ao DNA atua nas regiões promotoras de diferentes genes, como aqueles envolvidos na resposta imune e inflamatória, induzindo sua transcrição e provocando as mudanças necessárias para o desenvolvimento da resposta imune (39, 40). Durante toda a gestação, citocinas são produzidas por inúmeras células do compartimento materno-fetal, como células endometriais, deciduais, amnióticas e coriônicas, além de linfócitos e macrófagos presentes nos tecidos maternos (41, 42).

Próximo à resolução da gestação, três processos distintos, independentes e mediados por citocinas, a contratilidade miometrial, o remodelamento e apagamento cervical e o enfraquecimento e rotura das membranas fetais, viabilizam a expulsão do conceito (43). A alteração do estado de quiescência uterina para o estado contrátil é

acompanhado por substituição dos sinais anti-inflamatórios por pró-inflamatórios e pelo aumento da expressão de receptores de proteínas que promovem a contratilidade miometrial – oxitocina e prostaglandinas (PGs) – assim como pela síntese de conexina 43, proteína que garante a comunicação e ampliação do sinal contrátil nos miócitos. Durante a gestação, a progesterona mantém a quiescência miometrial através da repressão destes genes. Próximo ao termo, ocorre aumento do catabolismo deste hormônio e deslocamento da expressão das isoformas de seus receptores para a isoforma inibidora A que, em conjunto com superexpressão de membros da família de RNAs reguladores não codificantes microRNA-200, suprimem a repressão dos genes contráteis (44, 45).

Outro evento que participa do processo do parto é o enfraquecimento e rotura das membranas corioamnióticas. As membranas corioamnióticas são caracterizadas, no seu extrato histológico, por uma grande proporção de tecido conjuntivo composto majoritariamente por fibras colágenas tipo IV. Em condições normais, subpopulações leucocitárias são recrutadas para a interface materno-fetal no momento do parto e secretam enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação das fibras colágenas (16). As metaloproteinases (MMPs) têm importante função na degradação e no remodelamento das membranas fetais. São expressas na forma de pró-enzimas e sua atividade é determinada por sua expressão gênica, ativação enzimática e pela ação de seus inibidores (46). As principais MMPs descritas com importante envolvimento na rotura das membranas são MMP1, 2 e 9 (46). A MMP1 é a primeira secretada por fibroblastos do âmnio e também é sintetizada por monócitos. A MMP2 é expressa constitutivamente durante a gestação pelas células amnióticas e sofre aumento funcional durante o parto. A MMP9 é a principal MMP expressa durante o parto e sua expressão é seletiva. Uma vez ativada, cliva moléculas de laminina, fibronectina e colágeno tipo IV,

e é sintetizada por células amnióticas, trofoblásticas e deciduais. Embora tenha sido identificado o potencial papel modulador de citocinas pró-inflamatórias e endotoxinas bacterianas na expressão de MMPs (47), pouco se sabe sobre os sinais que levam à ativação dessas proteases. Por fim, mecanismos apoptóticos também ocorrem nas membranas de termo, contribuindo para o enfraquecimento do tecido e possibilitando sua rotura e desprendimento da decídua.

Finalmente, o evento de remodelamento e apagamento cervical é mediado por alterações na barreira epitelial e pela perda de colágeno através da ação de collagenases e metaloproteinases que levam a alterações na matriz extracelular. Essas alterações diminuem a força tensil do cérvix e possibilitam a dilatação cervical. O comprometimento da ação da progesterona também é importante para o apagamento cervical (48). A Figura 1 representa os eventos que culminam no trabalho de parto.

A desregulação dos mecanismos responsáveis por essas alterações está implicada em importantes intercorrências obstétricas e gestacionais como abortos recorrentes, pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, trabalho de parto pré-termo e rotura prematura de membranas pré-termo.

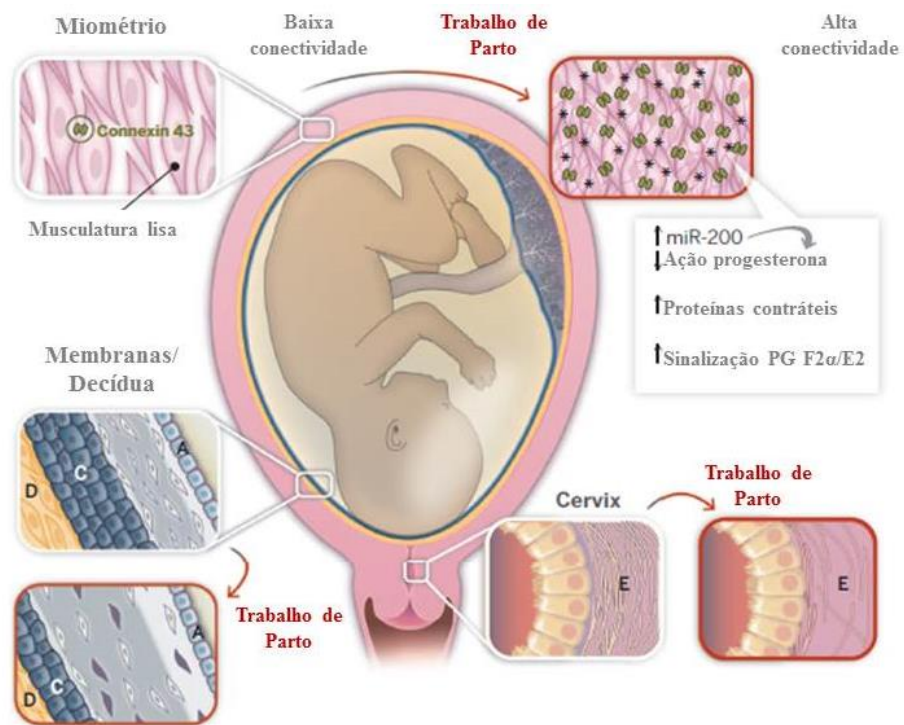


Figura 1. Eventos de contratilidade miometrial, apagamento cervical e enfraquecimento das membranas corioamnióticas que culminam no parto. Figura adaptada de Romero et al. (2013).

Trabalho de Parto Pré-Termo e Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo

O trabalho de parto pré-termo (TPP), definido como trabalho de parto em idade gestacional inferior a 37 semanas, é uma intercorrência obstétrica que acomete de 5 a 10% das gestações e constitui importante problema de saúde pública em todo o mundo (49-51). Estima-se que o TPP seja responsável por 4 milhões de óbitos neonatais/ano, atingindo custos de 12,9 milhões de dólares globalmente (52, 53).

As taxas de prematuridade variam entre diferentes regiões do globo. Em estudo multicêntrico envolvendo mais de 5 mil gestantes das 5 regiões geográficas brasileiras, a taxa de prematuridade observada foi de 12,3%, variando de 14,7% na região nordeste a 11,1% no sudeste (54). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o Brasil, juntamente com países como EUA e China, está entre os 10 países com maiores taxas de TPP, com mais de 250 mil recém-nascidos prematuros no ano de 2010. De acordo com o mais recente levantamento realizado pelo Sistema de Estatística Nacional dos EUA (NVSS), os norte-americanos registraram um decréscimo na taxa de partos prematuros entre os anos de 2012 (11,55%) e 2013 (11,39%), juntamente com uma queda da taxa de natalidade, mas ainda apresentam taxas preocupantes desta complicação (55). Fato relevante, é que apesar de o TPP ser extensamente estudado, as taxas de prematuridade não têm diminuído significativamente com o passar dos anos mesmo em países desenvolvidos.

A prematuridade decorrente do TPP refratário à tocolise é responsável por 70% dos índices de mortalidade e morbidade perinatais (56) e acarreta severas complicações para o binômio materno-fetal. Mulheres com término gestacional precoce possuem risco aumentado de apresentar complicações puerperais quando comparadas a gestantes de termo. Da mesma maneira, recém-nascidos em idade gestacional inferior a 37 semanas

têm probabilidades significativamente aumentadas de apresentar dano cerebral, displasia pulmonar, enterocolite necrosante, retinopatia, entre outras morbidades, que podem acarretar sequelas irreversíveis, diminuindo a qualidade de vida do neonato (57, 58). Quanto menor a idade gestacional ao nascimento, maiores os riscos aos quais os recém-nascidos estão expostos. De acordo com Patel et al. (58), as principais causas de morte entre nascidos com menos de 28 semanas de gestação são doenças pulmonares, imaturidade fetal, infecção, injúria do sistema nervoso central e enterocolite necrosante.

A Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) é outra complicação obstétrica comumente preditora de resultados adversos da gestação. A RPM-PT, definida como rotura das membranas fetais em idade gestacional inferior a 37 semanas, é um importante fator de risco para o TPP, estando presente em cerca de 30-40% dos casos (59). 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% (59) das gestações e em maior prevalência nas mulheres de origem hispânica ou afro-descendentes (60).

Estas complicações gestacionais possuem etiologia multifatorial e, embora importantes avanços já tenham sido alcançados nesta área, muitos aspectos concernentes à sua patogenia ainda não foram completamente elucidados. Dentre os fatores conhecidamente associados ao TPP e à RPM-PT, podemos citar patologias gestacionais (e.g. disfunções endócrinas, eclâmpsia, etc), distensão uterina (e.g. provocada por polidramnia ou gemelaridade), colo uterino curto, estresse materno, vaginose bacteriana e infecção da cavidade amniótica (61-63). Outros fatores mais sutis como fatores ambientais, comportamentais e estado nutricional materno também influenciam diretamente no desfecho gestacional podendo culminar em TPP e RPM-PT

espontâneos (Figura 2). Adicionalmente, fatores genéticos e epigenéticos podem estar implicados nessas patologias, e, nos últimos anos, vêm sendo mais amplamente investigados. É importante considerar que mais de um mecanismo pode estar presente ao mesmo tempo em pacientes acometidas pelas intercorrências citadas.

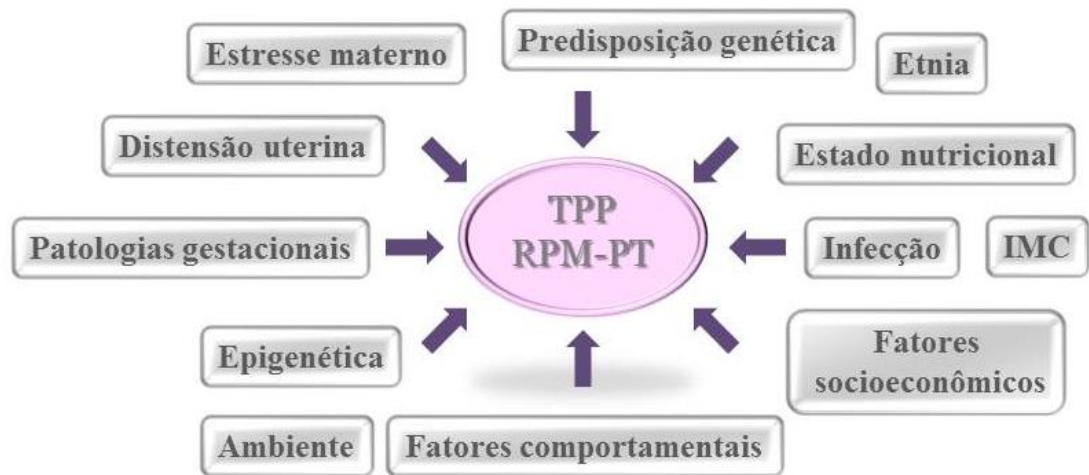


Figura 2. Fatores que influenciam o desfecho gestacional.

Em trabalho recente, Barros et al. (64) demonstraram que aproximadamente 80% dos casos de parto pré-termo podem ser categorizados em *clusters* nos quais uma condição dominante determina este desfecho – pré-eclâmpsia, multiparidade, infecção extrauterina, corioamnionite, sangramento, restrição de crescimento intra-uterino, sepse, sofrimento fetal e condições maternas desfavoráveis. Esses autores sugerem que a utilização destes *clusters* como classificadores em estudos etiológicos pode contribuir na avaliação de tratamentos e métodos preventivos. Na mesma linha de raciocínio, já foi sugerido por Romero et al. (65) que a atual uniformização no tratamento de pacientes com TPP como se esta fosse uma patologia única e homogênea pode ser um dos fatores contributórios para sua ineficácia.

Outro avanço recente no estudo da etiologia do TPP e, principalmente, da RPM-PT é o conceito de senescência das membranas corioamnióticas. Estudos demonstram que muitos dos fatores desencadeantes destas complicações, como tabagismo, infecção, desnutrição e obesidade, levam a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS), resultando na condição de estresse oxidativo. Níveis elevados de ROS levam a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (*p38 mitogen activated protein kinase* - p38 MAPK) que induz morte celular programada via quinase 1 regulatória da sinalização de apoptose (*apoptosis signal-regulating kinase* - ASK1), o que resulta em parada do ciclo celular e senescência (66). A senescência de células corioamnióticas leva a um enfraquecimento das membranas fetais, o que facilita o estabelecimento da rotura precoce das membranas fetais. Diferentemente de células apoptóticas, células senescentes permanecem nos tecidos e desencadeiam resposta inflamatória local. Evidências de senescência decidual foi demonstrada em casos de parto pré-termo, mas não em gestações resolvidas a termo (67).

Senescência celular também pode ser desencadeada pela inibição do importante processo celular de autofagia. Autofagia é um mecanismo de reciclagem de componentes celulares e atua na modulação da resposta imune responsável pela remoção de bactérias intracelulares e vírus. Foi demonstrado que a inibição deste processo, via aumento da sinalização de seu regulador negativo, o alvo da rapamicina de mamíferos - mTOR, leva a senescência tecidual precoce em ratos geneticamente modificados (68) e resulta em TPP. Estes animais possuíam níveis aumentados de ciclooxigenase 2 (COX2) e de fator sintetizante de prostaglandinas, que sintetizam PGs e consequentemente induzem contratilidade miométrial. Por outro lado, a exacerbação da autofagia parece estar associada à RPM-PT uma vez que esse desbalanço pode induzir a morte celular programada do tipo II nas membranas fetais e levar a seu

enfraquecimento (69), mais uma vez demonstrando a importância da homeostasia para o sucesso gestacional.

Uma das principais e mais bem estabelecidas causas de TPP e RPM-PT é a infecção da cavidade amniótica. Epítomos bacterianos, denominados Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPS) são reconhecidos por receptores Toll-Like (TLRs) presentes na superfície de células leucocitárias e de tecidos gestacionais (70). TLRs são proteínas transmembranas centrais para o reconhecimento de patógenos e ativação das respostas inata e adaptativa. Ao menos dez TLRs já foram descritos, sendo os TLR 1, 2, 4 e 6 expressos na decídua (71). A ativação de TLRs culmina na ativação do NF- κ B que, por sua vez, leva à transcrição de citocinas pró-inflamatórias (71), levando ao TPP e à RPM-PT (16, 72). A principal via de infecção intra-amniótica é ascendente a partir do trato genital inferior, mas a via hematológica transplacentária a partir infecções orais como periodontite ou a via iatrogênica como na amniocentese também podem ocorrer (73, 74). Após infectar as membranas, as bactérias atingem o líquido amniótico e se proliferam, voltando a se estabelecer de forma profusa nas membranas fetais (75) (Figura 3). Foi demonstrado que infecções virais podem predispor a infecções bacterianas por alterar a imunidade da mucosa do trato genital inferior e assim favorecer a via ascendente de infecção (76).

Entretanto, é importante ressaltar que a mera presença de microrganismos no ambiente uterino não necessariamente culmina em TPP ou RPM-PT, como fica evidente a partir dos relatos de colonização microbiana e de estudos de microbioma em gestações saudáveis com desfecho a termo (77-79). Muitos fatores como patogenicidade, carga do patógeno e resposta do hospedeiro, que por sua vez é geneticamente influenciada, determinam o resultado gestacional. Proteínas sintetizadas em condição de estresse

materno ou o próprio estiramento mecânico observado na gemelaridade ou resultante da condição patológica de polidramnia também induzem a via inflamatória (72).

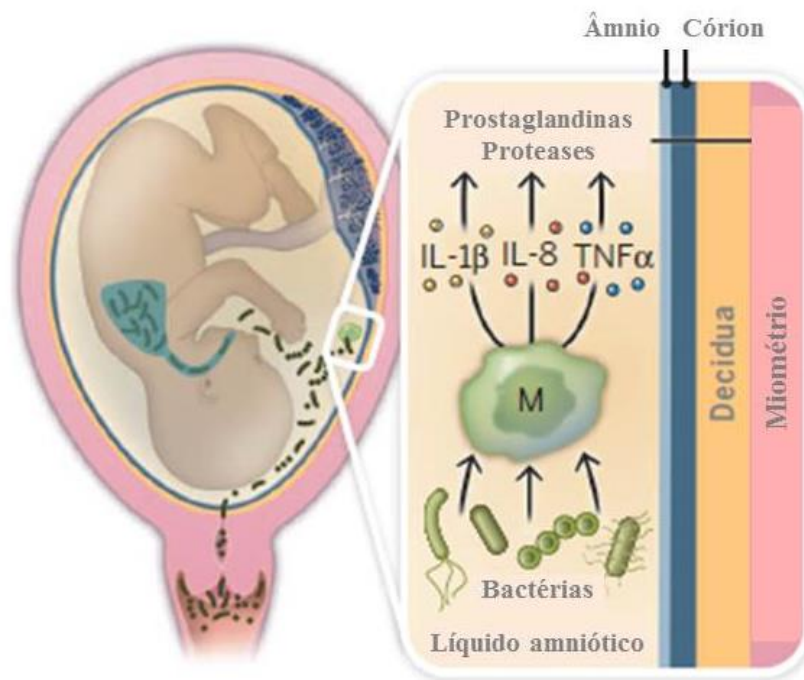


Figura 3. Via ascendente de infecção intra-amniótica e indução de mediadores que levam ao TPP e à RPM-PT. Figura adaptada de Romero et al. (2013).

Independente do fator ou fatores causais, todos, em última instância, deflagram importante resposta inflamatória com produção de citocinas (80). Esta resposta é intrínseca ao desfecho gestacional, seja este favorável ou adverso (80).

A IL-1 β é produzida por macrófagos, monócitos, células de Hofbauer e deciduais e constitui uma das principais citocinas pró-inflamatórias atuantes no TPP. Em modelo experimental, a infusão desta citocina na cavidade amniótica de primatas prenhes induziu a síntese de TNF- α e PGs, com resultante atividade uterina (81). Além de induzir à contratilidade miométrial através da síntese de prostanóides, mediada pela ativação da COX2, a IL-1 β é importante para a ativação de genes de outros mediadores pró-inflamatórios (82).

A IL-6 é secretada por células decíduais e endometriais e é considerada a principal citocina preditora do TPP estando associada também à RPM-PT (83-85). Níveis elevados de IL-6 na secreção cervical de pacientes com parto pré-termo estão relacionados com RPM-PT (83). Concentrações aumentadas desta citocina também foram detectadas no líquido amniótico de gestantes em TPP (86).

O TNF- α , a exemplo de outras citocinas pró-inflamatórias, é sintetizado por diferentes células do sistema imune e do compartimento materno-fetal. A identificação de TNF- α na decídua humana e de seus receptores nas células placentárias sugere um papel fundamental na rede de citocinas produzidas na gestação (87). Sua presença na secreção cervical de mulheres com contrações uterinas é fator preditivo de parto prematuro (88).

Próximo ao desfecho gestacional, estas citocinas, juntamente a inúmeros outros mediadores inflamatórios, conforme descrito previamente, desencadeiam a produção de PGs, endotelinas e MMPs, responsáveis por induzir os eventos que culminam no parto *per se* (72, 81, 89). No contexto biológico do TPP e da RPM-PT esta cascata é deflagrada prematuramente. Em suma, todos os fatores etiológicos destas complicações convergem para vias que resultam na presença de níveis elevados de mediadores inflamatórios nos tecidos materno-fetais, caracterizando o TPP e a RPM-PT como síndromes inflamatórias. Ainda assim, em grande parte dos casos, o fator etiológico desencadeante do TPP ou RPM-PT não pode ser identificado.

Polimorfismos de Único Nucleotídeo (SNPs) e Marcadores Informativos de Ancestralidade (AIMs) no TPP e na RPM-PT

A predisposição genética é um importante fator de risco para o TPP e a RPM-PT e vem sendo amplamente discutido na literatura. Já é consagrado que gestantes com história prévia de TPP ou RPM-PT possuem risco significativamente elevado de apresentarem recorrência destas complicações (90, 91). Da mesma maneira, mulheres que nasceram prematuras têm maior probabilidade de se tornarem gestantes acometidas por TPP ou RPM-PT (92). Estudos comparando as taxas dessas patologias em gêmeas monozigóticas estimam que a hereditariedade do TPP varie entre 15 e 40% (93).

Outro ponto que reforça este conceito é a inegável disparidade entre as taxas de prematuridade em populações de diferentes etnias (94, 95). Nos Estados Unidos e em países da Europa, por exemplo, mulheres de ascendência africana apresentam taxas mais elevadas de TPP e RPM-PT do que as de ascendência europeia, mesmo após ajuste para fatores confundidores (93, 96). Martin et al. (97) reportaram taxas de TPP de 11-12% em caucasianas e de 17-18% e afro-americanas, respectivamente. Taxas semelhantes foram reportadas em outros estudos (98, 99). Esses fatos nos permitem entrever a grande influência da predisposição genética sobre o desfecho gestacional a que pacientes serão submetidas.

Autores em todo o mundo têm buscado correlacionar a presença de variáveis gênicas específicas ao resultado gestacional adverso, na tentativa de elucidar casos de etiologia desconhecida (98, 100, 101). Os maiores alvos destas pesquisas recaem sobre os genes associados à resposta imune, seja no reconhecimento de patógenos, nas vias de ativação intracelular, ou em produtos finais da resposta imune, como genes codificadores de citocinas. Para o estudo da RPM-PT mais especificamente, se torna

imprescindível o estudo de genes codificadores de metaloproteinases, bem como de seus inibidores.

Dentre as inúmeras variações genéticas encontradas no genoma humano, podemos destacar os polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) como principal fonte de variação genômica. SNPs são considerados as alterações mais comuns no genoma humano e são definidos como substituições de um único nucleotídeo de uma sequência de DNA codificadora de uma proteína específica que podem ocorrer em qualquer sequência gênica, sendo hereditárias ou *de novo*.

Já foram descritos SNPs em muitos genes codificadores de citocinas e de outras proteínas implicadas no desfecho gestacional. Estes 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 afetar a resposta imune (102), podendo influenciar o término da gestação.

O gene codificador da IL-1 β é polimórfico e localiza-se no braço longo do cromossomo 2, banda 1, sub-banda 4 (2q14). A presença de alelos fetais específicos neste gene já foi associada ao risco aumentado de TPP em população de descendência africana (103). Contudo, diversos autores não observaram associação entre a presença de polimorfismos do *IL1B* e resultados gestacionais adversos (104, 105). O inibidor competitivo da IL-1 β , o IL-1ra, receptor antagonista da IL-1 β , tem papel fundamental na regulação da atividade biológica desta citocina. Em modelos animais, a administração da citocina anti-inflamatória IL-1ra inibe o TPP IL-1 β -induzido (106, 107). *In vitro*, a adição de IL-1ra inibe a estimulação de células amnióticas e coriônicas desafiadas com IL-1 β (108). O IL-1ra é codificado pelo gene polimórfico *IL1RN*, que

está em desequilíbrio de ligação com *IL1B*. Em doenças inflamatórias, a presença do alelo *IL1RN*2* tem sido associada à menor razão IL-1ra/IL-1β e, conseqüentemente, à maior severidade da resposta inflamatória (109, 110). Em estudo realizado no Brasil, Chaves et al. (101) encontraram correlação entre presença do alelo *IL1RN*2* e maior susceptibilidade ao TPP em população com alta prevalência desta complicação. Para Genc et al. (103), a presença deste mesmo alelo no genoma fetal está associada ao TPP na população hispânica.

O polimorfismo do gene codificador da IL-6 descrito na região promotora do *IL6* (7p21), na posição -174, influencia a produção da proteína, com o genótipo GG associado à produção aumentada da proteína e o genótipo CC associado ao decréscimo da mesma (111, 112). Em população acometida por periodontite, Dashash et al. (74) não encontraram associação significativa entre polimorfismo do gene da IL-6 e parto pré-termo. Em contrapartida, Kalinka et al. (100) descrevem que pacientes genotipadas GG e GC para o polimorfismo *IL6-174* possuem risco multiplicado de apresentar TPP quando portadoras do alelo *IL1RN*2*. Velez et al. (113), 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.

Dentre todos os polimorfismos relacionados ao TPP, o polimorfismo no promotor do gene *TNFA*, posição -308 é o mais estudado e o que apresenta a maior conjunção de evidências apontando para seu papel no resultado gestacional (102, 114-116). Portadores do alelo *TNFA* G>A, referido como alelo *TNF2*, apresentam resposta inflamatória exacerbada, produzindo níveis excessivos de TNF-α em resposta a um estímulo infeccioso. Em estudo caso-controle, Roberts et al. (117) descrevem um risco aumentado de três vezes para parto pré-termo nas gestantes portadoras deste alelo.

Ainda que de forma menos conclusiva, polimorfismos no gene do receptor de TNF- α também já foram associados ao TPP (118).

Da mesma maneira, genes polimórficos que levam à superprodução de outras citocinas pró-inflamatórias ou à sub-produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β , também têm sido associados ao parto pré-termo (119, 120), porém alguns polimorfismos têm evidências menos claras. Speer et al. (121) correlacionaram o alelo fetal mutado altamente produtor de IFN- γ , condicionado ao genótipo materno, ao TPP, mostrando a importância da interação materno-fetal e ambiental. Ainda considerando que a resposta imune é resultado da interação entre múltiplos genes polimórficos, Moura et al. (115) observaram associação entre o genótipo *TNFA*(GG)/*IL-6*(GG)/*IFNG*(AA) e a suscetibilidade ao TPP.

Vários autores também analisam a correlação entre polimorfismos em genes codificadores de receptores celulares e complicações gestacionais (87, 88, 114). TLRs desempenham papel fundamental na resposta imune materna. Assim como observamos nas moléculas descritas até aqui, apesar de serem moléculas importantes nos casos de TPP e RPM-PT (122), estudos envolvendo polimorfismos dos genes *TLR2* e *TLR4* apontam para resultados contraditórios. Krediet et al. (123) foram capazes de demonstrar a correlação entre a homozigose do alelo *TLR2* polimórfico no recém-nascido e o risco de TPP, mas não observaram associação com polimorfismo do gene *TLR4*. Outros estudos reportaram associação entre polimorfismos no gene materno *TLR4* e o risco aumentado de TPP (124, 125).

Durante a RPM-PT acredita-se que haja desregulação dos mecanismos de degradação da matriz extracelular das membranas fetais, o que conduziria à sua rotura precoce (59). Diversos polimorfismos foram descritos nos genes das MMPs, incluindo polimorfismos na região promotora. Em estudo de polimorfismos funcionais nesta

região do gene *MMP9*, Ferrand et al. (126) encontraram maior prevalência da repetição CA na região -55 a -13 em recém-nascidos de RPM-PT quando comparados a recém-nascidos de termo. Em outro estudo, autores descrevem maior prevalência do alelo polimórfico metilado da região promotora do gene *MMP1* em gestações complicadas por RPM-PT (127). Contudo, estudos relatando associações entre *MMP2* polimórficos e intercorrências gestacionais restringem-se a complicações como restrição de crescimento intrauterino (128).

Outro grupo de moléculas integrante das vias desencadeadoras da RPM-PT e do TPP, os inibidores teciduais de MMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases - TIMPs), têm importante função na contra-regulação dessas proteases. Em estudo caso-controle, Romero et al. (99) encontraram forte associação entre a presença de um SNP sinônimo em *TIMP2* no genoma materno e o risco de TPP em pacientes com membranas íntegras.

Polimorfismos em genes envolvidos em outras vias também já foram associados a casos de TPP ou RPM-PT. Foi reportada associação entre alelos polimórficos na posição rs4686302 do gene codificador da proteína contrátil oxitocina e efeito na idade gestacional em pacientes com TPP (129) e também do gene da IL-12, citocina necessária para diferenciação das células NK (130). Entretanto, a maior dificuldade na interpretação destes trabalhos e sua adaptação para a prática clínica talvez seja a falta de reprodutibilidade dos resultados apresentados na literatura.

Apesar das discrepâncias observadas nas taxas de TPP e RPM-PT entre diferentes etnias, raros são os trabalhos que investigam as bases biológicas dessa diferença. Grande parte dos estudos que descrevem as taxas destas patologias em distintos grupos étnicos se restringe a utilizar dados subjetivos como a etnia autodeclarada. Especialmente no Brasil, cuja população é caracterizada por cinco séculos de miscigenação entre povos de quatro continentes – Europeu, Africano, Americano

(nativos ou ameríndios) e, mais recentemente, Ásia – a utilização da etnia auto reportada não necessariamente corresponde à ancestralidade genética. De fato, trabalhos mostram que a definição étnica baseada em traços físicos ou mesmo em origem familiar não categorizam de forma eficiente a ancestralidade biológica (131, 132). É possível que grande parte da inconsistência de resultados quanto aos genes polimórficos influenciadores de complicações gestacionais observada na literatura seja advinda da falta de apuração da ancestralidade genética e de correção de resultados por tal fator confundidor.

Todos os estudos nesta área apontam para a influência da interação entre genes polimórficos na patogênese do TPP e da RPM-PT, porém suas específicas associações permanecem alusivas. Ainda, apesar do acúmulo de evidências apontando para o efeito da ancestralidade sobre essas patologias, este assunto praticamente não foi investigado sob o ponto de vista biológico. Dessa maneira, a identificação de polimorfismos em genes pró e anti-inflamatórios em gestantes acometidas por TPP e RPM-PT e a investigação da influência da ancestralidade sobre estes desfechos é de particular interesse no âmbito clínico-obstétrico. Com estas ferramentas, será possível contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos genéticos subjacentes a estas complicações gestacionais e, no futuro, possibilitar a identificação de pacientes com maior predisposição a complicações e rastreá-las ao longo da gestação, minimizando assim efeitos deletérios advindos da prematuridade.

Referências

1. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003;198:1201–12.
2. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of uterine NK cells. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:434–44.
3. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update* 2012;18:458–71.
4. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 2006;12:1065–74.
5. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational-age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93:1049–59.
6. Rai R, Sacks G, Trew G. Natural Killer cells and reproductive failure – theory, practice and prejudice. *Human Reprod* 2005;20:1123-26.
7. Rouas-Freiss N, Gonçalves RM, Menier C, Dausset J, Carossella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:11520-25.
8. Szekeres-Bartho J, Faust ZS, Varga P, Szereday L, Kelemen K. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol* 1996;35:348-51.
9. Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L et al. Progesterone-dependent Immunomodulation. *Chem Immunol Allergy* 2005;89:118-25.
10. Hammer A, Hutter H, Blaschitz A, Mahnert W, Hartmann M, Uchanska-Ziegler B et al. Amnion epithelial cells, in contrast to trophoblast cells, express all classical HLA class I molecules together with HLA-G. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:161-71.
11. Gutierrez G, Gentile T, Miranda S, Margni RA. Asymmetric antibodies: a protective arm in pregnancy. *Chem Immunol Allergy* 2005;89:158-68.
12. Huddleston H, Schust DJ. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. *Am J Reprod Immunol* 2004;51:283-89.
13. Michelon T, Silveira JG, Graudenz M, Neumann J. Pregnancy Immunology. *Revista AMRIGS* 2006;50:145-51.
14. Gomez-Lopez N, Guilbert LJ, Olson DM. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J Leukoc Biol* 2010;88:625-33.

*Referências elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47.

15. Vega-Sanchez R, Gomez-Lopez N, Flores-Pliego A, Clemente-Galvan S, Estrada-Gutierrez G, Zentella-Dehesa A et al. Placental blood leukocytes are functional and phenotypically different than peripheral leukocytes during human labor. *J Reprod Immunol* 2010;84:100-10.
16. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol* 2008;79:50-57.
17. Raghupathy R. Maternal anti-placental cell-mediated reactivity and spontaneous abortions. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:478-84.
18. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-56.
19. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601-10.
20. Peck A, Mellins ED. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. *Immunology* 2010;129:147-53.
21. Pongcharoen S, Somran J, Sritippayawan S, Niumsup P, Chanchan P, Butkhamchot P et al. Interleukin-17 expression in the human placenta. *Placenta*. 2007;28:59-63.
22. Pongcharoen S, Supalap K. Interleukin-17 increased progesterone secretion by JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Am J Reprod Immunol* 2009;61:261-64.
23. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004;10:347-53.
24. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004;112:38-43.
25. Zhao JX, Zeng YY, Liu Y. Fetal alloantigen is responsible for the expansion of the CD4(+)CD25(+) regulatory T cell pool during pregnancy. *J Reprod Immunol* 2007;75:71-81.
26. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.
27. Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. The dynamic co-

evolution of memory and regulatory CD4⁺ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2007;7:231-37.

28. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol* 2003;49:308-18.

29. El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R. Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes. *Am J Reprod Immunol* 2004;52:45-52.

30. Arntzen KJ, Lien E, Austgulen R. Maternal serum levels of interleukin-6 and clinical characteristics of normal delivery at term. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1997;76:55-60.

31. Kumazaki K, Nakayama M, Yanagihara I, Suehara N, Wada Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum Pathol* 2004;35:47-54.

32. von Dadelszen P, Watson RW, Noorwali F, Marshall JC, Parodo J, Farine D et al. Maternal neutrophil apoptosis in normal pregnancy, preeclampsia, and normotensive intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:408-14.

33. Gustafsson C, Hummerdal P, Matthiesen L, Berg G, Ekerfelt C, Ernerudh J. Cytokine secretion in decidual mononuclear cells from term human pregnancy with or without labour: ELISPOT detection of IFN-gamma, IL-4, IL-10, TGF-beta and TNF-alpha. *J Reprod Immunol* 2006;71:41-56.

34. Dudley DJ, Collmer D, Mitchell MD, Trautman MS. Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor. *J Soc Gynecol Investig* 1996;3:328-35.

35. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Spitz B. Vaginal cytokines in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1433-38.

36. Houben ML, Nikkels PG, van Bleek GM, Visser GH, Rovers MM, Kessel H et al. The association between intrauterine inflammation and spontaneous vaginal delivery at term: a cross-sectional study. *PLoS One* 2009;4:e6572.

37. Gotsch F, Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP et al. The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2009;22:5-23.

38. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:49-62.
39. Abbas A, Lichtman A, Pilai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltda; 2008.
40. Cookson VJ, Chapman NR. NF-kappaB function in the human myometrium during pregnancy and parturition. *Histol Histopathol* 2010;25:945-56.
41. Chow SS, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR et al. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. *Cytokine* 2008;44:78-84.
42. Saji F, Samejima Y, Kamiura S, Sawai K, Shimoya K, Kimura T. Cytokine production in chorioamnionitis. *J Reprod Immunol* 2000;47:185-96.
43. Peltier MR. Immunology of term and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:122.
44. Renthal NE, Williams KC, Mendelson CR. MicroRNAs--mediators of myometrial contractility during pregnancy and labour. *Nat Rev Endocrinol* 2013;9:391-401.
45. Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod* 2001;7:875-79.
46. Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG* 2005;112:19-22.
47. Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F. Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system. *Biol Reprod* 2002;67:1952-58.
48. Mahendroo M. Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model. *Reproduction* 2012;143:429-38.
49. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
50. 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;114:731-35.

51. 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;192:1325-29.
52. Callaghan WM, MacDorman MF, Rasmussen SA, Qin C, Lackritz EM. The contribution of preterm birth to infant mortality rates in the United States. *Pediatrics* 2006;118:1566–73.
53. Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization* 2010;88:31–38.
54. Passini R Jr, Cecatti JG, Lajos GJ, Tedesco RP, Nomura ML, Dias TZ et al. Brazilian multicentre study on preterm birth (EMIP): prevalence and factors associated with spontaneous preterm birth. *PLoS One* 2014;9:e109069.
55. Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJ. Births in the United States, 2013. *NCHS Data Brief*. 2014;175:1-8.
56. McCormick MC. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 1985;312:82-90.
57. 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;41:229-37.
58. Patel RM, Kandefer S, Walsh MC, Bell EF, Carlo WA, Laptook AR. Causes and timing of death in extremely premature infants from 2000 through 2011. *N Engl J Med* 2015;372:331-40.
59. Parry S, Strauss JF 3rd. Premature rupture of the fetal membranes. *N Engl J Med* 1998;338:663-70.
60. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-07.
61. 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;46:389-94.
62. 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;127:145-59.
63. Ancel PY. Perspectives in the prevention of premature birth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;117:2-5.

64. Barros FC, Papageorgiou AT, Victora CG, Noble JA, Pang R, Iams J et al. The distribution of clinical phenotypes of preterm birth syndrome: implications for prevention. *JAMA Pediatr* 2015;169:220-29.
65. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* 2014;345:760-65.
66. Menon R, Boldogh I, Urrabaz-Garza R, Polettini J, Syed TA, Saade GR et al. Senescence of primary amniotic cells via oxidative DNA damage. *PLoS One* 2013;8:e83416.
67. Cha J, Bartos A, Egashira M, Haraguchi H, Saito-Fujita T, Leishman E et al. Combinatory approaches prevent preterm birth profoundly exacerbated by gene-environment interactions. *J Clin Invest* 2013;123:4063-75.
68. Hirota Y, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:18073–78.
69. Kanninen TT, de Andrade Ramos BR, Witkin SS. The role of autophagy in reproduction from gametogenesis to parturition. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;171:3-8.
70. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:587-600.
71. Patni S, Flynn P, Wynen LP, Seager AL, Morgan G, White JO et al. An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG* 2007;114:1326-34.
72. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition - a review. *Placenta* 2003;24:33-46.
73. Madianos PN, Bobetsis YA, Offenbacher S. Adverse pregnancy outcomes and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Periodontol* 2013;84:170-80.
74. 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;28:237-43.
75. Kim MJ, Romero R, Gervasi MT, Kim JS, Yoo W, Lee DC et al. Widespread microbial invasion of the chorioamniotic membranes is a consequence and not a cause of intra-amniotic infection. *Lab Invest* 2009;89:924-36.

76. Racicot K, Cardenas I, Wünsche V, Aldo P, Guller S, Means RE et al. Viral infection of the pregnant cervix predisposes to ascending bacterial infection. *J Immunol* 2013;191:934-41.
77. Cao B, Stout MJ, Lee I, Mysorekar IU. Placental microbiome and its role in preterm birth. *Neoreviews* 2014;15:537-45.
78. McDonagh S, Maidji E, Ma W, Chang HT, Fisher S, Pereira L. Viral and bacterial pathogens at the maternal-fetal interface. *J Infect Dis* 2004;190:826-34.
79. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG* 2002;109:527-33.
80. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006;113:17-42.
81. 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;3:121-26.
82. Axemo P, Brauner A, Pettersson M, Eriksson L, Rwamushaija E, Bergstrom S. Amniotic fluid interleukins in Swedish and Mozambican pregnant women. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:113-17.
83. 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;171:1097-102.
84. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol* 2000;95:1056-64.
85. 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;82:423-31.
86. 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;178:546-50.
87. Eades DK, Cornelius P, Pekala PH. Characterization of the tumour necrosis factor receptor in human placenta. *Placenta* 1988;9:247-51.

88. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K, Lescale K, Peeper Q, Chervenak FA et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
89. Kamel RM. The onset of human parturition. *Arch Gynecol Obstet* 2010;281:975-82.
90. 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. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;181:1216-21.
91. Adams MM, Elam-Evans LD, Wilson HG, Gilbertz DA. Rates of and factors associated with recurrence of preterm delivery. *Jama* 2000;283:1591-96.
92. Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The risk of preterm birth across generations. *Obstet Gynecol*. 1997;90:63-67.
93. Muglia LJ, Katz M. The enigma of spontaneous preterm birth. *N Engl J Med* 2010;362:529-35.
94. 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;196:1-6.
95. 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;62:107-18.
96. Jaffe S, Normand N, Jayaram A, Orfanelli T, Doulaveris G, Passos M et al. Unique variation in genetic selection among Black North American women and its potential influence on pregnancy outcome. *Med Hypotheses* 2013;81:919-22.
97. Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF. Annual summary of vital statistics-2003. *Pediatrics* 2005;115:619-34.
98. 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;195:1240-48.
99. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:1-34.

100. Kalinka J, Bitner A. Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women. *Ginekol Pol* 2009;80:111-17.
101. Chaves JH, Babayan A, Bezerra de 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;60:312-17.
102. Himes KP, Simhan HN. Genetic susceptibility to infection-mediated preterm birth. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22:741-53.
103. Genc MR, Gerber S, Nesin M, Witkin SS. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:157-63.
104. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, McDonald HM. Polymorphisms in immunoregulatory genes and the risk of histologic chorioamnionitis in Caucasoid women: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2005;5:4.
105. Gebhardt S, Bruiners N, Hillermann R. A novel exonic variant (221delT) in the LGALS13 gene encoding placental protein 13 (PP13) is associated with preterm labour in a low risk population. *J Reprod Immunol* 2009;82:166-73.
106. Romero R, Tartakovsky B. The natural interleukin-1 receptor antagonist prevents interleukin-1-induced preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1041-45.
107. Witkin SS, Gravett MG, Haluska GJ, Novy MJ. Induction of interleukin-1 receptor antagonist in rhesus monkeys after intraamniotic infection with group B streptococci or interleukin-1 infusion. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:1668-72.
108. Romero R, Sepulveda W, Mazor M, Brandt F, Cotton DB, Dinarello CA et al. The natural interleukin-1 receptor antagonist in term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:863-72.
109. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;154:2434-40.
110. Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on disease. *Clin Infect Dis* 2002;34:204-09.
111. 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;102:1369-76.

112. 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;18:267-70.
113. 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;200:1-27.
114. Pu J, Zeng WY. Gene polymorphism of tumor necrosis factor-alpha promoter region in -308 site and premature births in Chinese Han populations. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007;38:984-86.
115. Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Goncalves-Primo A, Daher S. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 2009;80:115-21.
116. Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *BJOG* 2005;112:28-31.
117. Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA et al. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor alpha gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1297-302.
118. Menon R, Velez DR, Simhan H, Ryckman K, Jiang L, Thorsen P et al. Multilocus interactions at maternal tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-6 receptor genes predict spontaneous preterm labor in European-American women. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194:1616-24.
119. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
120. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta inhibit amniochorion tumor necrosis factor-alpha production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implications in prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:803-09.
121. Speer EM, Gentile DA, Zeevi A, Pillage G, Huo D, Skoner DP. Role of single nucleotide polymorphisms of cytokine genes in spontaneous preterm delivery. *Hum Immunol* 2006;67:915-23.
122. Wang H, Hirsch E. Bacterially-induced preterm labor and regulation of

prostaglandin-metabolizing enzyme expression in mice: the role of toll-like receptor 4. *Biol Reprod* 2003;69:1957-63.

123. Krediet TG, Wiertsema SP, Vossers MJ, Hoeks SB, Fler A, Ruven HJ et al. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatr Res* 2007;62:474-76.

124. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002;52:373-76.

125. Lukaszewski T, Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Kurzawinska G, Mrozikiewicz PM, Sieroszewski P et al. Polymorphism in the genes of Toll-like receptors type 2 and type 4 (TLR-2 and TLR-4) and the risk of premature rupture of the membranes - preliminary study. *Ginek Pol* 2009;80:914-19.

126. Ferrand PE, Parry S, Sammel M, Macones GA, Kuivaniemi H, Romero R et al. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Mol Hum Reprod* 2002;8:494-501.

127. Wang H, Ogawa M, Wood JR, Bartolomei MS, Sammel MD, Kusanovic JP et al. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum Mol Genet* 2008;17:1087-96.

128. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfeld P, Vial Y, Witkin SS et al. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol* 2007;74:143-51.

129. Kim J, Stirling KJ, Cooper ME, Ascoli M, Momany AM, McDonald EL. Sequence variants in oxytocin pathway genes and preterm birth: a candidate gene association study. *BMC Med Genet* 2013;14:77.

130. Harmon QE, Engel SM, Olshan AF, Moran T, Stuebe AM, Luo J et al. Association of polymorphisms in natural killer cell-related genes with preterm birth. *Am J Epidemiol* 2013;178:1208-18.

131. Cardena MM, Ribeiro-dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One* 2013;8:e62005.

132. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:177-82.

Capítulo II

Artigo Científico I

The influence of ancestry informative markers (AIMs) and selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in immunoregulatory genes and spontaneous preterm birth: a case-control study.

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos¹, Niele Dias Mendes¹, Aline Aki Tanikawa¹, Marcos Antônio Trindade Amador², Sidney Santos², Steven S Witkin³, Márcia Guimarães da Silva¹

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

²Department of Genetics, Biological Sciences Institute, Pará Federal University – UFPA, Belém, Pará, Brazil

³Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, New York, New York, USA

Running title: SNPs and ancestry markers in spontaneous preterm birth.

*Corresponding author

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

Distrito de Rubião Júnior, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 (14) 3880 1580 Fax: +55 (14) 3815-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Abstract

Objective: To evaluate the association between Ancestry Informative markers (AIM) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IL1B*, *IL6*, *IL6R*, *TNFA*, *TNFR*, *IL10*, *TLR2*, *TLR4*, *MMP9*, *TIMP1* and *TIMP2* genes and the susceptibility to Preterm Labor (PTL) and Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM) in Brazilian women.

Design: Case-control study. **Setting:** Tertiary hospital in São Paulo State, Brazil.

Patients: Women with PTL and/or PPRM and their babies (PTL: 137 women and 88 babies; PPRM: 64 women and 44 babies). Control group included 402 mother-babies pairs of term deliveries. **Methods:** Oral swabs were collected for identification of AIMs by fragment analysis and SNPs by Taqman® SNP Genotyping Assays and PCR. **Main**

Outcome Measures: Genotypes of SNPs and identification of AIMs. **Results:** PTL was associated to European ancestry and smoking and African ancestry was protective. Fetal *IL10*-592 C and *IL10*-819 C were also associated to PTL. *IL10*-1082 G and *TLR2* A increased the risk for PPRM while *TNFA*-238 A was protective. The haplotype *IL10*-1082A-819T-592A was associated to controls and *TNFA*-308A-238G to PTL. Family history of PTL/PPROM was higher in cases, and delivery latency was influenced by *IL1B*-31 T and *TLR4*-299 G. **Conclusion:** We show association between European ancestry, smoking habits and PTL. The presence of SNPs that modify the inflammatory response increase the susceptibility to PPRM. The association with family history of PTL/PPROM reinforces a role for genetic polymorphisms in susceptibility to these outcomes.

Keywords: Preterm labor, Preterm Premature Rupture of Membranes, Inflammatory Response, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Ancestry Informative Markers (AIMs).

Introduction

Spontaneous Preterm Labor (PTL) and Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM) are major contributors to neonatal mortality and serious neonatal morbidity worldwide¹. Every year more than 10% of all deliveries around the world are preterm²⁻⁴ and these newborns have increased probability of death by 40-times fold and are considerably more prone to major long-term complications such as respiratory morbidities and cognitive delay than their term counterparts⁵. Despite all efforts to elucidate and avoid prematurity, it remains an issue hard to overcome in almost every country.

PTL and PPRM are markedly inflammatory syndromes with complex pathways interactions and no marker or treatment available to efficiently predict and treat them. It seems clear, however, that genetic predisposition can contribute to PTL and PPRM. Patients with family and/or personal history of such complications are at high risk for their re-occurrence⁶⁻⁸. The well documented discrepancy in the rates of these adverse outcomes among different ethnicities⁹⁻¹¹ also reinforces the importance of genetic variations to the development of PTL and PPRM.

As inflammatory syndromes, PTL and PPRM have been largely associated with infection and higher levels of inflammatory over anti-inflammatory mediators¹²⁻¹⁵. Functional polymorphisms can modify protein production and may influence pregnancy outcome¹⁶, especially if located within genes coding for molecules that orchestrate the process of labor such as those involved in host response to infection/inflammation and in the synthesis and degradation of extracellular matrix. Surely, many studies have already found association between SNPs located in the genes involved in the aforementioned pathways and adverse pregnancy outcomes¹⁷⁻¹⁹. Nevertheless, due to inconsistency of results, the specific genes involved in such predisposition are still far

from being elucidated and seem to vary among different populations. Particularly in mixed populations there are few studies that evaluated the role of SNPs in genes that regulate the inflammatory response in these outcomes and none to specifically analyze the influence of ancestry.

The purpose of this study was to evaluate the contribution of maternal and fetal SNPs in the *IL1B*, *IL6*, *IL6R*, *TNFA*, *TNFR*, *IL10*, *TLR2*, *TLR4*, *MMP9*, *TIMP1* and *TIMP2* genes and the susceptibility to PTL and PPROM in Brazilian women. We also investigated the influence of different ancestries that form our population in these outcomes.

Methods

Patients

We conducted a case-control study with singleton pregnant women that delivered at Botucatu Medical School (Botucatu – São Paulo, Brazil), between 2003 and 2014. The aforementioned Hospital is a terciary center that provides assistance to 68 cities in São Paulo State. The case group consisted of patients with PTL and PPROM without other pregnancy complications. We initially collected buccal swabs from 157 women with PTL and from 114 of their babies, and from 80 women with PPROM and from 63 of their babies. After exclusion of samples that did not have sufficient material or did not meet inclusion criteria, the case group consisted of 201 maternal samples (137 PTL and 64 PPROM) and 132 baby samples (88 PTL and 44 PPROM). For the control group we first collected 474 samples from mothers-babies pairs of healthy term deliveries, with no previous history of PTL or PPROM, and then matched the first 402 of these samples that met inclusion criteria and had sufficient material to the case group by newborn gender and maternal age – with a maximum difference of two years.

Gestational age was calculated by the last menstrual period and confirmed by first trimester ultrasound. Discrepancies were corrected by the ultrasound result. PTL and PPROM were defined as labor with intact membranes and premature rupture of membranes before 37 weeks of gestation. Patients that presented gestational pathologies such as preeclampsia or gestational diabetes, systemic diseases, or fetal abnormalities were excluded from the study. Sociodemographic data, clinical information and personal and family history of diseases were obtained through a standardized, closed-question questionnaire and through examination of medical records.

Genotyping of SNPs

Genomic DNA was extracted from buccal swabs in automated Qiacube equipment using QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen) and DNA quantification was performed by spectrometry using Epoch (Biotech). The SNPs were identified by Taqman[®] SNP Genotyping Assays in conditions specified by the manufacturer using Taqman[®] Genotyping Master Mix (Applied Biosystems). Reactions were run in 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The SNPs genotyped are described in Table 1. As there was no assay available to genotype rs3918242 in the *MMP9* gene, the identification of this SNP was performed by PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) using the primers MMP9 F 5'- GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC-3' and MMP9 R 5'- CTT CCT AGC CAG CCG GCA TC-3' for amplification, followed by incubation with the restriction enzyme SphI (Biolabs)²⁰. For every SNP evaluated, at least two clinical samples initially identified by real-time PCR or PCR as homozygous and one heterozygous were subjected to direct sequencing and used as positive controls to guarantee the reliability of results. Two negative controls (sterile water) were also

included in each run. The reproducibility of results – obtained by repeating 10% of the samples randomly chosen for all assays – was 99.98%.

Sequencing of controls

We designed pairs of primers for all SNPs to be evaluated (Table 1). After DNA amplification the samples were quantified in agarose gel by comparison with Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) and purified using Illustra™ GFX™ Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Every purified DNA sample was then amplified using reverse and forward primers separately with BigDye® Terminator v3.1 and, subsequently to the steps of DNA precipitation and resuspension, direct sequencing was performed in 3500 Hitachi equipment (Applied Biosystems). The sequences were analyzed using BioEdit.

Identification of AIMs

For the identification of maternal Ancestry Informative Markers, a panel of 62 selected indel markers were amplified in conditions as described by Resque et al.²¹. Then the samples were genotyped using ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the results analyzed using the GeneMapper v3.2 (Applied Biosystems). The ladder ABIGS LIZ-500 (Applied Biosystems) was used as a reference for the identification of the indels. A standard of known size was included in each run to ensure quality control of the analysis. As the admixture model assumes that each individual inherits part of their ancestral markers from ancestral populations, the results were plotted against the three parental populations from our database²² that constitute the Brazilian population – Amerindian, Western European and Sub-Saharan African – to perform ancestry stratification. For twelve samples from the case group there was not

enough material to perform this analysis. The software Structure v2.3.4 with 50,000 burn length was used to estimate admixture.

Analysis

Allele, genotype and haplotype frequencies were obtained by direct counting. Linkage Disequilibrium (LD) and expectations under the Hardy-Weinberg proportions were tested using Genepop 3.4. Haplotypes were inferred using the PHASE method with final interaction increased 10 times. Allele and haplotype frequencies were compared by Fisher's exact test and Odds Ratio and genotype frequencies by χ^2 test and Odds Ratio. Statistically significant results were corrected by Bonferroni. Maternal allelic data was corrected by ancestry and smoking by logistic regression using stepwise backwards. Clinical and socialdemographic data were analyzed by Fisher's exact test and Mann-Whitney. A p -value <0.05 was considered statistically significant. The software used were GraphPad® Prism version 5.0 and SAS.

Results

Mean age of the enrolled women was 23.9 (± 6.4) years-old for cases and 23.9 (± 6.1) for control group. Median gestational age at the moment of PTL or PPROM diagnosis was 34 weeks and 1 day (31w2d - 35w5d) and 35 weeks and 3 days (33w3d - 36w5d) at delivery for the case group. For the control group, median gestational age at delivery was 39 weeks and 5 days (39w - 40w4d). Marital status, parity and years of study were similar between the groups. Family history of PTL and/or PPROM was lower in the control group when compared to the case group or to PTL and PPROM separately ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.0006$). Smoking habit was increased in case group and PTL subgroup ($p = 0.016$, $p = 0.009$). In the case group, 39.1% of the multiparous

women had previous PTL and 23.6% had personal history of PPROM. Sociodemographic and clinical data are shown in Table 2. Newborns of PTL and PPROM mothers had lower birth weight and apgar scores than those born at term (Table 3).

Median of European, Amerindian and African ancestries for the 201 mothers of the control group and for 189 mothers of the case group are displayed in Table 4. European ancestry was increased among cases (PTL+PPROM) and among PTL when compared to controls ($p=0.002$, $p=0.002$) while African ancestry was higher in controls when compared to PTL+PPROM and to PTL separately ($p=0.006$, $p=0.009$).

Genotype frequencies were under Hardy-Weinberg expectations. There were no differences in allele or genotype frequencies for *IL1B*, *IL6*, *IL6R*, *MMP9*, *TNFR*, *TLR4*, *TIMP1* and *TIMP2* genes between cases and controls or among PTL, PPROM and controls. The maternal alleles *IL10-592 C*, *IL10-819 C* and *TNFA-238 G* were significantly more frequent in case group when compared to control group ($p=0.036$, $p=0.047$ and $p=0.048$, respectively). When PTL and PPROM were compared separately to the control group no alleles or genotypes were associated to PTL and the alleles *TLR2 A* and *TNFA238 G* ($p=0.007$, $p=0.009$) as well as the genotypes *TLR2 AA* and *TNFA238 GG* ($p=0.004$, $p=0.012$) were associated to PPROM. In order to eliminate the possibility of false positive results due multiple testing we calculated a new p -value according to Bonferroni's correction ($p=0.017$). Alleles and genotypes associated to PPROM remained significant after adjustment in maternal samples.

Regarding the fetal alleles, only *IL10-592 C* was associated to the case group when compared to controls ($p=0.01$). When the analysis was stratified by subgroups *IL10-592 C* and *IL10-819 C* were more frequent in PTL than in controls ($p=0.01$, $p=0.024$, respectively). There was no difference in allele frequencies between PPROM

and controls for any SNP evaluated. After adjustment by Bonferroni's method *IL10-592 C* remained significantly associated to PTL/PPROM (cases) and to PTL in fetal alleles.

The test of genotypic disequilibrium indicated the presence of LD among *IL1B*, *IL6R*, *IL10*, *TLR4* and *TNFA* SNPs ($p < 0.001$ for all). The haplotype *IL10-1082A -819T -592A* was significantly more frequent in the control group when compared to case group in maternal samples ($p = 0.007$). *TNFA-308A -238G* was associated to PTL ($p < 0.001$) and *TNFA-308G -238A* to control group when compared to cases in maternal samples ($p = 0.048$). Results with $p < 0.017$ remained significant after Bonferroni correction. Haplotypes in *IL1B*, *IL6R* and *TLR4* did not differ between cases and control patients. Allelic, genotypic and haplotype frequencies for SNPs in *IL10*, *TLR2* and *TNFA* are shown in Tables 5-10.

Using logistic regression we have postulated different models to analyze the effect of all the variables combined. When we compared cases to controls, the variables European contribution, smoking habit and presence of *TLR2 A* were associated to the case group, while higher African contribution and presence of *TNFA-238 A* were protective against prematurity. In the subgroups analysis, European contribution and smoking habit increased the risk for PTL and the presence of *IL10-1082 G* and *TLR2 A* increased the risk for PPROM. African ancestry and the allele *TNFA-238 A* were protective against PTL and PPROM, respectively (Tables 11-13).

We also compared patients that experienced different lengths of delivery latency among women with PTL or PPROM. Those that presented the allele *IL1B-31 T* were at higher risk for short latency (≤ 24 hours) while those with the allele *TLR4-299 G* had increased chance of long latency (> 24 hours). Genetic ancestry and smoking habits did not influence the length of latency (Table 14). Finally, we analyzed the differences between women that delivered very preterm infants (≤ 34 weeks of gestation) and those

with late preterm neonates (> 34 weeks of gestation). None of the variables differed between these subgroups.

Discussion

Main Findings

European ancestry, smoking habits, *TLR2A* and absence of *TNFA-238A* increased the risk for PTL and PPROM in our population. Separately, European ancestry and smoking increased the odds of PTL while African ancestry was protective. The presence of fetal alleles *IL10-592C* and *IL10-819C* was also associated to PTL. Presence of *IL10-1082G* and *TLR2A* increased the risk for PPROM while *TNFA-238A* played a protective role. No fetal alleles were associated to PPROM, possibly because of the small size of this subgroup. In haplotype analysis, we observed that *IL10-1082A-819T-592A* plays a protective role against these outcomes and *TNFA-308A-238G* was associated to PTL in maternal samples. Family history of PTL and/or PPROM was also associated to these outcomes, and delivery latency was influenced by presence of *IL1B-31T* and *TLR4-299G* alleles.

Strengths and Limitations

One limitation of our study is that the sample size was calculated without taken into account stratification in subgroups, therefore there may be false negative interactions in the subgroups analysis. In addition, this is a single center study, which, despite the positive effect on homogeneous sampling, may include bias such as social background. The strengths are the adequately powered sample size and the analysis of ancestry markers to stratify ethnicity by unbiased methodology for the first time in the literature.

Interpretation

Populations are generally mixed, and the Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world. As self-reported ethnicity is a poor predictor of genomic ancestry, we evaluated AIMs to assess the role of ethnicity in the studied phenotype. We observed higher contribution of European-originated markers in the case group, what at first seemed to be an unexpected finding once the literature reports higher rates of PTL and PPROM in African-descendant women^{10,11}. It has been hypothesized that variations of exposition to microorganisms in distinct ancestral environments may have resulted in a selective pressure that maintained genetic variants that increase survival in response to the infectious stimuli. In a new environment, polymorphisms that were advantageous may become detrimental. Thus, one specific allele may induce different responses, i.e. confer resistance or susceptibility, in distinct environmental backgrounds. Papers reporting higher risk for pregnancy-related complications in African-descendant women are mainly originated from the USA or Europe, regions with different environments than Brazil. Another study developed here corroborate to this hypothesis. The authors described that a polymorphism previously reported to be a risk factor for multiple sclerosis in North American and European Caucasians have a protective effect against this disease in Brazilians²³. To date, we are the first to use such unbiased approach to evaluate the influence of ancestry in PTL and PPROM in a mixed population.

We also described increased risk for PTL for patients who smoke. Exposure to tobacco components during pregnancy is a well-documented risk factor for pregnancy complications^{24,25} and increases the risk for fetal morbidities such as low birth weight and respiratory infections²⁶. Preterm infants are more likely to be born to mothers who smoked²⁷. Indeed, the risk of preterm birth attributable to smoking has been estimated

as more than 25%²⁸. Chang et al. suggested cessation of smoking during pregnancy as a part of a strategy modeled to reduce preterm birth rate in 5% in developed countries²⁹.

Regarding PPRM, presence of *IL10-1082G* and *TLR2A* increased risk for this outcome. IL-10 is a potent regulator of inflammatory immune response and altered levels of this mediator are involved in the pathophysiology of PTL and PPRM. Nevertheless, there is a lot of contradiction towards the polymorphisms located in its promoter region. Annells et al. associated the low producing haplotype *IL10-1082A-819T-592A* to deliveries before 29 weeks of gestation³⁰ and to risk of chorioamnionitis³¹, but other authors could not observe any associations between these SNPs and adverse pregnancy outcomes^{32,33}. On the other hand, the high producing *IL10-819C* allele has already been implicated in the etiology of preeclampsia³⁴, and there are reports that associate the high producing *IL10-1082G* to increased risk for delivery before 29 weeks of pregnancy³⁵ and that correlate the ATA haplotype with reduced risk for small-for-gestational age³⁶. In the present we report association of *IL10-1082G* to PPRM and a protective role for ATA towards PTL and PPRM. We hypothesize that the presence of *IL10-1082G* disrupts the balance between pro and anti-inflammatory cytokines, increasing the risk for PTL and PPRM.

Toll-like receptors (TLR) are transmembrane proteins that recognize pathogen-associated molecular patterns and play an essential role in innate immune response. TLRs signalization positively regulates the expression of inflammatory genes. It has been suggested that genetic variants in TLR pathways can alter the susceptibility to early PTL and to neonatal complications such as sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm newborns^{37,38}. This is the first report to associate a SNP at *TLR2* to PPRM. Sutherland et al.³⁹ examined the same SNP in patients with sepsis and observed an association between the A allele and development of sepsis and Gram-positive cultures.

Considering the importance of subclinical infection in the setting of PPRM it is possible that the presence of the A allele at position rs4696480 facilitates intraamniotic colonization by gram-positive bacteria activating the inflammatory pathways that culminate in PPRM.

The pro-inflammatory cytokine TNF- α also plays an important role in PTL and PPRM. *TNFA-308A* increases the production of TNF- α and has already been associated to PTL and PPRM^{32,40,41}. Liang et al.⁴¹ suggested that the presence of at least one allele *TNFA-308G* could be protective against PTL. Consistent with the literature, we report a protective role for the low-TNF- α -producing haplotype *TNFA-308G-238A*, located in the promoter region of the gene, against the studied phenotypes and association between the low producing allele *TNFA-238A* and decreased risk of PPRM and PTL/PPRM.

Another interesting finding is the association between *IL1B-31T* and short delivery latency and *TLR4-299G* and increased delivery latency. The mutated *IL1B-31T* results in a 2-fold increased mRNA production compared to the ancestral allele⁴². Thus, as this variant can lead to increased IL-1 β levels, the association between the T allele and short delivery latency is perfectly plausible. Conversely, the *TLR4-299G* allele reduces the responsiveness to LPS in cell cultures⁴³. Once the proinflammatory cascade triggered by TLR4 binding is less efficiently induced in these patients they are likely to present longer delivery latency. After PTL and PPRM pathways are triggered there seems that not much can be done as tocolytic treatments currently available are rather inefficient. To date, there are no studies that evaluate polymorphisms and delivery latency. The identification of specific alleles that contribute to the determination of delivery latency can be of value for the clinical practice. Finally, the association between family history of PTL/PPRM and their re-occurrence in the study group

combined with the high rates of personal history among cases reinforce the role of genetic alterations in these outcomes.

Conclusion

Our findings support a role for functional polymorphisms in immunoregulatory genes in the development of Preterm Labor and Preterm Premature Rupture of Membranes in both maternal and fetal samples. Moreover, we encourage the analysis of ancestry markers in this type of study in order to get a more accurate panorama in mixed populations. In the future the investigation of specific polymorphisms and ancestry markers could be used to efficiently predict and prevent these outcomes.

Acknowledgments

We thank all the patients and participants of this study and acknowledge Pablo Oliveira, from the Department of Genetics, UFPA, Iane Porto, from Department of Pathology, UNESP, and José Eduardo Corrente, from Department of Biostatistics, UNESP, for their valuable assistance.

Disclosure of Interests

The authors declare no conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Contribution to Authorship

B.R.A. Ramos contributed to the study design, sample collection, execution of the study, clinical data analysis, critical discussion and manuscript drafting. N.D. Mendes, A.A. Tanikawa and M.A.T. Amador contributed to execution of the study.

E.C. Castelli and S. Santos contributed to analysis of results. S.S. Witkin contributed to supervision of study execution, critical discussion and manuscript analysis and editing. M. G. Silva contributed to the study design, supervision of study execution, critical discussion and manuscript analysis and editing.

Details of Ethics Approval

All patients enrolled provided written informed consent. The study was approved by the institution's Human Research Ethics Committee (Protocol 3858-2011).

Funding

This study was supported by the State of São Paulo Science Foundation (FAPESP); Grants 2011/09433-7, 2011/08083-1 and 2011/19183-2.

References

1. Giarratano G. Genetic influences on preterm birth. *MCN Am J Matern Child Nurs* 2006;31:169–75.
2. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 2008;371:75-84.
3. 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;114:731-35.
4. 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;192:1325-29.
5. 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;41:229-37.
6. 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. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1216-21.
7. Adams MM, Elam-Evans LD, Wilson HG, Gilbertz DA. Rates of and factors associated with recurrence of preterm delivery. *Jama* 2000;283:1591-96.
8. Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The risk of preterm birth across generations. *Obstet Gynecol* 1997;90:63-7.
9. Alexander GR, Kogan M, Bader D, Carlo W, Allen M, Mor J. US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks. *Pediatrics* 2003;111:61-66.
10. Jaffe S, Normand N, Jayaram A, Orfanelli T, Doulaveris G, Passos M et al. Unique variation in genetic selection among Black North American women and its potential influence on pregnancy outcome. *Med Hypotheses* 2013;81:919-22.
11. Menon R, Pearce B, Velez DR, Merialdi M, Williams SM, Fortunato SJ et al. Racial disparity in pathophysiologic pathways of preterm birth based on genetic variants. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:62.
12. El-Bastawissi AY, Williams MA, Riley DE, Hitti J, Krieger JN. Amniotic fluid interleukin-6 and preterm delivery: a review. *Obstet Gynecol* 2000;95:1056-64.

13. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K, Lescale K, Peeper Q, Chervenak FA et al. Detection of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:5-10.
14. Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127-33.
15. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Interleukin-10 and transforming growth factor- β inhibit amniochorion tumor necrosis factor- α production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implications in prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:803-09.
16. Himes KP, Simhan HN. Genetic susceptibility to infection-mediated preterm birth. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22:741-53.
17. Kalinka J, Bitner A. Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women. *Ginekolog Pol* 2009;80:111-17.
18. 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;28:237-43.
19. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:1-34.
20. Ferrand PE, Parry S, Sammel M, Macones GA, Kuivaniemi H, Romero R et al. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Mol Hum Reprod* 2002;8:494-501.
21. Resque RL, Freitas NS, Rodrigues EM, Guerreiro JF, Santos NP, Ribeiro dos Santos A et al. Estimates of interethnic admixture in the Brazilian population using a panel of 24 X-linked insertion/deletion markers. *Am J Hum Biol* 2010;22:849-52.
22. Francez PA, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SE. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6:132–35.
23. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1*15 allele group and the DRB1*1501 and DRB1*1503

alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *J Neuroimmunol* 2007;189:118-24.

24. Balázs P, Rákóczi I, Grenzer A, Foley KL. Risk factors of preterm birth and low birth weight babies among Roma and non-Roma mothers: a population-based study. *Eur J Public Health* 2013;23:480-85.

25. Bakker H, Jaddoe V. Smoking during pregnancy is harmful for mother and child. *Ned Tijdschr Geneesk* 2012;156:5144.

26. Metzger MJ, Halperin AC, Manhart LE, Hawes SE. Association of Maternal Smoking during Pregnancy with Infant Hospitalization and Mortality Due to Infectious Diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:1-7.

27. Karody VR, Le M, Nelson S, Meskin K, Klemm S, Simpson P et al. A TIR domain receptor-associated protein (TIRAP) variant SNP (rs8177374) confers protection against premature birth. *J Perinatol* 2013;33:341-46.

28. Shah NR, Bracken MB. A systematic review and meta-analysis of prospective studies on the association between maternal cigarette smoking and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:465–72.

29. Chang HH, Larson J, Blencowe H, Spong CY, Howson CP, Cairns-Smith S et al. Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *Lancet* 2013;381:223-34.

30. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, Bardy P et al. Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:2056-67.

31. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, McDonald HM. Polymorphisms in immunoregulatory genes and the risk of histologic chorioamnionitis in Caucasoid women: a case control study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2005;5:4.

32. Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Goncalves-Primo A, Daher S. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol* 2009;80:115-21.

33. Stonek F, Metzenbauer M, Hafner E, Philipp K, Tempfer C. Interleukin-10 -1082 G/A promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1,616 pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008;87:430-33.

34. Pissetti CW, Bianco TM, Tanaka SC, Nascentes GA, Grecco RL, Silva SR et al. Protective role of the G allele of the polymorphism in the Interleukin 10 gene (-

1082G/A) against the development of preeclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2014;36:456-60.

35. Kerk J, Dördelmann M, Bartels DB, Brinkhaus MJ, Dammann CE, Dörk T et al. Multiplex measurement of cytokine/receptor gene polymorphisms and interaction between interleukin-10 (-1082) genotype and chorioamnionitis in extreme preterm delivery. *J Soc Gynecol Investig* 2006;13:350-56.

36. Engel SA, Olshan AF, Savitz DA, Thorp J, Erichsen HC, Chanock SJ. Risk of small-for-gestational age is associated with common anti-inflammatory cytokine polymorphisms. *Epidemiology* 2005;16:478-86.

37. Abu-Maziad A, Schaa K, Bell EF, Dagle JM, Cooper M, Marazita ML et al. Role of polymorphic variants as genetic modulators of infection in neonatal sepsis. *Pediatr Res* 2010;68:323-9.

38. Sampath V, Le M, Lane L, Patel AL, Cohen JD, Simpson PM et al. The NFKB1 (g.-24519delATTG) variant is associated with necrotizing enterocolitis (NEC) in premature infants. *J Surg Res* 2011;169:51-57.

39. Sutherland AM, Walley KR, Russell JA. Polymorphisms in CD14, mannose-binding lectin, and toll-like receptor-2 are associated with increased prevalence of infection in critically ill adults. *Crit Care Med* 2005;33:638-44.

40. Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *Bjog* 2005;112:28-31.

41. Liang M, Wang X, Li J, Yang F, Fang Z, Wang L et al. Association of combined maternal-fetal TNF-alpha gene G308A genotypes with preterm delivery: a gene-gene interaction study. *J Biomed Biotechnol* 2010:396184.

42. Kimura R, Nishioka T, Soemantri A, Ishida T. Cis-acting effect of the IL1B C-31T polymorphism on IL-1 beta mRNA expression. *Genes Immun* 2004;5:572-5.

43. Rallabhandi P, Awomoyi A, Thomas KE, Phalipon A, Fujimoto Y, Fukase K et al. Differential activation of human TLR4 by Escherichia coli and Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide: combined effects of lipid A acylation state and TLR4 polymorphisms on signaling. *J Immunol* 2008;180:1139-47.

Table 1. Identification and localization of genotyped SNPs and set of primers designed for sequencing.

Gene	Protein	Localization	Polymorphisms	Primers
<i>IL1B</i>	IL-1 β	2q14	rs1143627 (-31 T>C)	IL1b31 F 5'-CCCCTAAGAAGCTTCCACCA- 3'
				IL1b31 R 5'-AAGAGAATCCCAGAGCAGCC- 3'
			rs16944 (-511 C>T)	IL1b511 F 5'-TGAGGGTGTGGGTCTCTACC- 3'
				IL1b511 R 5'-TGGCTAGGGTAACAGCACCT- 3'
<i>IL6</i>	IL-6	7p21	rs1800795 (-174 G>C)	IL6 F 5'-TGCACTTTTCCCCCTAGTTG- 3'
				IL6 R 5'-GCCTCAGACATCTCCAGTCC- 3'
<i>IL6R</i>	IL-6R	1q21.3	rs2228144	IL6R1 F 5'-GAGAATGCTGCCCTAATCCA- 3'
				IL6R1 R 5'-GCATTGTCTTCCGGCTCTAC- 3'
			rs2228145 (D358A A>C)	IL6R2 F 5'-GAGGGGAAGGTTCTTTGAG- 3'
				IL6R2 R 5'-GAACACCACAGGGCCATC- 3'
<i>TNFA</i>	TNF- α	6p21.3	rs361525 (-238 G>A)	TNF238 F 5'-AATCAGTCAGTGGCCCAGAA- 3'
				TNF238 R 5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG- 3'
			rs1800629 (-308 G>A)	TNF308 F 5'-GAAGCCCCCTCCCAGTTCTAG- 3'
				TNF308 R 5'-TCTGGGCCACTGACTGATTT- 3'
<i>TNFR1I</i>	TNF-R	1p36.3	rs653667 (-24660)	TNFR 5'-F 5'-GAGTGCAGGCTTGAGTTTCC- 3'
				TNFR 5'-R 5'-GTGTTGTGTGTGCCCCATG- 3'
<i>IL10</i>	IL-10	1q31-32	rs800872 (-592 C>A)	IL10-592F 5'-TGGAAACATGTGCCTGAGAA- 3'
				IL10-592R 5'-GAGGGGGTGGGCTAAATATC- 3'
			rs1800871 (-819 G>A)	IL10-819 F 5'-TGGTGTACAGTAGGGTGAGG- 3'
				IL10-819 R 5'-GGGAAGTGGGTAAGAGTAGTC- 3'
			rs1800896 (-1082 A>G)	IL10-1082 F 5'-CAACTGGCTCCCCCTTACCTT- 3'
				IL10-1082 R 5'-ATGGAGGCTGGATAGGAGGT- 3'
<i>TLR2</i>	TLR2	4q32	rs4696480	TLR2 F 5'-CTTGGGTGCTGCTGTAACAA- 3'
				TLR2 R 5'-TGTTATCACCAAGGGAGCAG- 3'
<i>TLR4</i>	TLR4	9q32-33	rs4986790 (Asp299Gly)	TLR4-299 F 5'-CTCTAGAGGGCCTGTGCAAT- 3'
			rs4986791 (Thr399Ile)	TLR4-299 R 5'-TCAATGTGGGAACTGTCCA- 3'
				TLR4-399 F 5'-CAACAAAGGTGGGAATGCTT- 3'
				TLR4-399 R 5'-TCAAATTGGAATGCTGGAAA- 3'
<i>TIMP1</i>	TIMP1	Xp11.3	rs2070584	TIMP1 F 5'-CAACAGCAGCAATGGTCACT- 3'
				TIMP1 R 5'-CTGGCAAGATGTGTGAATGG- 3'
<i>TIMP2</i>	TIMP2	17q25	rs2277698	TIMP2 F 5'-TCCTCCTCCTTGTCTTTCCA- 3'
				TIMP2 R 5'-TAGGAACAGCCCCACTTCTG- 3'
<i>MMP9</i>	MMP9	20q11.2-13.1	rs3918242 (-1562C>T)	MMP9 F 5'-5'- GCCTGGCACATAGTAGGCCC-3'
				MMP9 R 5'-5'- CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'

Table 2. Sociodemographic data.

Variables	Case Group (n=201)	Control group (n=201)	p
Age (years)	23.9 (±6.4)	23.9 (±6.1)	
GA at delivery (days)	247.5 (234-257)	278 (273-284)	p < 0.001
GA at PTL/PPROM (days)	239 (219-250)		
Marital status			
Single	25% (47/188)	21.1% (42/199)	p > 0.05
Married	75% (141/188)	78.9% (157/199)	
Self-reported ethnicity			
White	61.8% (123/199)	52.3% (104/199)	p = 0.054
Non-white	38.2% (76/199)	47.7% (95/199)	
Parity			
Primiparous	44.5% (89/200)	48.5% (97/200)	p > 0.05
Multiparous	55.5% (111/200)	51.5% (103/200)	
Smoking habits			
Yes	22.7% (45/198)	11.9% (24/201)	p = 0.004
No	77.3% (153/198)	88.1% (177/201)	
Years of study			
Up until 9 years	61.8% (115/186)	57.7% (109/189)	p > 0.05
9 to 12 years	35.5% (66/186)	36% (68/189)	
More than 12 years	2.7% (5/186)	6.3% (12/189)	
Previous PPROM			
Yes	23.6% (26/110)	-	
No	76.4% (84/110)	100% (102/102)	
Previous PTL			
Yes	39.1% (43/110)	-	
No	60.9% (67/110)	100% (102/102)	
Abortion			
Yes	37.4% (46/123)	24.8% (28/113)	p = 0.037
No	62.6% (77/123)	75.2% (85/113)	
Family history PTL/PPROM			
Yes	45.5% (90/198)	23.3% (24/127)	p < 0.001
No	54.5% (108/198)	76.7% (103/127)	

Variable Age presented as mean ($\pm$ SD). Gestational age (GA) presented as median (25%-75%) and compared by Mann-Whitney. Others variables presented as percentage (total number) and compared by χ^2 . For previous PPROM and PTL only multiparous women were considered and for Abortion only women with multiple gestations.

Table 3. Fetal data.

Variables		Case group (n=132)	Control group (n=201)	P
Weight		2505 (2063-2871)	3210 (2971-3503)	p < 0.001
Gender	Feminin	49.3% (99/201)	49.3% (99/201)	p < 0.001
	Masculin	50.7% (102/201)	50.7% (102/201)	
Apgar	1	8 (7-9)	8 (8-9)	
	5	9 (8.25-10)	9 (9-10)	
	10	9 (9-10)	9 (9-10)	

Weight and Apgar presented as median (25%-75%) and compared by Mann-Whitney. Gender presented in percentage (total number).

Table 4. Ancestry contribution in each group.

	European	Amerindian	African
Control group (n=201)	0.644 ^a (0.530-0.754)	0.117 (0.082-0.190)	0.178 ^d (0.098-0.339)
Case group (n=189)	0.703 ^b (0.581-0.797)	0.122 (0.075-0.187)	0.145 ^e (0.076-0.278)
PTL (n=127)	0.705 ^c (0.582-0.797)	0.121 (0.074-0.182)	0.141 ^f (0.075-0.279)
PPROM (n=62)	0.677 (0.570-0.800)	0.128 (0.080-0.189)	0.151 (0.079-0.260)

Data presented as median (25%-75%) and compared by Mann-Whitney. a x b: p=0.002, a x c: p=0.002, d x e: p=0.006, d x f: p=0.009.

Table 5. Allelic frequencies for *IL10-592*.

Mothers	A	C	Babies	A	C
Control	0.383 ^a	0.617	Control	0.369 ^c	0.631
Case	0.312	0.688	Case	0.273 ^d	0.727
PTL	0.320 ^b	0.680	PTL	0.261 ^e	0.739
PPROM	0.297	0.703	PPROM	0.300	0.700

Data compared by Fisher's exact test. a x b: p=0.036; c x d: p=0.01; c x e: p=0.01

Table 6. Allelic frequencies for *IL10-819*.

Mothers	C	T	Babies	C	T
Control	0.607 ^a	0.393	Control	0.624 ^c	0.376
Case	0.677 ^b	0.323	Case	0.693	0.307
PTL	0.676	0.324	PTL	0.723 ^d	0.277
PPROM	0.677	0.323	PPROM	0.625	0.375

Data compared by Fisher's exact test. a x b: p=0.047; a x c: p=0.024.

Table 7. Allelic frequencies for *TLR2*.

Mothers	A	T	Babies	A	T
Control	0.408 ^a	0.592	Control	0.448	0.552
Case	0.462	0.538	Case	0.483	0.517
PTL	0.423	0.577	PTL	0.488	0.512
PPROM	0.548 ^b	0.452	PPROM	0.471	0.529

Data compared by Fisher's exact test. a x b: p=0.007.

Table 8. Allelic frequencies for *TNFA-238*.

Mothers	A	G	Babies	A	G
Control	0.065 ^a	0.935	Control	0.048	0.953
Case	0.033 ^b	0.968	Case	0.045	0.955
PTL	0.044	0.956	PTL	0.049	0.951
PPROM	0.008 ^c	0.992	PPROM	0.048	0.953

Data compared by Fisher's exact test. a x b: p=0.048; a x c: p=0.009.

Table 9. Frequencies for *IL10-1082-819-592*'s most common haplotypes.

Mothers	ATA	ACC	GCC	Babies	ATA	ACC	GCC
Control ^a	0.382 ^c	0.259	0.344	Control	0.360	0.209	0.333
Case ^b	0.291 ^d	0.313	0.358	Case	0.263	0.329	0.325
PTL	0.301	0.327	0.342	PTL	0.247	0.323	0.354
PPROM	0.269	0.285	0.392	PPROM	0.300	0.343	0.257

Data compared by χ^2 a x b: p=0.03, and Fisher's exact test c x d: p=0.007.

Table 10. Frequencies for *TNFA-308-238*'s haplotypes.

Mothers	GG	AG	GA	Babies	GG	AG	GA
Control ^a	0.838	0.097 ^d	0.065 ^f	Control	0.838	0.115	0.048
Case ^b	0.833	0.135	0.033 ^g	Case	0.843	0.116	0.041
PTL ^c	0.812	0.154 ^e	0.033	PTL	0.873	0.096	0.030
PPROM	0.875	0.094	0.031	PPROM	0.770	0.162	0.068

Data compared by χ^2 a x b: p=0.034, a x c: p=0.021, and Fisher's exact test.; d x e: p=0.048, f x g: p<0.001.

Table 11. Logistic regression model comparing case group vs. control group.

Variable	Case (n=201)	Control (n=201)	OR (IC)	p-value
European	0.70 (0.58-0.79)	0.64 (0.53-0.75)	9.46 (2.44-36.71)	0.001
African	0.15 (0.07-0.28)	0.18 (0.10-0.34)	0.12 (0.03-0.51)	0.004
Smoking	22.7% (45/198)	11.9% (24/201)	2.41 (1.34-4.33)	0.003
TLR2 A	0.462	0.408	1.75 (1.11-2.78)	0.017
TNFA-238 A	0.033	0.065	0.41 (0.18-0.90)	0.027

Ancestry presented as median (25%-75%), smoking as % (fraction), allele frequency.

Table 12. Logistic regression model comparing PTL group vs. control group.

Variable	PTL (n=136)	Control (n=201)	OR (IC)	p-value
European	0.70 (0.58-0.80)	0.64 (0.53-0.75)	13.48 (2.84-64.05)	0.001
African	0.14 (0.08-0.28)	0.18 (0.10-0.34)	0.10 (0.02-0.53)	0.007
Smoking	23.3% (31/133)	11.9% (24/201)	2.35 (1.25-4.44)	0.008

Ancestry presented as median (25%-75%), smoking as % (fraction).

Table 13. Logistic regression model comparing PPRM group vs. control group.

Variable	PPROM (n=65)	Control (n=201)	OR (IC)	p-value
IL10-1082 G	0.423	0.346	2.03 (1.06-3.92)	0.034
TLR2 A	0.548	0.408	2.93 (1.42-6.06)	0.004
TNFA-238 A	0.008	0.065	0.11 (0.02-0.87)	0.036

Data presented as allele frequencies.

Table 14. Logistic regression model comparing short latency vs. long latency groups.

Variable	Short Lat. (n=87)	Long Lat. (n=79)	OR (IC)	p-value
IL1B-31 T	0.578	0.447	2.93 (1.40-6.11)	0.004
TLR4-299 G	0.015	0.070	0.19 (0.05-0.70)	0.013

Data presented as allele frequencies.

Artigo Científico II

Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry.

Ramos BRA¹, D'Elia MPB², Mata M³, Sidney SEB³, Miot HA², Miot LBD², Silva MG^{1*}

¹Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²Department of Dermatology and Radiotherapy. Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³Department of Genetics, Biological Sciences Institute, Pará Federal University – UFPA, Belém, Pará, Brazil.

*Corresponding author:

Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP.

Distrito de Rubião Júnior, Zip Code: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Phone: +55 (14) 3880 1580 Fax: +55 (14) 3815-2348

E-mail: mgsilva@fmb.unesp.br

Key Words: Ancestry Informative Markers, Ethnicity and health, Genetics, Southeastern Brazilian population.

Article written according to guideline for authors of the “Plos One”.

Abstract

Background: Ethnic information can be useful in epidemiological studies and in investigations of diseases with genetic or infectious background. As Brazilian population is highly admixed physical traits tend to be poor indicators of ancestry. The assessment of ancestry by Ancestry Informative Markers (AIMs) can exclude the subjectivity of self-declared ethnicity and reported family origin. **Objective:** To evaluate the reliability of self-reported ethnicity or reported family origin as indicators of genomic ancestry of a female population in Southeastern region in Brazil. **Patients and methods:** Two previous cohorts were included: 404 women asked to self-report their ethnicity (Pop1) and 234 women asked to report their family's origin (Pop2). DNA was extracted from buccal swabs. Identification of AIMs was performed using a panel of 62 indel markers and results were plotted against parental populations – Amerindian, Western European and Sub-Saharan African. Ancestry stratification was performed using Structure v2.3.4. **Results:** In Pop1 57.4% of women self-reported as “white”, 34.6% as “brown” and 8.0% as “black”. In Pop2, 66.4% of women declared European origin, 23.9% African origin and 26.9% Amerindian. Median global European, Amerindian and African contributions were 66.8%, 12.6% and 16.6% for Pop1 and 80.8%, 7.3% and 7.6% for Pop2, respectively. Only 20% and 15% of the global variation in African and European contributions, respectively, could be explained by self-reported ethnicity and reported family origin only accounted for 20% and 5% of variations observed in African and European ancestries, respectively. Amerindian ancestry components did not influenced self-reported ethnicity or declared family origin. **Conclusion:** Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry in the Brazilian population. The evaluation of AIMs can be of great value in assessments of diseases with genetic basis as tool to provide insights into the etiology of such diseases.

Introduction

Ethnic information can be useful in epidemiological studies and in the investigation of several diseases with genetic or even infectious background. As it was learned from large scale genome-wide studies such as HapMap and 1000 genomes, there is a broad range of genetic variation – accounted for Single Nucleotide Polymorphisms or Copy-Number Variations, for example – among populations from distinct continents what has a direct impact on the susceptibility to diseases and response to medications. Such variety is due to genetic evolution and positive selection driven by geographical conditions. One immediately observable consequence of this heterogeneity is the physical constitution of peoples from different parts of the world, what, along with social and cultural identities has led to the construct of different ethnicities. Considering the present globalization, however, the establishment of one's ethnicity for clinical purposes has become a rather imprecise task, especially in regions with massive interethnic admixture.

Brazilian population is one of the most heterogeneous of the world as it results of over five centuries of interethnic crosses among three ancestral populations – Europeans, Africans, Amerindians – and more recently, Asians. Such admixture can be easily observed by the diversity of cultures and phenotypic characteristics in our population. This peculiarity of Brazilian population is likely to make physical traits as skin pigmentation, hair texture and shape of nose and lips poor indicators of ancestry. These features are regulated by a small set of genes and influenced by environmental factors (e.g. solar radiation). In a population with intense admixture like in Brazil the link between skin pigmentation and other phenotypic traits and ancestry tends to fade away through generations. Indeed, different authors suggested that physical appearance may not be an efficient indicator of individual's ancestry (1, 2).

Ethnic differences are frequently associated to health conditions and health behaviors. According to Schuster et al. (3) there are marked ethnic disparities among preadolescents regarding a range of health-related experiences, behaviors, and outcomes, many of which, however, can be explained by the child's school and the socioeconomic status of the family. Similarly, in a study by Souza et al. (4), the use of genetic markers for characterizing ethnic background strongly suggests that socioeconomic disparities, but not ethnic ancestry, are the main determinants of higher smoking rates among Blacks in Brazil.

While ethnicity sometimes may be faulty considered a risk factor for some conditions, several diseases are directly influenced by it. For instance, a well-established association between the rs9331888 polymorphism in *CLU* gene, that codes for the protein clusterin, and Alzheimer's disease has been traced in Caucasian population (5). Nevertheless, a recent review showed that the presence of the mutated SNP at this position is not a risk factor for Alzheimer's disease in Asian population (6). In another example, the variant *HLA-DRB1*04*, which is associated to the development of multiple sclerosis in Mediterranean populations, possibly has a protective role against this disease in Brazilians (7). In the future, the investigation of genetic variants can open a world of possibilities of more personalized drug therapy. In a study analyzing polymorphic variants in *CYP2D6*, among other genes directly related to pharmacological response to drugs, it was observed that Brazilians and Mexicans present significantly different frequencies for the variants associated to decreased or impaired function of this gene when compared to Europeans, Africans or Native Americans (8). In this way it seems that genetic ancestry in combination with environmental factors play a bigger role in multifactorial diseases and response to drug therapy than it has been given credit for. As a matter of fact, a great amount of studies

only consider the self-declared ethnicity in investigations of diseases with important genetic background.

An unbiased analysis of a population or individual's ancestry can be achieved by the assessment of biological markers such as Ancestry Informative Markers (AIMs). AIMs are autosomal genetic markers with sharply different frequencies among distinct geographical groups. The evaluation of a population's biological heritage can exclude the subjectivity inborn in self-declared ethnicity and reported family origin once it is not subjected to perceived physical appearance and social prejudice. In this context, the aim of this study was to evaluate the reliability of self-reported ethnicity or reported family origin as indicators of genomic ancestry of a female population in Southeastern region in Brazil.

Patients and Methods

Patients from two different previous cohorts were included in the present study: Pop1 comprised 404 pregnant women hospitalized for delivery. This subpopulation was asked to self-report their ethnicity based on the classification used by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) as White, Black, Brown or Yellow. Pop2 comprised 234 women seeking medical appointment for dermatological purposes. This subpopulation was asked to report their family's origin as European, African or Amerindian. Considering that only few patients self-declared as yellow or reported Asian origin, they were not included in this analysis. Patients were enrolled between 2011 and 2014 during medical appointments at Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil, and provided written informed consent for the previously ongoing researches. The present study was approved by our institution's Ethic Committee (Protocol 3858-2011). As this tertiary hospital assists the population of 68 cities in São Paulo State, located in the southeastern region of Brazil, the

subpopulations share the same geographic region. Sociodemographic data was obtained from medical records and through standardized questionnaires.

Buccal swabs (Epicentre) were collected at the appointment and stored at -20°C until processing. The buccal swabs were then submitted to total DNA extraction in automated Qiacube equipment using QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen). The DNA concentration of each sample was evaluated by the spectrophotometry method in Epoch equipment (Biotech). For the identification of Ancestry Informative Markers, a panel of 62 selected indel markers were amplified in conditions as described by Resque et al. (9). Following the amplification, samples were genotyped using ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and the results were analyzed with the software GeneMapper v3.2 (Applied Biosystems). The ladder ABIGS LIZ-500 (Applied Biosystems) was used as a reference for the identification of the indels. A standard of known size was included in each run to ensure quality control of the analysis.

As the admixture model assumes that each individual inherits part of their ancestral markers from ancestral populations, the results were plotted against the three parental populations from our database (10) that constitute the Brazilian population – Amerindian, Western European and Sub-Saharan African – to perform ancestry stratification. The software Structure v2.3.4 with 50,000 burn length was used to estimate admixture. Data was normalized and then analyzed by MANOVA.

Results

Sociodemographic characteristics of the subpopulations studied are presented in Table 1. Mean age was 23.8 (± 6.3) and 39.2 (± 9.0) years-old for Pop1 and Pop2, respectively. Most of the women considered themselves as “white” (57.4%) or reported European origin (66.4%). Only 8.0% of Pop1 reported themselves as “black” while 23.9% of Pop2 declared to have African ascendants and 26.9% of Pop2 reported

Amerindian origin. As subjects could report to have ascendants of more than one parental population, the sum of this data exceeds 100%.

Table 1. Sociodemographic data of patients included in the study.

Variables	Pop1 (n=404)	Pop2 (n=234)
Age (years)	23.8 ($\pm$ 6.3)	39.2 ($\pm$ 9.0)
Self-reported ethnicity		
White	57.4% (229/399)	-
Brown	34.6% (138/399)	-
Black	8.0% (32/399)	-
Reported family origin		
European	-	66.4% (158/238)
African	-	23.9% (57/238)
Amerindian	-	26.9% (64/238)
Years of study		
Up until 9 years	24.8% (91/367)	22.3% (53/238)
9 to 12 years	70.0% (257/367)	36.1% (86/238)
More than 12 years	5.2% (18/367)	41.6% (99/238)

Variable Age presented as mean ($\pm$ SD). Others variables presented as percentage (total number).

Median global European, Amerindian and African contributions were 66.8% (51.6-77.1), 12.6% (8.5-19.3) and 16.6% (9.2-31.9) for Pop1 and 80.8% (66.4-89.9), 7.3% (3.6-14.3) and 7.6% (3.9-17.1) for Pop2, respectively. Genomic contribution of parental populations are shown in Tables 2 and 3. In the first subpopulation, women self-reported as white had higher European contribution than brown or black women ($p<0.01$) and those self-reported as black presented more African markers than white or brown individuals ($p<0.01$). For Pop 2, subjects with reported European and Amerindian origins had higher European contributions then those with reported African origin ($p<0.01$), that in turn had higher African contribution then women with European

or Amerindian origins ($p<0.01$). Amerindian contribution did not vary significantly among the self-reported ethnic groups or among individuals from Pop2.

Table 2. Genomic contribution of parental populations in Pop1.

	European	Amerindian	African
White (n=232)	71.45 ^a (62.0-79.9)	13.35 (8.4-21.1)	11.00 ^d (7.2-18.1)
Brown (n=140)	57.00 ^b (43.1-69.0)	12.05 (8.8-17.6)	27.90 ^e (17.8-42.1)
Black (n=32)	43.05 ^c (30.6-54.2)	11.55 (9.5-18.1)	43.70 ^f (23.5-55.3)

Data presented as median (interquartile range). Pillai's Trace $Z=24,7$; $p<0.01$. axb, axc: $p<0.01$; bxc: $p<0.05$, dxe, dxg, exf: $p<0.01$ (Post-hoc Bonferroni's correction).

Table 3. Genomic contribution of parental populations in Pop2.

	European	Amerindian	African
European origin (n=155)	82.70 ^a (70.8-90.6)	6.30 (3.5-15.2)	6.30 ^c (3.4-12.7)
Amerindian origin (n=57)	83.20 ^a (68.6-90.0)	7.50 (4.2-15.6)	7.35 ^c (3.9-12.7)
African origin (n=62)	69.10 ^b (56.7-83.5)	6.80 (4.3-12.9)	19.70 ^d (9.2-35.8)

Data presented as median (interquartile range). Pillai's Trace $Z=24,7$; $p<0.01$. axb: $p<0.01$; cxd: $p<0,05$ (Post-hoc Bonferroni's correction).

For both subpopulations African and European ancestry components could be identified by self-reported ethnicity or reported family origin. However, only 20% and 15% of the global variation in African and European contributions, respectively, could be explained by self-reported ethnicity and reported family origin only accounted for 20% and 5% of variations observed in African and European ancestries, respectively. Amerindian ancestry components did not influenced self-reported ethnicity or declared family origin for neither subpopulation.

Discussion and Conclusion

In the present investigation, self-reported ethnicity and declared family origin had a faint correlation with genomic ancestry. Nevertheless, these parameters were unable to explain most of the genetic contributions observed, showing that the weak correlation between this information and biological background does not qualify this parameters as reliable classifiers of an individual's ethnicity in our population. A study performed in a similar geographical region with 48 AIMs and mitochondrial DNA also concluded that self-reported ethnicity by itself is not an efficient classificatory method (1). Other studies in Brazil and other highly admixed countries had also shown discrepancy between biological and self-reported ethnicities (11-13), but this is the first to compare the efficiency of two different parameters – self reported and declared family origin – as indicators of genetic background.

The matter relies on the importance of precise identification of one's ethnicity. Without an objective assessment of a population's ancestry it is difficult to rule out the confounding cargo of ethnicity in a large spectrum of diseases, especially when we consider the present globalization and miscegenation worldwide. In the baseline study with the Pop 1, our group has shown that higher European contribution is associated with increased risk of preterm delivery, while higher African contribution had a protective role for pregnant women in southeast region in Brazil (unpublished data). At first, our results seem conflicting with the reported in the literature of higher rates of this complication in African-American women when compared to North-American Caucasians. The reason for this finding is a matter of speculation but we hypothesized that other functional genes inherited from European ascendants induce a higher inflammatory response to environmental factors such as bacterial colonization than would African inherited genes, therefore leading to inflammatory syndromes such as preterm labor and rupture of membranes that culminate in preterm birth. Clearly, there

is a complex interplay between genetics and environment that should be considered in multifactorial diseases and that make them so difficult to prevent. In the baseline study with the second subpopulation we observed that higher African contribution significantly increased the risk for facial melasma independently of other previously identified risk factors (unpublished data). It has been shown that genes associated with the melanin pathway present significant differences in genetic variation among populations from different continents (14) and the findings obtained in the aforementioned study reinforce such variation.

Ancestry also plays a role in several types of cancer. Prostate cancer, for example, is a disease with markedly distinct prevalences in different ethnic groups and strong environmental and genetic factors involved. An ancestry-specific susceptibility loci on chromosome 8q24.21 has been identified for this type of cancer with considerably increased frequency on African American men (15). In a study with 656 women with breast cancer, higher European contribution increased significantly the chance of earlier diagnosis (16). From our results and from the literature, it is clear that medicine would gain considerably more accuracy with the evaluation of individual's genomic ancestry.

Moreover, the data shown here raise a question on whether government programs based on self-declared ethnicity are valid or whether it should be thought over. Currently, Brazilian government holds several programs of social inclusion targeted to those self-reported as black or brown. Once the self-reported ethnicity has very little agreement with biological information the effectiveness and fairness of the classification used in such programs are rather questionable.

We conclude that neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry in the Brazilian population. The approach used

herein enables the collection of accurate and relevant information concerning ethnic identification. We strongly recommend the evaluation of ancestry informative markers, especially in highly admixed populations, in assessments of diseases with genetic basis as important tool to provide insights into the understanding of the etiology of such diseases.

Acknowledgements

We would like to acknowledge all patients that have participated in this study.

References

1. Cardena MM, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PLoS One* 2013;8:62005.
2. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:177-82.
3. Schuster MA, Elliott MN, Kanouse DE, Wallander JL, Tortolero SR, Ratner JA et al. Racial and ethnic health disparities among fifth-graders in three cities. *N Engl J Med* 2012;367:735-45.
4. Souza ES, Araújo LF, Alencar DO, Santos SE, Silva Jr WA, Ferreira CA et al. Does ethnic ancestry play a role in smoking? *An Acad Bras Cienc* 2015. [Epub ahead of print]
5. Gu H, Wei X, Chen S, Kurz A, Müller U, Gasser T et al. Association of clusterin gene polymorphisms with late-onset Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2011;32:198-201.
6. Zhang S, Li X, Ma G, Jiang Y, Liao M, Feng R et al. CLU rs9331888 Polymorphism Contributes to Alzheimer's Disease Susceptibility in Caucasian But Not East Asian Populations. *Mol Neurobiol* 2015. [Epub ahead of print]
7. Brum DG, Barreira AA, Louzada-Junior P, Mendes-Junior CT, Donadi EA. Association of the HLA-DRB1*15 allele group and the DRB1*1501 and DRB1*1503 alleles with multiple sclerosis in White and Mulatto samples from Brazil. *J Neuroimmunol* 2007;189:118-24.
8. Bonifaz-Peña V, Contreras AV, Struchiner CJ, Roela RA, Furuya-Mazzotti TK, Chammas R et al. Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. *PLoS One* 2014;9:e112640.
9. Resque RL, Freitas NS, Rodrigues EM, Guerreiro JF, Santos NP, Ribeiro dos Santos A et al. Estimates of interethnic admixture in the Brazilian population using a panel of 24 X-linked insertion/deletion markers. *Am J Hum Biol* 2010;22:849-52.
10. Francez PA, Ribeiro-Rodrigues EM, dos Santos SE. Allelic frequencies and statistical data obtained from 48 AIM INDEL loci in an admixed population from the Brazilian Amazon. *Forensic Sci Int Genet* 2012;6:132–35.
11. Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JG et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* 2012;20:111–16.
12. Leite TK, Fonseca RM, de Franca NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported “color” and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One* 2011;6:e27162.
13. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira RJ et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol* 2011;21:240–45.
14. Lao O, de Grijter JM, van Duijn K, Navarro A, Kayser M. Signatures of positive selection in genes associated with human skin pigmentation as revealed from analyses of single nucleotide polymorphisms. *Ann Hum Genet* 2007;71:354-69.
15. Bensen JT, Xu Z, McKeigue PM, Smith GJ, Fontham ET, Mohler JL et al. Admixture mapping of prostate cancer in African Americans participating in the North Carolina-Louisiana Prostate Cancer Project (PCaP). *Prostate* 2014;74:1-9.
16. Al-Alem U, Rauscher G, Shah E, Batai K, Mahmoud A, Beisner E et al. Association of genetic ancestry with breast cancer in ethnically diverse women from Chicago. *PLoS One* 2014;9:e112916.

Conclusão

Considerando as metodologias empregadas nos estudos e os resultados obtidos, concluímos que existe associação entre maior ancestralidade europeia, hábito tabagista e o Trabalho de Parto Pré-Termo (TPP) na população estudada, enquanto a maior ancestralidade africana possui papel protetor. A presença de SNPs que modificam a resposta inflamatória aumenta a suscetibilidade à Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT). Também concluímos que a etnia autodeclarada não é um método classificatório confiável para a população brasileira e apontamos para a necessidade de investigação de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) em estudos de doenças com base genética. No futuro, estas ferramentas – SNPs e AIMs – devem possibilitar a identificação de pacientes com maior predisposição a complicações e facilitando seu rastreio, o que poderá minimizar os efeitos deletérios advindos da prematuridade.

Anexos

Tabela 1. Frequências alélicas e genotípicas de *IL1B-31* nos grupos estudados.

<i>IL1B-31</i>	C	T	CC	CT	TT	Total
Caso	0,470	0,530	50	87	62	199
TPP	0,452	0,548	31	61	44	136
RPM-PT	0,508	0,492	19	26	18	63
Caso (filhos)	0,442	0,558	23	69	38	130
TPP (filhos)	0,451	0,549	15	52	24	91
RPM-PT (filhos)	0,423	0,577	8	17	14	39
Controle	0,480	0,520	49	95	57	201
Controle (filhos)	0,455	0,545	45	91	63	199

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas de *IL1B-511* nos grupos estudados.

<i>IL1B-511</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Caso	0,448	0,552	41	97	62	200
TPP	0,423	0,577	24	67	45	136
RPM-PT	0,500	0,500	17	30	17	64
Caso (filhos)	0,415	0,585	18	72	40	130
TPP (filhos)	0,418	0,582	11	54	26	91
RPM-PT (filhos)	0,410	0,590	7	18	14	39
Controle	0,483	0,517	50	94	57	201
Controle (filhos)	0,424	0,576	39	90	69	198

Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas de *IL6* nos grupos estudados.

<i>IL6</i>	C	G	CC	CG	GG	Total
Caso	0,249	0,751	14	71	114	199
TPP	0,244	0,756	10	46	79	135
RPM-PT	0,258	0,742	4	25	35	64
Caso (filhos)	0,246	0,754	9	47	76	132
TPP (filhos)	0,228	0,772	5	32	55	92
RPM-PT (filhos)	0,287	0,713	4	15	21	40
Controle	0,236	0,764	10	75	116	201
Controle (filhos)	0,253	0,748	10	81	109	200

Tabela 4. Frequências alélicas e genotípicas de *IL10-592* nos grupos estudados.

<i>IL10-592</i>	A	C	AA	AC	CC	Total
Caso	0,312	0,688	18	89	93	200
TPP	0,320	0,680	12	63	61	136
RPM-PT	0,297	0,703	6	26	32	64
Caso (filhos)	0,273	0,727	13	46	73	132
TPP (filhos)	0,261	0,739	9	30	53	92
RPM-PT (filhos)	0,300	0,700	4	16	20	40
Controle	0,383	0,617	28	98	75	201
Controle (filhos)	0,369	0,631	24	98	76	198

Tabela 5. Frequências alélicas e genotípicas de *IL10-819* nos grupos estudados.

<i>IL10-819</i>	C	T	CC	CT	TT	Total
Caso	0,677	0,323	91	90	20	201
TPP	0,676	0,324	62	60	14	136
RPM-PT	0,677	0,323	29	30	6	65
Caso (filhos)	0,693	0,307	64	55	13	132
TPP (filhos)	0,723	0,277	47	39	6	92
RPM-PT (filhos)	0,625	0,375	17	16	7	40
Controle	0,607	0,393	75	94	32	201
Controle (filhos)	0,624	0,376	77	97	27	201

Tabela 6. Frequências alélicas e genotípicas de *IL10-1082* nos grupos estudados.

<i>IL10-1082</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Caso	0,624	0,376	72	107	22	201
TPP	0,647	0,353	53	70	13	136
RPM-PT	0,577	0,423	19	37	9	65
Caso (filhos)	0,649	0,351	53	51	17	121
TPP (filhos)	0,624	0,376	35	36	14	85
RPM-PT (filhos)	0,708	0,292	18	15	3	36
Controle	0,654	0,346	89	85	27	201
Controle (filhos)	0,657	0,343	82	99	19	200

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas de *IL6R-1* nos grupos estudados.

<i>IL6R-1</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Caso	0,119	0,881	2	44	155	201
TPP	0,136	0,864	2	33	101	136
RPM-PT	0,085	0,915	0	11	54	65
Caso (filhos)	0,109	0,891	2	23	99	124
TPP (filhos)	0,102	0,898	1	16	71	88
RPM-PT (filhos)	0,125	0,875	1	7	28	36
Controle	0,134	0,866	5	44	152	201
Controle (filhos)	0,115	0,885	3	40	157	200

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas de *IL6R-2* nos grupos estudados.

<i>IL6R-2</i>	A	C	AA	AC	CC	Total
Caso	0,620	0,380	70	108	22	200
TPP	0,640	0,360	53	68	15	136
RPM-PT	0,578	0,422	17	40	7	64
Caso (filhos)	0,655	0,345	55	63	14	132
TPP (filhos)	0,668	0,332	38	47	7	92
RPM-PT (filhos)	0,625	0,375	17	16	7	40
Controle	0,627	0,373	79	94	28	201
Controle (filhos)	0,620	0,380	74	95	27	196

Tabela 9. Frequências alélicas e genotípicas de *MMP9* nos grupos estudados.

<i>MMP9</i>	C	T	CC	CT	TT	Total
Caso	0,905	0,095	152	31	2	185
TPP	0,907	0,093	101	23	0	124
RPM-PT	0,902	0,098	51	8	2	61
Caso (filhos)	0,889	0,111	98	28	0	126
TPP (filhos)	0,897	0,103	69	18	0	87
RPM-PT (filhos)	0,872	0,128	29	10	0	39
Controle	0,898	0,102	156	40	0	196
Controle (filhos)	0,920	0,080	142	27	0	169

Tabela 10. Frequências alélicas e genotípicas de *TIMP1* nos grupos estudados.

<i>TIMP1</i>	G	T	GG	GT	TT	Total
Caso	0,428	0,572	38	96	67	201
TPP	0,404	0,596	21	68	47	136
RPM-PT	0,477	0,523	17	28	20	65
Caso (filhos)	0,450	0,550	39	40	52	131
TPP (filhos)	0,440	0,560	29	23	40	92
RPM-PT (filhos)	0,474	0,526	10	17	12	39
Controle	0,386	0,614	31	93	77	201
Controle (filhos)	0,384	0,616	52	49	98	199

Tabela 11. Frequências alélicas e genotípicas de *TIMP2* nos grupos estudados.

<i>TIMP2</i>	G	T	GG	GT	TT	Total
Caso	0,886	0,114	160	36	5	201
TPP	0,890	0,110	109	24	3	136
RPM-PT	0,877	0,123	51	12	2	65
Caso (filhos)	0,871	0,129	100	30	2	132
TPP (filhos)	0,864	0,136	69	21	2	92
RPM-PT (filhos)	0,887	0,113	31	9	0	40
Controle	0,888	0,112	159	39	3	201
Controle (filhos)	0,882	0,118	156	39	4	199

Tabela 12. Frequências alélicas e genotípicas de *TLR2* nos grupos estudados.

<i>TLR2</i>	A	T	AA	AT	TT	Total
Caso	0,462	0,538	43	98	58	199
TPP	0,423	0,577	27	61	48	136
RPM-PT	0,548	0,452	16	37	10	63
Caso (filhos)	0,483	0,517	26	62	30	118
TPP (filhos)	0,488	0,512	20	41	22	83
RPM-PT (filhos)	0,471	0,529	6	21	8	35
Controle	0,408	0,592	40	84	77	201
Controle (filhos)	0,448	0,552	39	101	60	200

Tabela 13. Frequências alélicas e genotípicas de *TLR4-299* nos grupos estudados.

<i>TLR4-299</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Caso	0,958	0,042	184	17	0	201
TPP	0,956	0,044	124	12	0	136
RPM-PT	0,962	0,038	60	5	0	65
Caso (filhos)	0,970	0,030	124	8	0	132
TPP (filhos)	0,962	0,038	85	7	0	92
RPM-PT (filhos)	0,988	0,013	39	1	0	40
Controle	0,965	0,035	190	8	3	201
Controle (filhos)	0,963	0,037	185	15	0	200

Tabela 14. Frequências alélicas e genotípicas de *TLR4-399* nos grupos estudados.

<i>TLR4-399</i>	C	T	CC	CT	TT	Total
Caso	0,960	0,040	185	16	0	201
TPP	0,963	0,037	126	10	0	136
RPM-PT	0,954	0,046	59	6	0	65
Caso (filhos)	0,981	0,019	127	5	0	132
TPP (filhos)	0,978	0,022	88	4	0	92
RPM-PT (filhos)	0,988	0,013	39	1	0	40
Controle	0,970	0,030	190	10	1	201
Controle (filhos)	0,967	0,033	186	13	0	199

Tabela 15. Frequências alélicas e genotípicas de *TNFA-238* nos grupos estudados.

<i>TNFA-238</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Caso	0,033	0,968	1	11	188	200
TPP	0,044	0,956	1	10	125	136
RPM-PT	0,008	0,992	0	1	63	64
Caso (filhos)	0,045	0,955	1	10	121	132
TPP (filhos)	0,049	0,951	1	7	84	92
RPM-PT (filhos)	0,037	0,963	0	3	37	40
Controle	0,065	0,935	2	22	177	201
Controle (filhos)	0,048	0,953	1	17	182	200

Tabela 16. Frequências alélicas e genotípicas de *TNFA-308* nos grupos estudados.

<i>TNFA-308</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Caso	0,135	0,865	4	46	150	200
TPP	0,140	0,860	3	32	101	136
RPM-PT	0,125	0,875	1	14	49	64
Caso (filhos)	0,119	0,881	1	27	94	122
TPP (filhos)	0,093	0,907	0	16	70	86
RPM-PT (filhos)	0,181	0,819	1	11	24	36
Controle	0,097	0,903	2	35	164	201
Controle (filhos)	0,115	0,885	1	44	155	200

Tabela 17. Frequências alélicas e genotípicas de *TNFR* nos grupos estudados.

<i>TNFR</i>	A	C	AA	AC	CC	Total
Caso	0,711	0,289	101	84	16	201
TPP	0,713	0,287	70	54	12	136
RPM-PT	0,708	0,292	31	30	4	65
Caso (filhos)	0,658	0,342	58	55	17	130
TPP (filhos)	0,650	0,350	39	39	12	90
RPM-PT (filhos)	0,675	0,325	19	16	5	40
Controle	0,687	0,313	96	84	21	201
Controle (filhos)	0,649	0,351	81	95	22	198

Tabela 18. Frequências alélicas e genotípicas de *IL1B-31* nos grupos com diferentes latências após TPP/RPM-PT.

<i>IL1B-31</i>	C	T	CC	CT	TT	Total
Latência <24h	0,422	0,578	19	48	35	102
Latência ≥24h	0,553	0,447	30	34	21	85

Tabela 19. Frequências alélicas e genotípicas de *TLR4-299* nos grupos com diferentes latências após TPP/RPM-PT.

<i>TLR4-299</i>	A	G	AA	AG	GG	Total
Latência <24h	0,985	0,015	99	3	0	102
Latência ≥24h	0,930	0,070	74	12	0	86

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 entendimento 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

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Endereço: Rua Salim Kahil, 501 Apto 21, Botucatu
Telefone (14) 3354 05 67

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: _____

Estado Civil: _____ ☐ Solteira ☐ Casada/União estável

Escolaridade: _____

Filho: _____ RG: _____

Data nascimento: _____ Apgar: _____ Peso: _____

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____ IG: _____

Complicações: _____ Via parto: _____

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

☐ Sim _____ ☐ Não

4) Possui alguma doença sistêmica?

☐ Sim _____ ☐ Não

5) Informações adicionais (gengivite ou cárie durante gestação, outros)

6) Contato: _____

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 entendimento 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

Bruna Ribeiro de Andrade Ramos
Endereço: Rua Salim Kahil, 501 Apto 21, Botucatu

Telefone (14) 3354 05 67

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_____

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: _____ RG: _____

Data nascimento: _____ Apgar: _____ Peso: _____

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____ IG: _____

Complicações: _____ Via parto: _____

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

☐ Sim _____ ☐ Não

4) Possui alguma doença sistêmica?

☐ Sim _____ ☐ Não

5) Informações adicionais (gengivite ou cárie durante gestação, outros)

6) Contato: _____



Botucatu, 06 de junho de 2011.

Of. 206/11-CEP

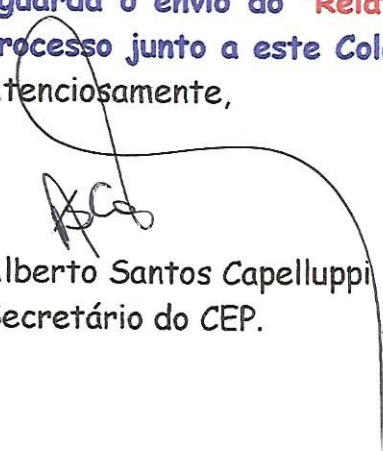
Ilustríssima Senhora
Profª Drª Márcia Guimarães Silva
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Drª Márcia,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3858-2011) "Polimorfismos de genes pró e anti-inflamatórios candidatos à predisposição à rotura prematura de membranas pré-termo e ao trabalho de parto prematuro", a ser conduzido por Bruna Ribeiro de Andrade Ramos, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 06 de junho de 2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao finalizar este projeto o CEP aguarda o envio do "Relatório Final de Atividades", para finalização do processo junto a este Colegiado.

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.