



**UFOP**

Universidade Federal  
de Ouro Preto

# **Universidade Federal de Ouro Preto Escola de Nutrição**



**“Alterações dos níveis plasmáticos de IL-33 e a CXCL-16 em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia”**

**Sirlaine Pio Gomes da Silva**

**Ouro Preto**

**2020**

Sirlaine Pio Gomes da Silva

**“Alterações dos níveis plasmáticos de IL-33 e a CXCL-16 em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia”**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Nutrição Clínica e Social da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de graduada em Nutrição.

Orientadora: Dra. Luiza Oliveira Perucci

Coorientador: Prof. Dr. André Talvani

**Ouro Preto**

**2020**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586a Silva, Sirlaine Pio Gomes da .  
Alterações dos níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 em mulheres  
grávidas com pré-eclâmpsia. [manuscrito] / Sirlaine Pio Gomes da Silva. -  
2020.  
63 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Dra. Luiza Perucci.

Coorientador: Prof. Dr. André Talvani.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola  
de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Pré-eclâmpsia. 2. Inflamação. 3. Gravidez. I. Perucci, Luiza. II.  
Talvani, André. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 618.3-06

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



UFOP  
Universidade Federal  
de Ouro Preto

Ministério da Educação  
Universidade Federal de Ouro Preto  
Escola de Nutrição



**Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:**

**"Alterações dos níveis plasmáticos de IL-33 e a CXCL-16 em mulheres grávidas com pré-eclâmpsia".**

Aos quatorze dias do mês de outubro de 2020, às 15 horas, via Google Meet no link: [meet.google.com/cyv-jtkc-ocd](https://meet.google.com/cyv-jtkc-ocd) (apresentação remota/online), reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da estudante **Sirlaine Pio Gomes da Silva**, orientada pela Farmacêutica Luiza Oliveira Perucci. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprovar a estudante.

Membros da Banca Examinadora:

**Luiza Oliveira Perucci**  
Presidente (NUPEB/ICEB/UFOP)

**Prof. Silvana Mara Luz Turbino Ribeiro**  
Examinadora (DENCs/ENUT/UFOP)

**Doutoranda Priscilla Vilela dos Santos**  
Examinadora (PPGSN/ENUT/UFOP)

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Nutrição por ofertar vivências que permitiram meu crescimento pessoal/profissional.

À Dra. Luiza Oliveira Perucci, por todo ensinamento compartilhado, paciência e incentivo de crescimento acadêmico. Ao Prof. Dr. André Talvani, por sempre cativar a busca por conhecimento através das suas ações. Os dois representam a constelação da Ursa Menor, por guiarem a construção deste trabalho.

À Equipe do LABIIN, por toda competência, confiança e acolhimento. Aos funcionários dos hospitais e às participantes do estudo por acreditarem na pesquisa.

À turma 17.1 e agregados por toda compreensão e empatia ao longo deste processo, em especial, Camila H., Felipe, Lucilaine e Talita. Por ordem de chegada as minhas fiéis companheiras, Alice, Thais e Natalia, por todo amparo.

Aos meus pais Haroldo e Sandra, que me ensinarem a lutar por meus ideais, e serem meu porto seguro. Essa conquista é nossa.

Aos meus irmãos Sirlene e Stefano por apoio e carinho. Aos meus sobrinhos Lays, Theo e Sara por trazerem leveza pra minha vida.

Ao meu namorado Frederico, por toda cumplicidade, cuidado e que incentiva a busca pelo conhecimento.

## RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença gestacional multifatorial caracterizada por aumento da pressão arterial, proteinúria e disfunção de vários órgãos a partir da vigésima semana de gestação. A etiopatogênese da PE ainda não foi completamente elucidada, mas acredita-se que envolva uma resposta inflamatória materna exagerada governada por células inflamatórias e fatores solúveis, como as citocinas e as quimiocinas. A interleucina 33 (IL-33) é uma proteína pertencente à família da IL-1 $\beta$  que atua tanto como uma citocina, quanto como um fator nuclear que regula a transcrição gênica. Por outro lado, a quimiocina CXCL-16 é uma molécula que atrai, principalmente, células T e NK para o sítio inflamatório. Até o momento, poucos estudos investigaram os níveis circulantes de IL-33 e CXCL-16 na PE, e nenhum deles incluiu gestantes brasileiras. O presente estudo teve como objetivo principal dosar os níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 em gestantes com PE, em mulheres não gestantes e em gestantes normotensas, correlacionando-os aos parâmetros laboratoriais (número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, número de plaquetas, contagem global de leucócitos, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ácido úrico, lactato desidrogenase (LDH), ureia, creatinina) para investigar o papel destes mediadores na patogênese da doença. Este estudo incluiu 79 mulheres distribuídas em três grupos: mulheres não gestantes (N=25), gestantes normotensas (N=34) e gestantes com PE (N=20). Os níveis de IL-33 e CXCL-16 foram dosados por imunoenaios enzimáticos. Foram encontrados níveis elevados de IL-33 e CXCL-16 em gestantes normotensas em comparação às gestantes com PE e às mulheres não gestantes. Os níveis de CXCL-16 também foram maiores nas gestantes com PE do que nas mulheres não gestantes, porém os níveis de IL-33 não diferiram entre esses dois grupos. Houve uma correlação positiva entre os níveis de IL-33 e de hemoglobina nas gestantes com PE. Além disso, os níveis de CXCL-16 correlacionaram-se negativamente com os níveis de hemoglobina e com o hematócrito nessas gestantes. Os resultados deste estudo sugerem que os níveis plasmáticos de IL-33 e a CXCL-16 estão alterados nas gestantes PE, o que pode contribuir na patogênese da doença.

**Palavras-chave:** Pré-eclâmpsia; inflamação; biomarcadores; IL-33; CXCL-16.

## ABSTRACT

Pre-eclampsia (PE) is a multifactorial gestational disease characterized by increased blood pressure, proteinuria, and multi-organ dysfunction after twenty weeks of gestation. The etiopathogenesis of PE has not yet been fully elucidated, but it is believed to involve an exaggerated maternal inflammatory response governed by inflammatory cells and soluble factors, such as cytokines and chemokines. Interleukin-33 (IL-33) is a protein that belongs to the IL-1 $\beta$  family and that acts both as a cytokine and as a nuclear factor that regulates gene transcription while the CXCL-16 is a molecule that mainly attracts T and NK cells into the inflammatory site. To date, few studies have investigated the circulating levels of IL-33 and CXCL-16 in PE, and to compare them to the levels found in none of them have included Brazilian pregnant women. Therefore, the present study aimed to measure the plasma levels of IL-33 and CXCL-16 in pregnant women with PE, non-pregnant women and in normotensive pregnant women and in normotensive pregnant women. In addition, it evaluated the correlations between these mediators and the laboratory parameters (number of red blood cells, hemoglobin, hematocrit, number of platelets, global leukocyte count, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), uric acid, lactate dehydrogenase (LDH), urea, creatinine) in PE to investigate the role of these mediators in the disease pathogenesis. This study includes a total of 79 women divided into three groups: non-pregnant women (N=25); normotensive pregnant women (N=34) and pregnant women with PE (N=20). IL-33 and CXCL-16 plasma levels were measured by enzyme immunoassays. Higher levels of IL-33 and CXCL-16 were found in normotensive pregnant women compared to PE women and non-pregnant women. CXCL-16 levels were also higher in PE women than in non-pregnant women while IL-33 levels were not different between these groups. There was a positive correlation between IL-33 and hemoglobin levels in PE women. In addition, CXCL-16 levels were negatively correlated with hemoglobin levels and hematocrit in these pregnant women. These study findings suggest that the plasma levels of IL-33 and CXCL-16 are altered in PE women, thus contributing to the disease pathogenesis.

**Keywords:** Preeclampsia; inflammation; biomarkers; IL-33; CXCL-16.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Possíveis processos fisiopatológicos na pré-eclâmpsia.....	17
Figura 2 – Principais estímulos, marcadores de superfície, citocinas secretadas e funções biológicas dos macrófagos M1 e M2.....	22
Figura 3 – Níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 em mulheres não gestantes (I), gestantes normotensas (II) e gestantes com pré-eclâmpsia (III).....	35
Figura 4 – Correlações significativas entre os níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE. ....	36



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos grupos estudados .....	33
Tabela 2 - Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	(Ácido 2,2' azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))
AGOC	Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia
ALT	Alanina aminotransferase
AnxA1	Anexina A1
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CID	Coagulação intravascular
CIUR	Crescimento intrauterino restrito
CO	Monóxido de carbono
CXCL	Quimiocina de motivo C-X-C ligante
dL	Decilitro
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
g	Gramma
GPG	Ganho de peso gestacional
Hb	Hemoglobina
HELLP	Hemólise, enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas
HOB	Hospital Odilon Behrens

HPRB	Hospital Público Regional de Betim
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IG	Idade gestacional
LTB4	Leucotrieno B4
IOM	Instituto de Medicina
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IQ	Intervalo interquartil
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato monobásico de potássio
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
LXA4	Lipoxina A4
M1	Macrófago pró-inflamatório
M2	Macrófago anti-inflamatório
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{m}^2$	Metro quadrado
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais

mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
mmHg	Milímetro de mercúrio
n.a.	Não se aplica
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κβ	Fator de transcrição nuclear β
NK	Natural <i>killer</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Pré-eclâmpsia
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
Rs	Coeficiente de correlação de Spearman

RvD1	Resolvina D1
sFlt1	Receptor fms-like tirosina quinase-1
SHG	Síndromes hipertensivas na gestação
ST2	Supressão de tumorigenicidade 2
sST2	Forma solúvel do receptor ST2
sTNF-R1	Receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformante beta
Th	Linfócitos auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T regulatórias
U	Unidade
UBSF	Unidade Básica de Saúde da Família
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
vs.	<i>Versus</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
+	Positivo
%	Porcentagem
°C	Grau centígrado
-	Negativo
$\mu$	Micro
$\chi^2$	Qui-quadrado
®	Marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Pré-eclâmpsia</b> .....	15
<b>1.2 Inflamação na pré-eclâmpsia</b> .....	21
<b>1.3 Interleucina-33</b> .....	24
<b>1.4 Quimiocina (motivo CXC) ligante 16</b> .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	27
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	27
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	27
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	28
<b>3.1 Aspectos éticos</b> .....	28
<b>3.2 Casuística</b> .....	28
<b>3.2.1 Seleção das participantes</b> .....	28
<b>3.2.2 Critérios de inclusão</b> .....	29
<b>3.2.3 Critérios de exclusão</b> .....	30
<b>3.3 Material</b> .....	30
<b>3.3.1 Amostra biológica</b> .....	30
<b>3.4 Métodos</b> .....	30
<b>3.4.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)</b> .....	31
<b>3.5 Análises estatísticas</b> .....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	33
<b>4.1 Características clínicas dos grupos pesquisados</b> .....	33
<b>4.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE</b> .....	34
<b>4.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16</b> .....	35
<b>4.4 Correlações entre os níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 e os parâmetros laboratoriais e as características clínicas das gestantes com PE</b> .....	35
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>5.1 Características clínicas dos grupos pesquisados</b> .....	37
<b>5.2 Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE</b> .....	38
<b>5.3 Avaliação das concentrações plasmáticas de IL-33 e CXCL-16 e suas associações com parâmetros laboratoriais em gestantes com PE</b> .....	42
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade</b> .....	57
<b>ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte</b> .....	58

<b>ANEXO 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)</b> .....	59
<b>ANEXO 4 Parecer do Comitê Ético em Pesquisa do Hospital Municipal</b> .....	60
<b>Odilon Behrens</b> .....	60
<b>ANEXO 5 – Declaração da Gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) – Guanabara / Betim</b> .....	61
<b>ANEXO 6 – Declaração da Diretoria do Hospital Regional de Betim (HPR)</b> .....	62



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Pré-eclâmpsia

Dentre as principais causas de mortalidade materna e perinatal, destacam-se os distúrbios hipertensivos. Na América Latina e no Caribe, estes distúrbios correspondem a 26% das causas de mortes maternas. O grupo de síndromes hipertensivas na gestação (SHG) engloba a pré-eclâmpsia (PE), a hipertensão arterial crônica, a PE sobreposta à hipertensão arterial crônica e a hipertensão gestacional. As gestantes com hipertensão arterial crônica apresentam hipertensão diagnosticada previamente à gestação ou até a sua 20ª semana. A PE sobreposta ocorre quando a gestante já era hipertensa crônica e desenvolve as manifestações clínicas da PE após a 20ª semana de gestação. Na hipertensão gestacional, ocorre apenas o aumento da pressão arterial em gestantes a partir da 20ª semana de gestação, sem os demais sinais e sintomas característicos da PE (proteinúria e alterações multissistêmicas). Por fim, a eclâmpsia é caracterizada por crises convulsivas em gestantes, geralmente diagnosticadas previamente com PE, e que não podem ser atribuídas a outras causas (STEEGERS et al., 2010 e FOLK, 2018).

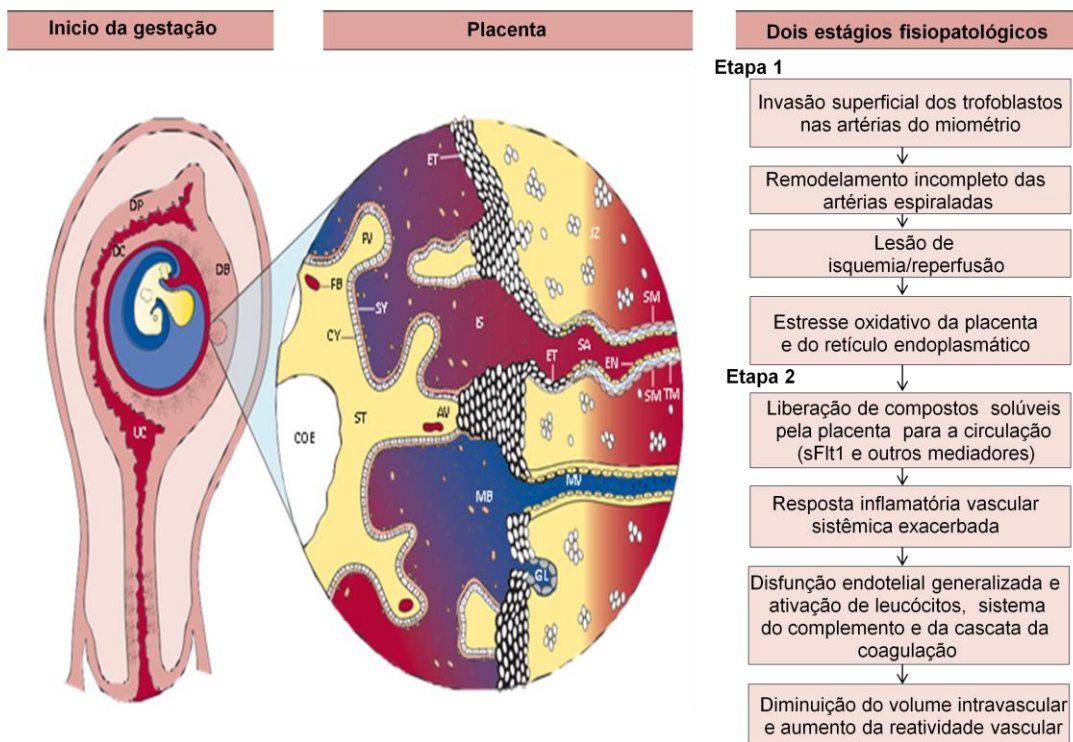
A PE, em sua forma pura, é definida por aumento da pressão arterial ( $\geq 140/90$ mmHg), podendo apresentar proteinúria ( $\geq 0,3$ g em urina de 24h) e disfunção múltipla de órgãos (rins, fígado, pulmões e cérebro) a partir da vigésima semana de gestação. Estima-se que a PE comprometa cerca de 5 a 10% das gestações no mundo, apresentando maior prevalência em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (VEST; CHO, 2012). Estima-se que a incidência de PE no Brasil ocorra em 1,5% das gestações. No entanto, acredita-se que ocorram subnotificações em algumas regiões e este número poderia estar subestimado (MAYRINK et al., 2019). A principal hipótese levantada é a de que esses países apresentam menores investimentos na atenção primária à saúde e o pré-natal, o qual permite a detecção da PE logo no início das manifestações clínicas, nem sempre é realizado. Apesar da taxa de mortalidade materna ter reduzido nas últimas décadas, ainda ocorrem mortes que poderiam ser evitadas durante o puerpério (WARREN et al., 2020). Existem outros fatores que corroboram para esta maior prevalência de PE em países subdesenvolvidos, como o nível socioeconômico que contribui para baixo nível de escolaridade e hábitos alimentares inadequados, os

quais podem estar associados a um maior Índice de Massa Corporal (IMC) e anemia nessas gestantes (UMESAWA; KOBASHI, 2017).

A etiopatologia da PE ainda não está bem elucidada. No entanto, segundo dados de diversos estudos, sabe-se que é uma doença marcada por disfunção endotelial, hipercoagulação e inflamação exacerbada materna (CHAIWORAPONGSA et al., 2014). A teoria melhor aceita atualmente que explica a etiopatogênese da PE divide a doença em duas fases: a fase inicial ou placentária e a fase materna.

A primeira fase ocorre entre o primeiro e segundo trimestres de gestação e é caracterizada pela placentação anormal (**Figura 1**). Em um processo de implante placentário normal, o citotrofoblasto de origem fetal invade as artérias espiraladas uterinas ao nível do miométrio, e este processo leva a uma extensa remodelação dos vasos de menor calibre e de alta resistência, que sofrem uma inversão na sua estrutura, ou seja, passam a apresentar calibre maior e menor resistência. Por outro lado, na PE, o citotrofoblasto não se transforma no subtipo invasivo, resultando em uma remodelação incompleta das artérias espiraladas. Desta forma, os vasos uterinos permanecem de calibre pequeno e elevada resistência, resultando em hipoperfusão e isquemia placentária (RANA et al., 2019).

A segunda fase da PE ocorre a partir do meio do segundo trimestre até o terceiro trimestre de gestação, sendo nomeada como síndrome materna, em que ocorrem às manifestações clínicas da doença. A placenta isquêmica libera uma série de fatores solúveis para a circulação materna, como mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e moléculas anti-angiogênicas (p. ex.: o receptor fms-like tirosina quinase-1 sFlt1) que, em conjunto, causam uma resposta inflamatória exacerbada, disfunção endotelial e levam a um estado de hipercoagulabilidade. Esses processos resultam em uma série de disfunções sistêmicas, como hepáticas, hematológicas, renais, pulmonares e neurológicas (RANA et al., 2019).



**Figura 1 – Possíveis processos fisiopatológicos na pré-eclâmpsia**

AV= vilosidade de ancoragem. COE = cavidade celêlômica. CY= citotrofoblastos. DB= decídua *basalis*. DC= decídua *capsularis*. DP= decídua *parietalis*. EN= endotélio. ET= trofoblasto extraviloso. CE= vaso sanguíneo fetal. VF= vilosidades flutuantes. GL= glândula. IS= espaço intervilosos. JZ= zona juncional do miométrio. MB= sangue materno, deixando o espaço intervilosos com vários componentes, como fatores anti-angiogênicos. VM= veia materna. AS= artéria espiralada. SM= músculo liso. ST = estroma. SY= sincitiotrofoblasto. TM= túnica média. UC= cavidade uterina. sFlt-1= receptor fms-like tirosina quinase-1 (adaptado de STEEGERS et al., 2010).

A doença pode ser classificada em PE de início precoce, cujas manifestações clínicas ocorrem em gestantes com idade gestacional  $\leq 34$  semanas, possui menor incidência e está associada a maiores riscos para a mãe e o feto/neonato; e a PE de início tardio ( $\geq 34$  semanas de gestação), que é mais frequente e as complicações maternas e fetais/neonatais são, em geral, mais brandas (LISONKOVA et al., 2014). Outra possível classificação é de acordo com a gravidade da doença. De acordo com esta classificação, as gestantes podem apresentar a PE com ou sem características graves. Para o diagnóstico da PE com características graves, é necessário que a gestante apresente pelo menos um dos seguintes achados: pressão arterial  $\geq 160/110$  mmHg, trombocitopenia (número de plaquetas  $< 100.000$  / $\mu$ L), lesões hepáticas (níveis de transaminases duas vezes acima do normal), insuficiência renal (níveis de creatinina  $> 1,1$  mg/dL ou duas vezes maiores do que

os níveis basais na ausência de doença renal subjacente); distúrbios cerebrais e/ou visuais e edema pulmonar (ACOG, 2019). Antigamente, a PE era classificada como leve e grave com base nos níveis pressóricos, de proteinúria e nas manifestações sistêmicas, porém esta classificação caiu em desuso (ACOG, 2002).

A PE apresenta como fatores de risco maternos a primeira gestação, gestação múltipla, ter desenvolvido PE na gestação anterior, assim como apresentar histórico familiar de PE ou eclâmpsia, ser de etnia negra, extremos de faixa etária e apresentar doença crônica não transmissível relacionada a dano endotelial, tais como; obesidade, hipertensão arterial crônica, diabetes mellitus e doença renal crônica (TROGSTAD *et al.*, 2011 e GIANNAKOU *et al.*, 2018;). As mulheres com idade  $\geq 35$  anos devem ser alertadas sobre o aumento do risco de desenvolver PE na gestação (Ortiz *et al.*, 2018). Também existem fatores paternos associados a um maior risco de desenvolver a PE, tais como; idade  $\geq 45$  anos, histórico familiar de hipertensão crônica, obesidade, surgindo, assim, o conceito “*dangerous father*” (DEKKER; ROBILLARD; ROBERTS, 2011). Outro fator relevante é se o cônjuge é fruto de uma gestação que apresentou a doença. Além disso, a mudança de parceiro (primipaternidade) e o intervalo longo entre gestações contribuem para o desenvolvimento da PE (TROGSTAD; MAGNUS; STOLTENBERG, 2011).

Sabe-se que a tolerância materna a antígenos paternos expressos na placenta é fundamental para o processo inicial de implementação da gestação e para a sua manutenção (REDMAN; SARGENT, 2010). Neste sentido, diversas evidências apontam para um maior risco de desenvolvimento de doenças gestacionais, incluindo a PE, quando há uma intolerância materna aos antígenos paternos. Acredita-se que o tempo de exposição da mulher ao líquido seminal do seu parceiro seja importante para a prevenção da PE, devido ao desenvolvimento de uma resposta de tolerância aos antígenos paternos presentes no sêmen. Esse mecanismo provavelmente explica porque a inseminação artificial está relacionada a um maior risco de desenvolvimento da PE. No entanto, esta probabilidade diminui com o aumento dos ciclos de inseminação e se o espermatozoide do parceiro for utilizado no procedimento (KYROU *et al.*, 2010 e GONZÁLEZ-COMADRAN *et al.*, 2014).

Curiosamente, há evidências de que fumar durante a gravidez constitui um fator de proteção para o desenvolvimento da PE. Existem algumas hipóteses a

respeito do monóxido de carbono (CO), um dos produtos do fumo. Acredita-se que este atue como um vasodilatador no endotélio, reduzindo a agregação placentária (BAINBRIDGE; SIDLE; SMITH, 2005). Outra possibilidade é que o CO inibe a produção de fatores anti-angiogênicos como, por exemplo, o sFlt1. Já foi descrito na literatura que as gestantes não fumantes apresentaram níveis circulantes maiores deste mediador quando comparado às gestantes fumantes (WEI *et al.*, 2015a). Além disso, Lewandowska e Więckowska (2020) demonstraram que parar de fumar durante a gestação pode aumentar o risco de PE, mas que iniciar no primeiro trimestre pode induzir a complicação. Porém, o tabagismo continua sendo contraindicado durante a gestação, uma vez que o fumo contém uma série de substâncias tóxicas que podem induzir efeitos adversos ao feto, como o baixo peso e a ruptura prematura das membranas. Recomenda-se a suplementação com vitamina C para as gestantes tabagistas como forma de minimizar essas complicações (NAZE, 2017).

Recentemente Raghavan et al. (2019), relacionaram o padrão alimentar antes e durante da gestação ao desenvolvimento de SHG. De acordo com este estudo, a priorização da ingestão de alimentos *in natura* em relação a alimentos ultraprocessados pode impactar em uma redução de até 42% no risco de desenvolver SHG, e de até 29% para a PE. Apesar de maiores investigações serem necessárias para confirmar esses achados, a ingestão de alimentos *in natura* descrita no artigo está de acordo com as orientações do guia alimentar brasileiro que possui a finalidade de prevenção/promoção à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Alimentos *in natura* possuem ação antioxidante que pode proteger contra possíveis danos causados pela liberação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Desta forma, auxiliam na modulação do estresse oxidativo e em doenças com perfil inflamatório (HALLIWELL; CROSS, 1994). Sabe-se que ocorre um estresse oxidativo em excesso na PE. Em uma meta-análise, gestantes com a doença apresentaram uma redução primária da capacidade antioxidante e um aumento nos níveis de produtos do estresse oxidativo, o que poderia estar relacionado a alterações vasculares (TARAVATI; TOHIDI, 2018). Alimentos ricos em fibra apresentam polifenóis ligados a complexos polissacarídeos que funcionam como

antioxidantes ao serem liberados no intestino. Além disso, o consumo de alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, como exemplo, o ômega-3 é considerado benéfico não só por possuírem ação antioxidantes, mas também pelo seu conhecido efeito anti-inflamatório (RAPHAEL; SORDILLO, 2013).

O manejo clínico das gestantes com PE possui como principais finalidades a prevenção de complicações maternas e fetais/neonatais. Dentre as complicações maternas, destacam-se a eclâmpsia, a síndrome HELLP (hemólise, níveis elevados de enzimas hepáticas e diminuição dos números de plaquetas) e a coagulação intravascular disseminada. As complicações fetais podem ser: crescimento intrauterino restrito (CIUR), deslocamento da placenta, danos neurológicos, sofrimento fetal e, em casos extremos, morte. Atualmente, não existe tratamento de cura para a PE, assim, frequentemente opta-se pelo adiantamento do parto com a remoção completa da placenta. Esta estratégia geralmente preconiza o bem estar da gestante, mas também leva em consideração o equilíbrio entre os riscos maternos e fetais/neonatais (Jacek, J. *et al.*, 2016). Para a avaliação da gravidade da PE e o monitoramento do prognóstico da gestação, empregam-se testes bioquímicos, sendo estes a dosagem dos níveis séricos de creatinina, das transaminases hepáticas (aspartato aminotransferase – AST e alanina aminotransferase – ALT) e do ácido úrico, além de testes hematológicos, como a contagem de plaquetas. Para as gestantes com PE grave (pressão arterial  $\geq$  160/110 mmHg), preconiza-se o tratamento com doses repetidas dos medicamentos nifedipina e hidralazina com a finalidade de controlar a pressão arterial. Outro anti-hipertensivo frequentemente usado é o labetalol, porém, é escasso em países subdesenvolvidos, e há indícios de que possa causar sofrimento fetal. Para evitar a eclâmpsia, recomenda-se o uso do anticonvulsivante sulfato de magnésio (MOL *et al.*, 2016).

Como uma medida profilática, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), recomenda a utilização de baixas doses de ácido acetilsalicílico (75 mg/dia) para mulheres que apresentam alto risco de desenvolver PE. A suplementação com cálcio (doses de 1,5 a 2,0 g/dia) também é indicada para mulheres que apresentam deficiência nutricional deste micronutriente, como forma de prevenir a doença, pois possui ação anti-hipertensiva. Esses protocolos vêm sendo adotados pela maioria das maternidades brasileiras há cerca de 3 anos (FEBRASGO, 2017). Durante a

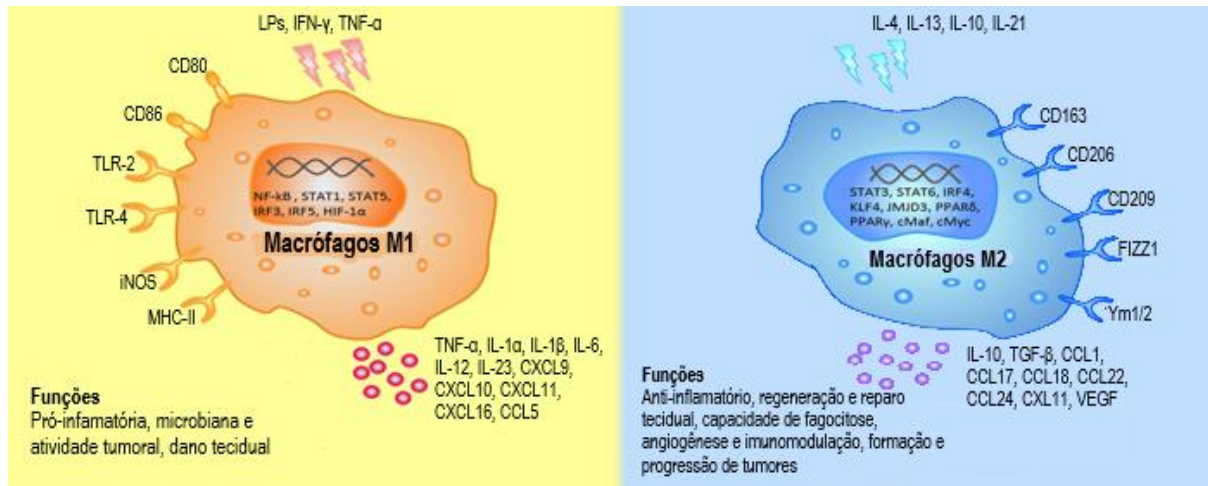
gestação, é comum à suplementação de ácido fólico para evitar anemia. Desta forma, deve-se atentar para que ambas as suplementações sejam feitas com intervalo, evitando assim a competição dos micronutrientes, uma vez que o ferro pode interferir na biodisponibilidade do cálcio (OMS, 2018). Estudos da literatura sugerem outras estratégias de prevenção da PE, tais como o uso de anticoagulantes, antioxidantes (vitaminas E e C), a prática moderada de exercícios físicos, suplementação com vitamina D, além do uso de alho, óleo marinho e redução do consumo de sal. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar a eficácia dessas estratégias preventivas (BEZERRA MAIA e HOLANDA MOURA *et al.*, 2012, BIRSNER; GYAMFI-BANNERMAN, 2015 e GHESQUIÈRE *et al.*, 2016).

## 1.2 Inflamação na pré-eclâmpsia

Os macrófagos constituem 20 a 30% dos leucócitos da interface materno-fetal. Eles participam da angiogênese e do processo de remodelação das artérias espiraladas uterinas, e fagocitam células mortas e *debris* celulares (YAO; XU; JIN, 2019). Os macrófagos também exercem um papel modulador da resposta inflamatória e do processo de tolerância materna aos antígenos do feto durante a gestação. Durante o processo normal de gestação, ocorrem mudanças no perfil de expressão de macrófagos teciduais que podem ser diferenciados em pró-inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios (M2). Os principais tipos de estímulos, marcadores de superfície, citocinas secretadas e funções biológicas dos macrófagos M1 e M2 estão resumidos na **Figura 2**.

As alterações de fenótipo (e funções) dos macrófagos são importantes para evolução bem-sucedida da gravidez. Com isso, observa-se que no primeiro e segundo trimestres há um predomínio de macrófagos do tipo M1, os quais favorecem a implantação do embrião. Já na transição do segundo para o terceiro trimestre, ocorre uma proliferação de macrófagos M2 que auxiliam na tolerância imunológica materna ao feto. No período que antecede o parto, ocorre o retorno do estado de polarização macrofágica M1, envolvido nas contrações uterinas e no movimento fetal. Porém, observa-se uma inflamação acentuada materna na PE, em

que há maior proliferação de macrófagos M1 durante toda a gestação. Esse fenótipo provavelmente está relacionado a uma menor tolerância materna ao feto durante a gestação com PE (VISHNYAKOVA *et al.*, 2019 e YAO; XU; JIN, 2019).



**Figura 2 – Principais estímulos, marcadores de superfície, citocinas secretadas e funções biológicas dos macrófagos M1 e M2** CCL, ligante de quimiocina (motivo C-C); cMaf, fibrosarcoma c-músculo aponeurótico; CXCL, ligante de quimiocina (C-X-C); FIZZ1, molécula do tipo resistina  $\alpha$ 1; HIF, fator induzível por hipóxia; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; IFN- $\gamma$ , interferon gama; IL, interleucina; IRF, fator regulador de interferon. JMJD, proteínas contendo o domínio Jumoni C; KLF, fator do tipo Kruppel; NF- $\kappa$ B, fator de transcrição nuclear kappa B; KLF, fator do tipo Kruppel; LPS, lipopolissacarídeo. MHC, complexo principal de histocompatibilidade; PPAR, receptores ativados por proliferação de peroxissoma; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição; TLR, receptor do tipo Toll; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral alfa; TGF- $\beta$ , fator de crescimento transformador beta; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; Ym1, quitinase 3 semelhante a 3 (adaptado de YAO; XU, JIN, 2019).

Os linfócitos dos tipos T CD4<sup>+</sup> ou auxiliares (Th) também podem exibir diferentes fenótipos. Os linfócitos Th1, grandes produtores de interferon gama (IFN- $\gamma$ ,) estimulam a resposta imune contra patógenos intracelulares e sua ativação está relacionada à rejeição celular. Os linfócitos Th2 participam da resposta humoral em alergias e infecções por parasitas extracelulares. Os linfócitos Th17 secretam a citocina IL-17, um potente indutor pró-inflamatório. Estes linfócitos participam de respostas do hospedeiro a infecções fúngicas e bacterianas, e semelhante aos linfócitos Th1, também participam de doenças auto-imunes. Além disso, existem as células T regulatórias (Treg), que são fundamentais para a manutenção da tolerância periférica aos antígenos próprios e para a regulação da proliferação dos demais linfócitos (ALIJOTAS-REIG; MELNYCHUK; GRIS, 2015).

Em uma gestação saudável, observa-se um predomínio de linfócitos Th2 e supressão das imunidades Th1 e Th17. A polarização Th2 é fundamental para a



manutenção da tolerância materna aos antígenos fetais e para evitar complicações, tais como o aborto espontâneo (SANTNER-NANAN *et al.*, 2009; SAITO *et al.*, 2010 e GHESQUIÈRE *et al.*, 2016). Estudos indicam que as células Treg controlam a resposta inflamatória durante a gestação, desempenhando um papel relevante na regulação da resposta alôgena materno-fetal. Porém, em gestações complicadas pela PE, há um predomínio de células Th1 e Th17, o que contribui para uma resposta inflamatória exacerbada (SAITO; SAKAI, 2003; YANG *et al.*, 2004 e ROUSE, 2007).

Mediadores inflamatórios de natureza diversa, como proteínas e lipídios, são produzidos por células do sistema imune (macrófagos, linfócitos, etc), endotélio e outros componentes da interface materno-fetal, e exercem um papel fundamental na manutenção da gestação (HEADLAND; NORLING, 2015). Está bem estabelecida na literatura que há um predomínio de citocinas, quimiocinas e lipídios com atividade pró-inflamatória durante a gestação com PE (PERUCCI *et al.*, 2017). Por exemplo, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram níveis plasmáticos aumentados de IL-6, IFN- $\gamma$ , receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral alfa (sTNF-R1) e leucotrieno B4 (LTB4) em gestantes com PE quando comparado às gestantes normotensas (PINHEIRO *et al.*, 2013 e PERUCCI *et al.*, 2014). Em contraste, os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 e do mediador lipídico pró-resolutivo resolvina D1 (RvD1) estavam diminuídos na PE (PINHEIRO *et al.*, 2013, OLIVEIRA PERUCCI *et al.*, 2020). Há uma complexa regulação das vias de biossíntese desses mediadores, de modo que os seus níveis podem estar elevados, reduzidos ou equivalentes na PE. Em trabalhos recentes, mostramos que os níveis plasmáticos da proteína induzida por glicocorticoides anexina A1 (AnxA1) e do mediador lipídico lipoxina A4 (LXA4) estavam aumentados na PE (PERUCCI *et al.*, 2015 e PERUCCI *et al.*, 2016). Esses mediadores possuem ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas bem conhecidas em modelos experimentais de doenças inflamatórias humanas (PERUCCI *et al.*, 2016; PERRETTI; D'ACQUISTO, 2009; SERHAN, 2014 e PERUCCI *et al.*, 2016) . Desse modo, a sua maior produção na PE poderia atuar como um mecanismo contrarregulador da resposta inflamatória. Ainda, existem variáveis que podem interferir na ação de mediadores inflamatórios, como expressão alterada ou mudança conformacional dos seus receptores, e maior inativação metabólica. No entanto, esses mecanismos precisam ser mais bem estudados no

contexto específico da PE (PERUCCI *et al.*, 2017).

### 1.3 Interleucina-33

A IL-33, citocina pertencente à superfamília da IL-1, é expressa predominantemente em células estromais, como células epiteliais e endoteliais. Estímulos pró-inflamatórios como os que ocorrem após danos ou necrose tecidual, provocam a liberação de IL-33 nos espaços extracelulares, sendo, por este motivo, considerada uma alarmina. A IL-33 pode funcionar tanto como uma citocina quanto como um fator de transcrição nuclear. Ela é composta por dois domínios conservados evolutivamente, o N-terminal nuclear que se liga à cromatina e o domínio C-terminal semelhante às demais citocinas da família IL-1, separados entre si por uma porção central divergente (MILLER, 2011 e LIEW; GIRARD; TURNQUIST, 2016).

A IL-33 exerce os seus efeitos ao se ligar ao receptor de IL-1 (IL-1RL1), também conhecido como “supressão de tumorigenicidade 2” (ST2), o qual é membro da família de receptores do tipo Toll. O ST2 é expresso principalmente em células Th2 e em mastócitos. As células linfoides inatas do grupo 2 e células Treg também expressam esse receptor, podendo ser ativadas pela IL-33. Tendo em vista a modulação da expressão de ST2 em diferentes células imunes e em condições diversas, sugere-se que a IL-33 participe de respostas imunes dos tipos Th1 e Th2 associadas a doenças. A ligação IL-33/ST2 forma um complexo com a proteína acessória IL-R1. A forma solúvel do ST2 (sST2) pode ser detectada no soro humano e possui função tamponante da IL-33, ao inibir a ligação da citocina aos seus receptores celulares (MILLER, 2011 e CAYROL; GIRARD, 2018).

Estudos da literatura demonstraram que a IL-33 é capaz de inibir a ativação do NF- $\kappa$ B, induzindo, assim, uma resposta anti-inflamatória. Ao ativar as células Th2, a IL-33 é capaz de induzir a produção das citocinas IL-5 e a IL-13. Além disso, a IL-33 estimula a proliferação de células Treg, as quais sintetizam as citocinas reguladoras IL-10 e TGF- $\beta$ . (ALTARA *et al.*, 2018). O papel da IL-33 depende da doença ou modelo experimental adotado, podendo desempenhar papel protetor ou

inflamatório. O seu caráter pró-inflamatório tem sido observado em condições clínicas como asma, artrite reumatoide, e lesão pulmonar aguda (XU *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2016 e JOHANSSON; MCSORLEY, 2019). Também já foi descrita a participação da IL-33 em doenças infecciosas (causadas por helmintos, protozoários e fungos), intestinais e cardiovasculares (NUNES; BERNARDAZZI; DE SOUZA, 2014; ROSTAN *et al.*, 2015 e ALTARA *et al.*, 2018).

Curiosamente, já foi relatado que a deficiência de IL-33 em camundongos está associada à menor probabilidade de fertilização (WU *et al.*, 2015). Tanto a IL-33 como seu receptor é expressa em células endometriais uterinas. O papel da proteína durante a gestação ainda não é bem elucidado, um estudo demonstrou que a expressão de IL-33 em células decíduais do estroma é benéfica apenas na fase de implementação e que a manifestação prolongada pode estar relacionada a aborto espontâneo (SALKER *et al.*, 2012). Entretanto, um grupo de pesquisadores ao analisarem amostra de placentas e células decíduais de gestações interrompidas no primeiro trimestre de gestação demonstrou diminuição na expressão de IL-33 em células estromais decíduais. E ao analisarem placentas após o parto normal detectaram no sobrenadante de cultura citocinas produzidas por macrófagos placentários e decíduais. A IL-33 pode estar relacionada com a proliferação de trofoblastos e um desequilíbrio pode ocasionar interrupção ou PE na gestação (FOCK *et al.*, 2013).

As evidências literárias a respeito dos níveis de IL-33 na PE são recentes. Já foi demonstrado que os níveis da citocina não são aumentados na PE quando comparada as normotensas. No entanto os níveis de sST2 são mais expressos em gestantes no grupo de gestantes com PE (GRANNE *et al.*, 2011 e SOTO *et al.*, 2012 e YU *et al.*, 2017). Porém, alguns autores relatam níveis diminuído de IL-33 em gestantes com PE (CHEN *et al.*, 2018 e GÖKDEMIR *et al.*, 2016).

#### **1.4 Quimiocina (motivo CXC) ligante 16**

As quimiocinas podem ser divididas em quatro subfamílias (CXC, CC, C, CX3C). A principal função das quimiocinas é regular a migração de células imunes aos sítios inflamatórios (PALOMINO; MARTI, 2015 e FERNANDEZ; LOLIS, 2002). A quimiocina (motivo CXC) ligante 16 (CXCL-16) foi recentemente descoberta, sendo

produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas. A CXCL-16 possui duas formas: transmembranar e solúvel. A forma transmembranar funciona como molécula de adesão e atua na eliminação da lipoproteína de baixa densidade oxidada. A forma solúvel da CXCL-16 é derivada da clivagem da sua forma transmembranar (SHIMAOKA *et al.*, 2004 e DI CASTRO *et al.*, 2016). A CXCL-16 solúvel exerce atração para monócitos, células *natural killer* (NK) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. A CXCL-16 apresenta como único receptor o CXCR6 (GOUGH *et al.*, 2004 e KRAWCZYK *et al.*, 2017).

A CXCL-16 é altamente expressa em trofoblastos e em células estromais da decídua. Outras quimiocinas além da CXCL-16 também são expressas na interface materno-fetal, como a CCL1, CCL3, CCL4, CCL9 e CXCL12. (ZHOU *et al.*, 2015 e JEONG *et al.*, 2017). Acredita-se que a CXCL-16 regule a proliferação e diferenciação de trofoblastos, sendo, essencial para o processo de placentação. Apesar de ter sido descrita a ação da CXCL-16 durante o primeiro trimestre de gestação, o seu papel ao longo da gestação permanece obscuro. Já foi descrito na literatura que a CXCL-16 estimula uma resposta do tipo Th1, o que reflete em uma maior produção das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF, e em uma menor produção da citocina IL-4 (produzida por linfócitos Th2). Contudo, também já foi observado que a CXCL-16 é capaz de induzir a polarização *in vitro* do tipo M2, os quais têm um perfil anti-inflamatório. Além disso, a CXCL-16 possui atividade pró-angiogênica; logo, pode favorecer uma formação de vasos sanguíneos uterinos e o remodelamento das artérias espiraladas uterinas. No entanto, são necessárias mais pesquisas para elucidar o papel desta quimiocina durante a gestação (SHI *et al.*, 2020).

A investigação dos níveis de CXCL-16 e PE é algo recente. Um estudo de caso controle demonstrou que os níveis da quimiocina encontravam-se elevados no soro de gestantes com PE, e que o aumento foi mais significativo na forma grave da doença (TOK *et al.*, 2019). Em contraste, Panagodage *et al.* (2016) encontraram menor expressão de CXCL-16 no soro de gestantes saudáveis. Já Schanz *et al.* (2011) demonstraram que os níveis de CXCL-16 em tecido placentário não diferiram entre gestantes normotensas e gestantes com PE.

Já foi descrita uma associação entre a IL-33 e a CXCL-16 em pacientes atópicos (com rinite e asma). A pesquisa demonstrou correlação inversa entre esses

biomarcadores, de modo que o bloqueio da IL-33 estimulou a expressão de CXCL-16 em experimento *in vitro* utilizando o plasma de pacientes atópicos (VOLOSHYNA *et al.*, 2015).

Dado às diversas evidências da participação da IL-33 e da CXCL-16 na regulação da resposta imune e durante gestação, pretendeu-se, por meio deste estudo, investigar os níveis plasmáticos desses mediadores em gestantes com PE, comparando-os aos níveis em gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Também foram analisadas as possíveis correlações entre os níveis de IL-33 e CXCL-16 e os parâmetros laboratoriais de gestantes com PE.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar os níveis plasmáticos dos mediadores IL-33 e CXCL-16 na circulação de mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia.

### **2.2 Objetivos específicos**

- . Mensurar os níveis plasmáticos de IL-33 em mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia;
- . Mensurar os níveis plasmáticos de CXCL-16 em mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia;
- . Avaliar as possíveis correlações entre os níveis destes mediadores assim como as características clínicas/ parâmetros laboratoriais das gestantes com pré-eclâmpsia.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

As integrantes deste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE n° 46297915.8.0000.5149) (**Anexo 1**), Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte / Belo Horizonte – MG (projeto de pesquisa n° 035/2009) (**Anexo 2**), Núcleo de Pesquisa da Maternidade Odete Valadares / Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) / Belo Horizonte – MG (pesquisa n° 077/2008) (**Anexo 3**), Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal Odilon Behrens (HOB) / Belo Horizonte – MG (**Anexo 4**), gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara/ Betim – MG (**Anexo 5**) e Diretoria do Hospital Público Regional de Betim (HPRB) / Betim – MG (**Anexo 6**), locais em que as gestantes foram selecionadas no pré-parto ou durante as consultas de pré-natal. As mulheres não gestantes eram acompanhantes ou estavam realizando consulta médica por outros motivos no hospital.

#### **3.2 Casuística**

##### **3.2.1 Seleção das participantes**

Trata-se de um estudo transversal que incluiu 79 mulheres, sendo estas divididas em três grupos: I) Mulheres não gestantes (n=25); II) Gestantes normotensas (n=34); III) gestantes com pré-eclâmpsia (n=20). Contudo, o número de participantes diferiu entre os marcadores. O desenho experimental para IL-33 contou com 73 mulheres: I) n= 23 II) n= 33 e III) n= 17. Já para CXCL-16, foram incluídas um total de 75 mulheres: I) n= 24; II) n=31; III) n=20. As amostras de sangue periférico haviam sido coletadas previamente por pesquisadores colaboradores da

UFMG. Vale ressaltar que os dados clínicos e laboratoriais foram coletados a partir do prontuário médico e cartão pré-natal das gestantes (grupos II e III) e durante a entrevista para preenchimento da ficha clínica de todas as participantes do estudo. O IMC das participantes que compõem os grupos II e III foi relatado a partir do peso habitual, ou seja, peso antes da gravidez.

### 3.2.2 Critérios de inclusão

Para as mulheres não gestantes (grupo I), os critérios de inclusão foram:

- Pressão sistólica e diastólica  $\leq 120 \times 80$  mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE.

Para as gestantes normotensas (grupo II) os critérios foram:

- Pressão sistólica e diastólica  $\leq 120 \times 80$  mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE;
- Estar no terceiro trimestre gestacional.

O diagnóstico de PE (grupo III) foi realizado pela equipe obstétrica das instituições de saúde participantes e confirmado pela equipe de pesquisadores da UFMG. Utilizaram-se os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia (ACOG, 2002) para confirmação do diagnóstico, a saber:

- Pressão sistólica/diastólica  $\geq 140 \times 90$  mmHg, aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, 4 horas e após repouso;
- Proteinúria ( $\geq 300$  mg em coleta de urina de 24 horas ou  $\geq 1+$  em uma amostra de urina aleatória). Na ausência de proteinúria, considerou-se para o diagnóstico da PE a hipertensão associada a distúrbios cerebrais a visuais, trombocitopenia, insuficiência renal, comprometimento da função hepática e/ou edema pulmonar.
- Estar no terceiro trimestre gestacional.

### 3.2.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram convergentes para os três grupos:

- Obesidade de grau II e III, segundo a OMS, consiste em um IMC = 30-39,9 e  $\geq 40$ , respectivamente.
- Presença de doenças intercorrentes, tais como, diabetes mellitus, câncer, distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e inflamatória/infecciosas.

O trabalho de parto avançado também foi um critério de exclusão adotado para os grupos II e III.

A idade gestacional das participantes dos grupos II e III foi pareada.

## 3.3 Material

### 3.3.1 Amostra biológica

De cada participante do estudo foram coletados 5mL de sangue periférico em tubos do tipo *VACUETTE*<sup>®</sup> contendo citrato de sódio, os quais foram devidamente identificados. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos em temperatura ambiente, para a obtenção do plasma que foi aliquoteado imediatamente e estocado em freezer a -80°C até a dosagem dos mediadores estudados.

## 3.4 Métodos



### 3.4.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para a mensuração das concentrações plasmáticas de IL-33 e CXCL-16, realizou-se os ensaios de ELISA quantitativo do tipo sanduíche empregando kits da PEPROTECH<sup>®</sup> (números de catálogo 900-K398 e 900-K230, respectivamente) de acordo com as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste, inicialmente, na sensibilização das microplacas com as respectivas soluções contendo os anticorpos de captura em tampão fosfato salino (PBS 1x) (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5mM em água destilada) com pH 7,2. Após as microplacas terem sido incubadas *overnight*, os anticorpos que não se ligaram foram removidos por meio de 4 lavagens consecutivas com solução de PBS 1x contendo 0,05% de *Tween* 20 (PBS/*Tween*). Em seguida, adicionou-se às microplacas a solução de bloqueio que consiste em 1% de albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS 1x, e elas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Depois, realizou-se mais uma etapa de lavagens com PBS/*Tween*. Foram realizadas as diluições seriadas dos padrões de cada ensaio, e os mesmos foram pipetados nas respectivas microplacas juntamente com as amostras. Após a etapa de incubação dos padrões e das amostras (2 horas à temperatura ambiente), as microplacas foram lavadas para retirar os antígenos que não se ligaram e, em seguida, anticorpos de detecção específicos para cada ensaio conjugados à peroxidase e avidina foram adicionados. Após incubação (30 minutos à temperatura ambiente), uma segunda lavagem foi realizada para remover os conjugados anticorpo-enzima que não se ligaram. Em seguida, o substrato ABTS (ácido 2,2' azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) foi adicionado às cavidades das microplacas. As reações resultantes foram observadas pela formação de produtos corados e as intensidades de cores produzidas foram medidas em espectrofotômetro (450nm), com a correção do comprimento de onda ajustado para 650nm, e eram proporcionais às concentrações dos mediadores no plasma. As concentrações dos mediadores em cada amostra foram obtidas interpolando-se as absorbâncias lidas nas respectivas curvas de calibração, conforme orientação do fabricante.

### 3.5 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism (versão 5.0), exceto as análises de correlações, as quais foram realizadas pelo programa SPSS (versão 13.0). Primeiro, aplicou-se o teste Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das variáveis contínuas. Em seguida, as variáveis paramétricas foram testadas pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (três grupos) ou pelo teste T de Student (dois grupos), sendo expressas por média  $\pm$  desvio padrão (DP). Já para os dados não paramétricos, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido pela correção de Dunn (três grupos) ou o teste de Mann-Whitney (dois grupos), sendo expressos como mediana (intervalo interquartil 25-75%). As variáveis categóricas foram submetidas ao teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson e apresentadas como número absoluto (porcentagem - %). O coeficiente de *Spearman* (Rs) foi utilizado para avaliar a existência de correlação entre as variáveis contínuas estudadas nas gestantes com PE (grupo III), a saber: níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16, parâmetros laboratoriais (ácido úrico, creatinina, contagem global de leucócitos, número de hemácias, hemograma, hemoglobina, hematócrito, lactato desidrogenase - LDH, número de plaquetas, AST, ALT, e ureia) e características clínicas (idade, IMC, GPG, IG, primigesta, PAS e PAD). Valores de  $p < 0,05$  ou  $p < 0,017$  (correção de Dunn) foram considerados estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características clínicas dos grupos pesquisados

As características clínicas das participantes dos três grupos estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Características clínicas dos grupos estudados**

Variáveis	Grupo I (n=25)	Grupo II (n=34)	Grupo III (n=20)	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
<b>Idade (anos)</b> <sup>A</sup> IQ (25-75%) (n)	23 (17,5-26,5) (25)	23 (20-27) (34)	29 (25,2-35,2) (20)	0,548	<0,001***	0,009***	0,004***
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b> <sup>A</sup> IQ (25-75%) (n)	20,9 (19,5-22,7) (16)	21,8 (19,3-24,4) (25)	23,6 (20,7-26,3) (12)	0,478	0,129	0,381	0,192
<b>GPG (Kg)</b> <sup>A</sup> IQ (25-75%) (n)	n.a	10 (8,4-15,2) (31)	12 (7,8-14,2) (18)	-	-	0,663	-
<b>IG (semanas)</b> <sup>B</sup> (DP) (n)	n.a	32 (4,06) (34)	31 (3,44) (20)	-	-	0,862	-
<b>Primigesta</b> <sup>C</sup> (%) (n)	n.a	15 (44%) (34)	7 (35%) (20)	-	-	0,510	-
<b>PAS (mmHg)</b> <sup>A</sup> IQ (25-75%) (n)	120 (105-120) (17)	110 (100-120) (26)	165 (160-180) (12)	0,231	<0,001***	<0,001***	<0,001***
<b>PAD (mmHg)</b> <sup>A</sup> IQ (25-75%) (n)	80 (70-80) (17)	70 (70-80) (26)	105 (92,5-110) (12)	0,154	<0,001***	<0,001***	<0,001***

Índice de massa corporal (antes da gestação para os grupos II e III); GPG: Ganho de peso na gestação; IG: Idade gestacional em semanas; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica n.a.: não se aplica. Grupo I: Mulheres não gestantes; Grupo II: Gestantes normotensas; Grupo III: Gestantes com PE. <sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%) (KruskalWallis seguido do pós-teste de Dunn/Mann-Whitney/). <sup>B</sup>Os dados paramétricos são apresentados como média ± DP (ANOVA seguido do pós-teste de Tukey/Teste t-Student). <sup>C</sup>A variável categórica é apresentada como número absoluto (porcentagem) (Teste  $\chi^2$  de Pearson) \* $p \leq 0,05$ . \*\* $p \leq 0,017$  (Correção de Dunn). p<sup>1</sup>: grupo I x grupo II; p<sup>2</sup>: grupo I x grupo III; p<sup>3</sup>: grupo II x grupo III; p<sup>4</sup>: grupo I x grupo II x grupo III.

Quando comparados os três grupos, a idade das participantes apresentou diferença, sendo maior no grupo de gestantes com PE (grupo III) quando comparado aos demais grupos (II e III).

O IMC, o GPG, a IG e a frequência de primigestas não diferiu entre os grupos.

Ao observar os valores das pressões arteriais sistólica e diastólica, constatou-se um aumento nas gestantes com PE em relação aos demais grupos. Porém, estes parâmetros não diferiram entre as mulheres não gestantes e as gestantes normotensas.

#### 4.2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE

Os dados laboratoriais das gestantes com PE estão demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2: Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE**

Parâmetros	Média/Mediana	DP/IQ (25-75%)	Intervalo de referencia <sup>1</sup>
Número de hemácias (x10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> ) <sup>A</sup>	4.040 (n=17)	3.755-4.360	2.710-4.430
Hemoglobina (g/dL) <sup>B</sup>	11,7 (n=20)	1,6	9,5-15,0
Hematócrito (%) <sup>B</sup>	35 (n=20)	4	28-40
Número de plaquetas (x10/L) <sup>A</sup>	233 (n=20)	125-258	146-429
Contagem global de leucócitos (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> ) <sup>B</sup>	9,1 (n=20)	2,6	5,9-16,9
AST (U/L) <sup>A</sup>	25 (n=20)	20-28	4-32
ALT (U/L) <sup>A</sup>	17 (n=20)	9-30	2-25
Ácido úrico (mg/dL) <sup>A</sup>	5,2 (n=19)	1,1	3,1-6,3
LDH (U/L) <sup>B</sup>	384 (n=18)	168	82-525
Ureia (mg/dL) <sup>A</sup>	25 (n=17)	17-32	6-24
Creatinina (mg/dL) <sup>A</sup>	0,7 (n=20)	0,6-0,9	0,4-0,9

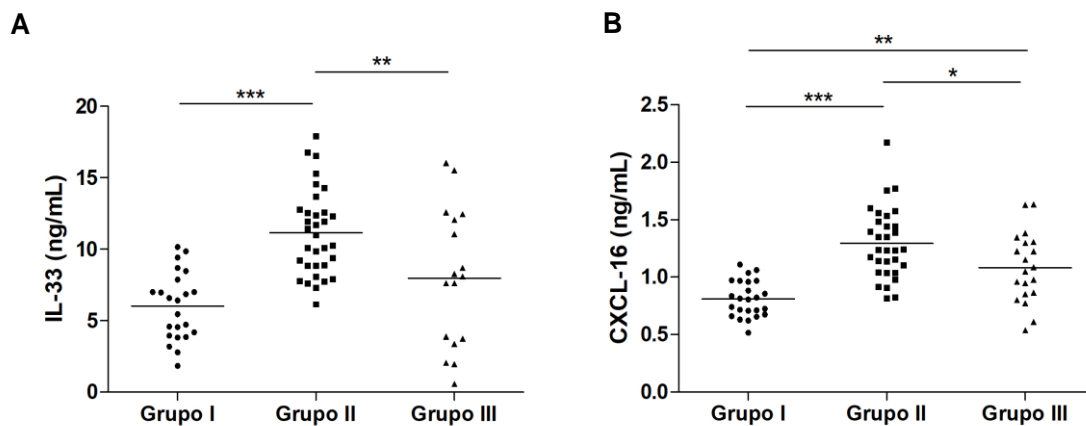
AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase.<sup>A</sup>Os dados não paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil - IQ 25-75%).<sup>B</sup>Os dados paramétricos estão representados como média ± DP. O intervalo de referência se refere a uma população de gestantes saudáveis no 3º trimestre gestação (ABBASSI-GHANA VATI et al.; 2009).

Ao analisar a mediana da ureia, percebeu-se que foi maior nas gestantes com PE em relação ao intervalo de referência considerado para gestantes saudáveis no

3º trimestre de gestação. Os demais parâmetros laboratoriais encontraram-se dentro da faixa de normalidade

#### 4.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16

Os níveis plasmáticos dos mediadores inflamatórios estão demonstrados na **Figura 2** para mulheres não gestantes (I), gestantes normotensas (II) e gestantes com pré-eclâmpsia (III).

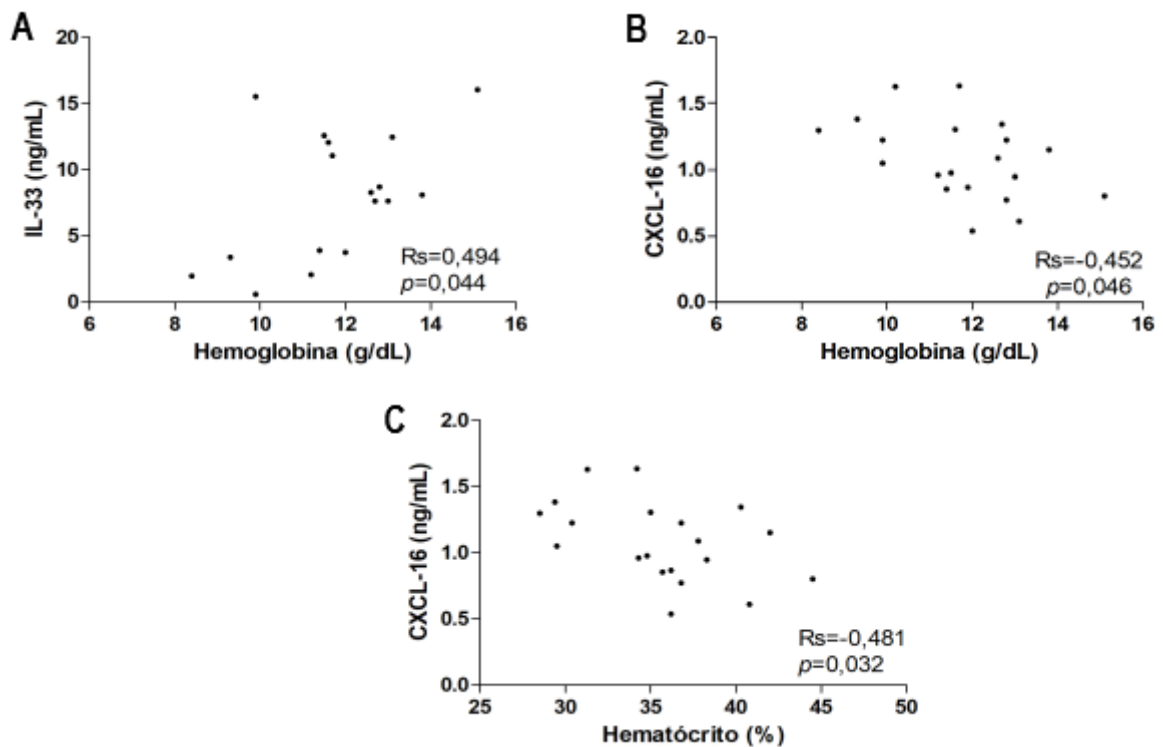


**Figura 3 – Níveis plasmáticos de IL-33 (A) e CXCL-16 (B) em mulheres não gestantes (I), gestantes normotensas (II) e gestantes com pré-eclâmpsia (III).** \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Os níveis plasmáticos de IL-33 (**Figura 3A**) e CXCL-16 (**Figura 3B**) foram maiores nas gestantes normotensas em comparação às mulheres não gestantes e às gestantes com PE. Os níveis de CXCL-16 também foram maiores nas gestantes com PE em comparação às mulheres não gestantes, porém esse parâmetro não diferiu para a IL-33. Avaliamos também os níveis dos mediadores para a PE precoce e tardia, porém estes não apresentaram diferença (dados não mostrados).

#### 4.4 Correlações entre os níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 e os parâmetros laboratoriais e as características clínicas das gestantes com PE.

A **Figura 4** apresenta as correlações significativas entre os níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.



**Figura 4 – Correlações significativas entre os níveis plasmáticos de IL-33 e CXCL-16 e os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE.** A) Correlação entre os níveis de IL-33 e de hemoglobina; B) Correlação entre os níveis de CXCL-16 e de hemoglobina; C) Correlação entre os níveis de CXCL-16 e de hematócrito.  $R_s$  = correlação de Spearman.

Os níveis de hemoglobina se correlacionaram de forma positiva com os níveis plasmáticos de IL-33 e, de forma negativa, com os níveis plasmáticos de CXCL-16 nas gestantes com PE. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre os níveis de CXCL-16 e os valores de hematócrito nas gestantes deste grupo. As demais correlações entre os mediadores inflamatórios e os demais parâmetros laboratoriais das gestantes com PE não foram significativas. Os níveis de IL-33 e CXCL-16 não apresentaram correlação no grupo de gestantes com PE. No entanto, foi observada uma correlação positiva ( $R_s=0,556$ ;  $p<0,001$ ) quando todas as participantes do estudo foram incluídas na análise.

Não houve correlação significativa entre os níveis dos mediadores e as características clínicas das gestantes com PE.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Características clínicas dos grupos pesquisados

A idade gestacional das gestantes do presente estudo foi pareada, pois sabe-se que os níveis circulantes de mediadores inflamatórios podem variar de acordo com a idade gestacional (KRONBORG *et al.*, 2011). De fato, não foi encontrada diferença significativa em relação à idade gestacional entre as participantes dos grupos II e III. O grupo III apresentou idade mais elevada, em relação aos demais grupos. Dentre as gestantes com PE, 25% apresentavam idade  $\geq 35$  anos. É conhecido que uma idade avançada pode corroborar para efeitos adversos na gestação, dentre estes a PE e eclâmpsia (KHALIL *et al.*, 2013).

Outro possível fator de risco para desenvolvimento da PE é a primeira gestação. Porém, o presente estudo não demonstrou diferença significativa em relação a este parâmetro para os grupos II e III. Em um estudo recente de coorte, Metcalfe, *et al.* (2020) verificaram que a primeira gestação aliada a uma idade avançada tende a conferir uma chance de 5,4% para manifestar a doença.

O Instituto de Medicina (IOM, 2009) redigiu diretrizes para o GPG, em que determinou para mulheres eutróficas (IMC = 18,5 – 24,9 Kg/m<sup>2</sup>) um ganho de peso aceitável de 11,5 a 16,0 quilos durante a gestação. As gestantes normotensas e com PE apresentaram IMC normal, para o peso habitual, bem como ganho de peso dentro do esperado. As mulheres não gestantes também foram classificadas como eutróficas no presente estudo.

Nesta pesquisa, não houve diferença significativa em relação à pressão arterial entre os grupos I e II, no entanto observou-se que as gestantes normotensas apresentavam valores ligeiramente inferiores. Durante uma gestação normal, na fase inicial (a partir de 11-12 semanas) ocorre a invasão do trofoblasto na parede uterina que leva ao remodelamento das artérias espiraladas uterinas. Esse processo possibilita o aumento no calibre dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente ocorre redução da resistência vascular, ocasionando uma pressão arterial menor do que o

estado não gravídico (KIROLLOS *et al.*, 2019). No entanto, é comum que o remodelamento das artérias uterinas seja incompleto na PE devido a uma falha no processo de invasão trofoblástica, e estas permanecem de baixo calibre e alta resistência, levando à hipóxia placentária. Como mecanismo de compensação de modo a garantir a perfusão necessária ao crescimento do feto, ocorre um aumento da pressão arterial sanguínea materna (DE OLIVEIRA *et al.*; 2010). Desta forma, explica-se a diferença significativa das pressões arteriais sistólica e diastólica em mulheres com PE em relação aos demais grupos ( $p > 0,001$ ). Estudos apontam como característica severa da PE as pressões arteriais sistólica e diastólica  $\geq 160/110$  mmHg, as quais estão relacionadas a um menor crescimento fetal e a várias complicações da doença, como a eclâmpsia e a síndrome HELLP (ROCCELLA, 2000 e LISONKOVA *et al.*, 2014).

Acredita-se que as formas precoce e tardia da PE apresentem fisiopatologias distintas e que, por essa razão, deveriam ser estudadas separadamente. A PE precoce é a manifestação que traz maiores complicações maternas e fetais; felizmente, sua prevalência é menor quando comparada à PE tardia (SOTO *et al.*, 2012). No entanto, em nosso estudo houve predomínio de gestantes com PE precoce, cerca de 75% das gestantes do grupo III, provavelmente porque as gestantes com PE foram recrutadas de maternidades referência em gestações de alto risco da região metropolitana de Belo Horizonte - MG.

## **5.2 Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE**

Durante a gestação saudável, ocorrem adaptações fisiológicas que refletem nos parâmetros laboratoriais, como por exemplo, o aumento do volume sanguíneo e, conseqüentemente, do plasma. Segundo De Haas *et al.*, (2017) este aumento em gestantes pode chegar a 1 litro de diferença quando comparado às mulheres não gestantes. O aumento do volume sanguíneo materno permite o desenvolvimento adequado do feto. Porém, em gestantes com PE, este aumento tende a ser cerca de 13% menor em relação às gestantes normotensas (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002).



O número de plaquetas pode ser utilizado como marcador precoce para o diagnóstico de doenças tromboembólicas (ABDEL-MONEIM ALKHOLY *et al.*, 2013). Espera-se que em gestações normotensas ocorra um aumento do número de plaquetas conforme a proximidade do parto, como uma maneira de reduzir as chances de hemorragia (TOWNSLEY, 2013). Na PE, acredita-se que aconteça maior consumo de plaquetas, devido à desregulação do sistema hemostático. O estado de hipercoagulabilidade nas gestantes com PE, especialmente durante o terceiro trimestre de gestação, está relacionado a uma redução no número de plaquetas circulantes devido ao seu maior consumo, podendo desencadear um quadro de CID. Esse estado também predispõe a uma maior chance de desenvolvimento de trombos, incluindo na placenta, o qual pode desencadear a lise de hemácias (BEILIN; REDMAN; BONNAR, 1978 e LURIE; FEINSTEIN; MAMET, 2000). Em relação ao número de plaquetas, o grupo de gestantes com PE do presente estudo apresentou os valores medianos dentro da faixa de normalidade. Esses dados estão de acordo com os relatados por Han *et al.*, (2014) e Thalor *et al.*, (2019) que, apesar de terem relatado uma diminuição do número de plaquetas circulantes em gestantes com PE, este estava dentro da faixa de normalidade.

A contagem global de leucócitos em gestantes normotensas é maior quando comparado a mulheres não gestantes ( $5,0$  a  $7,0 \times 10^3$  /mm<sup>3</sup>). Esta diferença acontece porque a gestação é fisiologicamente associada a um estado de inflamação branda. Ademais, a leucocitose é relacionada principalmente, ao número de neutrófilos (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002). Observou-se, no presente estudo, que a média da contagem global de leucócitos nas gestantes com PE apresentou valores normais para gestantes no terceiro trimestre de gestação. No entanto, em um estudo prévio da literatura, este parâmetro estava aumentado nas gestantes com PE, possivelmente como um reflexo da inflamação materna sistêmica exacerbada (YANG *et al.*, 2012).

Outra adaptação fisiológica durante a gravidez saudável é a hemodiluição, em que auxilia no transporte de oxigênio para o feto por reduzir a viscosidade sanguínea e a resistência vascular periférica. Contudo, na PE os valores de hematócritos aproximam-se das mulheres não gestantes (SOUZA; FILHO; FERREIRA, 2002). Conforme descrito anteriormente, as gestantes com PE do presente estudo

apresentaram níveis médios de hematócrito dentro da faixa de normalidade. Esse dado também sugere a ausência de anemia nessas gestantes. A anemia em gestantes é geralmente microcítica e hipocrômica decorrente da carência de ferro, e leva a uma queda nos valores do hematócrito (PATRA *et al.*, 2005).

Dados da literatura apontam para um aumento nos níveis séricos da hemoglobina (Hb) durante as gestações com PE, como um mecanismo compensatório à hipóxia placentária que ocorre na doença. Vale ressaltar que a placenta pode funcionar como um local de hematopoeise extra-medular. A principal Hb que aumenta durante a gestação é a do tipo fetal. A Hb fetal, em sua forma livre, pode desencadear dano oxidativo da barreira sangue-placenta extravasando para a circulação materna. Entre a complicação deste aumento encontra-se a restrição de crescimento fetal (CENTLOW *et al.*, 2008 e BELLOS *et al.*, 2020). No entanto, em nosso estudo, os níveis médios de Hb das gestantes com PE estavam dentro da faixa de normalidade, confirmando a ausência de anemia nesta população.

As gestantes com PE podem desenvolver disfunção hepática. Portanto, utiliza-se como marcadores para o monitoramento da função hepática nestas gestantes as enzimas AST e ALT (Nutrição em Obstetria e Pediatria, 2009). Os níveis séricos de AST são normalmente superiores ao do ALT, e o aumento dessas enzimas indica necrose periportal decorrente de hipóxia no fígado (DACAJ *et al.*, 2016). Apesar de os valores de AST e ALT das gestantes com PE do nosso estudo estarem dentro dos valores considerados normais durante o terceiro trimestre de gestação, indicando que as mesmas não desenvolveram disfunção hepática, a maior produção de AST em relação ao ALT está de acordo com o descrito na literatura.

A LDH é uma enzima que catalisa a conversão de lactato a piruvato e que se encontra em concentração elevada no interior das hemácias sendo, por este motivo, usada como um marcador de hemólise. Esta manifestação é esperada nas formas mais graves da PE, especialmente em gestantes que desenvolvem a síndrome HELLP (BURTIS *et al.*; 2007). Jaiswar *et al.*, (2011), verificaram uma relação inversa entre os níveis séricos de LDH e o peso do bebê ao nascer em mulheres que apresentaram PE. Desta forma, esse achado laboratorial está associado a um risco aumentado de complicações maternas e neonatais. No presente estudo, as

gestantes com PE apresentaram níveis de LDH dentro da faixa de referência, indicando que as mesmas não apresentavam sinais de hemólise no momento de coleta do sangue periférico. Além disso, a mediana da contagem de hemácias dentro da normalidade corrobora com a inferência de ausência de hemólise nessas gestantes.

O fluxo plasmático renal aumenta significativamente durante a gestação, principalmente no terceiro trimestre. Em gestações saudáveis, espera-se que a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) aumente em até 50%. A TGF é estimada através de uma fórmula matemática baseada nos níveis de creatina sérica e na idade, gênero e etnia do paciente. Como consequência do aumento da TFG, é comum que as mulheres desenvolvam frequência urinária aumentada, disúria e incontinência urinária durante a gravidez (MÜLLER-DEILE, 2014 e WILES *et al.*, 2019). A creatinina é produzida a partir da degradação de fosfocreatina nos músculos e possui níveis praticamente constantes em organismos saudáveis. Desse modo, níveis aumentados de creatinina sérica indicam uma redução da TFG. Os resíduos nitrogenados produzidos a partir do metabolismo de proteínas e purinas são excretados pela urina de mamíferos na forma de ureia e de ácido úrico, respectivamente. Coletivamente, a creatinina, a ureia e o ácido úrico são usados como marcadores de disfunção renal (BURTIS; ASHWOOD, 2007). Os nossos resultados demonstraram que os níveis de ureia estavam levemente alterados nas gestantes com PE, apesar disso, a creatinina estava dentro dos valores de referência, indicando que provavelmente as gestantes não apresentavam lesões renais.

Em gestantes saudáveis, espera-se que ocorra uma diminuição dos níveis séricos de ácido úrico, devido aos estrógenos, aumento do volume plasmático e da TFG. Porém, em gestantes com PE, é comum que ocorra um aumento nos níveis do ácido úrico devido à diminuição da TFG. O ácido úrico pode exercer atividade antioxidante no sangue ao reagir com radicais hidroxila, oxigênio singlete e ácido hipocloroso. Apesar de exercer esta atividade protetora, o ácido úrico atua como um potente indutor da inflamação, favorecendo a disfunção endotelial (LAM *et al.*, 2005). A mediana dos níveis de ácido úrico nas gestantes com PE do presente estudo estava dentro da faixa de normalidade.

### 5.3 Avaliação das concentrações plasmáticas de IL-33 e CXCL-16 e suas associações com parâmetros laboratoriais em gestantes com PE

Em concordância com nossos achados, Gökdemir *et al.* (2016) e Beneventi *et al.* (2019) constataram níveis plasmáticos menores de IL-33 em gestantes com PE quando comparado às gestantes normotensas. Em um estudo recente, Chen *et al.* (2018) observaram que as gestantes com a doença apresentaram uma menor expressão de IL-33 placentária do que as gestantes saudáveis. Além disso, foi realizado neste estudo o silenciamento do gene da IL-33 em células de origem trofoblástica (HTR8/SVneo e explantes vilosos) utilizando RNA de interferência. Observou-se que o silenciamento da IL-33 reduziu a proliferação, a migração e a capacidade invasiva das células HTR8/SVneo. A distância de migração dos explantes vilosos também foi significativamente reduzida. Esses dados sugerem que a redução da produção da IL-33 está relacionada a uma menor capacidade funcional dos trofoblastos o que, conseqüentemente, implicaria em insuficiência placentária associada à PE.

Granne *et al.* (2011); Soto *et al.* (2012) e Stampalija *et al.* (2013) ao pesquisarem os níveis plasmáticos e placentários de IL-33, não detectaram diferença significativa entre as mulheres não gestantes, as gestantes saudáveis e as gestantes com PE. Yu *et al.* (2017) também não encontraram diferença significativa em relação aos níveis plasmáticos de IL-33 entre gestantes com PE (formas leve e grave) e gestantes normotensas. No entanto, verificaram que os níveis de IL-33 se correlacionaram de forma positiva com o número de células Treg (CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) em gestantes com PE. Além disso, a IL-33 estimulou a proliferação de células Treg quando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de gestantes normotensas foram estimuladas com a citocina. As células Treg são importantes produtoras das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- $\beta$ . Deste modo, sugere-se que a IL-33 favoreça a tolerância alógena na interface materno-fetal via proliferação de células Treg e liberação de IL-10 e TGF- $\beta$  (LAI; KALKUNTE; SHARMA, 2011).

Também já foi demonstrado que a IL-33 induz a polarização de linfócitos Th2 e macrófagos M2 *in vivo* (SCHMITZ *et al.*, 2005 e KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2009 e SEO *et al.*, 2017). A IL-33 é, portanto, caracterizada por exercer uma ação

pleiotrópica, atuando em ambas as respostas imunes inata e adaptativa, inclusive na imunidade tipo Th1 e em respostas citotóxicas. A ação reguladora ou pró-inflamatória da IL-33 parece depender da doença ou modelo experimental estudado, do tipo celular e da fase da resposta inflamatória investigada.

A divergência de resultados encontrados da dosagem de IL-33 no nosso estudo e nos estudos da literatura pode ser devido a diferenças nas populações estudadas relacionadas, por exemplo, à etnia, idade e IMC das gestantes, presença de co-morbidades e idade gestacional no momento da coleta das amostras de sangue. Em nosso estudo, todas as gestantes estavam no terceiro trimestre de gestação e foram excluídas pacientes com obesidade grau II e III, presença de doenças intercorrentes, tais como, diabetes mellitus, câncer, distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e inflamatória/infecciosas. Além disso, a gravidade da PE e o tamanho amostral dos grupos podem ter influenciado nas dosagens de IL-33. Em nosso estudo, 75% das gestantes tinham a forma precoce da PE e todas apresentavam a PE com características graves. Outro ponto a ser considerado é o método utilizado para a detecção dos níveis circulantes da IL-33. Semelhante ao presente trabalho, a maior parte dos estudos da literatura usou o método de ELISA, porém o Luminex foi usado no estudo de Yu *et al.*, (2017). Variação nos protocolos dos imunoenaios e no processamento e armazenamento das amostras também podem ter contribuído para essas divergências detectadas.

Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de CXCL-16 estavam diminuídos nas gestantes com PE em comparação às gestantes normotensas. Em concordância com esses dados, Lekva *et al.* (2017) relataram uma menor expressão do RNAm de CXCL-16 em PBMCs isolados de gestantes com PE com idade gestacional entre 36 e 38 semanas. Panagodage *et al.* (2016) realizaram um experimento *in vitro* em que células BeWo, linhagem celular de coriocarcinoma humano que exibe características morfológicas e bioquímicas semelhantes ao trofoblastos, foram tratadas com soro proveniente de gestantes normotensas ou com PE. Esse estudo demonstrou que o soro de gestantes com PE induziu uma menor expressão proteica e do RNAm de CXCL-16 em células BeWo quando comparado ao grupo tratado com o soro de gestantes normotensas. Ademais, esse efeito provocado pelo soro de gestantes com PE foi significativamente atenuado quando as células foram tratadas com o soro

associado a baixas doses de ácido acetilsalicílico (5 µg/mL). Existem evidências de que a CXCL-16 induz a proliferação e a invasão trofoblasto, e reduz a sua apoptose (HUANG *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2008 e FAN *et al.*, 2019). Sendo assim, uma menor produção de CXCL-16 na PE pode estar associada a uma menor capacidade invasiva dos trofoblastos e, conseqüentemente, à placentação defeituosa em gestantes com a doença.

Outros estudos também avaliaram os níveis circulantes da quimiocina na PE, porém os resultados são conflitantes. Schanz *et al.*, (2011) e Charkiewicz *et al.* (2017) não encontraram diferenças significativas nos níveis plasmáticos e placentários de CXCL-16 entre gestantes saudáveis e com PE. Por outro lado, Tok *et al.* (2019) e Estensen *et al.* (2015) encontraram níveis séricos elevados de CXCL-16 em gestantes com PE. No estudo de Lekva *et al.* (2017) os níveis plasmáticos de CXCL-16 também estavam significativamente aumentados à termo (36-38 semanas) e em períodos gestacionais anteriores (22-24 e 36-38 semanas) em gestantes que desenvolveram a PE, quando comparado às gestantes que não desenvolveram a doença. Em adição, os níveis de CXCL-16 se correlacionaram de forma positiva com os níveis de AST, ALT e creatinina sérica em gestantes com PE no estudo de Tok *et al.* (2019). Os autores deste estudo sugeriam que níveis aumentados de CXCL-16 estejam envolvidos com danos hepáticos e renais em gestantes com PE. Em nosso estudo, não foi observada correlação significativa entre os níveis de CXCL-16, AST, ALT e creatinina em gestantes com PE. Cumpre ressaltar que esses parâmetros laboratoriais estavam dentro dos valores de referência em nosso coorte de gestantes com PE. Já no estudo de Tok *et al.* (2019), as gestantes com PE apresentaram níveis aumentados de AST, ALT e creatinina em relação ao grupo controle.

Lekva *et al.*, (2017) ao analisarem os níveis plasmáticos de CXCL-16 em gestantes normotensas, gestantes com Diabetes Mellitus gestacional e gestantes com PE, observaram uma correlação positiva com a pressão arterial sistólica entre 14-16 e 22-24 semanas de gestação, bem como com a pressão arterial diastólica entre 30-32 semanas de gestação. Este estudo incluiu todas as gestantes nas análises de correlação. Já em nosso estudo, avaliamos as correlações apenas em gestantes com PE e isso provavelmente justifica o fato de não termos encontrado

correlação significativa entre os níveis de CXCL-16 e as pressões arteriais sistólica e diastólica. Corroborando com nossos achados, Estensen *et al.* (2015) também não encontraram correlação significativa entre os níveis plasmáticos de CXCL-16 e a média da pressão arterial no grupo de gestantes com PE (IG 35  $\pm$ 5 semanas). Foi demonstrado que ocorre uma queda significativa na concentração plasmática da quimiocina em mulheres de ambos os grupos (gestação normotensa e com PE) após o parto (ESTENSEN *et al.*, 2015 e LEKVA *et al.*, 2017). De fato, encontramos em nosso estudo níveis maiores de CXCL-16 em gestantes (normotensas e com PE) em relação às mulheres não gestantes. Em conjunto, esses dados sugerem que a CXCL-16 esteja fisiologicamente aumentada durante a gestação. Nos estudos de Estensen *et al.* (2015) e Lekva *et al.* (2017), os níveis de CXCL-16 se igualaram entre mulheres que eram previamente normotensas ou pré-eclâmpticas 6 meses e 5 anos após a gestação, respectivamente.

Wang *et al.* (2018) mostraram que a CXCL-16 derivada de células trofoblásticas do primeiro trimestre de gestação é capaz de induzir a polarização de macrófagos M2, fenótipo que auxilia na tolerância materno-fetal. Além disso, a citotoxicidade das células NK foi atenuada pela polarização M2 induzida pela CXCL-16 (WANG *et al.*, 2018). Paradoxalmente, um estudo *in vivo* que utilizou camundongos deficientes para a CXCL-16 verificou que a quimiocina induziu uma resposta imune do tipo Th1 mediada por células NK (SHIMAOKA *et al.*, 2007). Uma resposta Th1 transitória na interface materno-fetal envolvendo a síntese de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , poderia ser benéfica para a implantação do embrião. Porém, sabe-se que o fenótipo do tipo Th1 persistente durante a gestação está associado a diversas complicações, incluindo a PE. São necessários mais estudos para melhor compreensão destes mecanismos no desenvolvimento e progressão da gestação com PE.

Os níveis de hemoglobina detectados no soro são decorrentes da hemólise, processo caracterizado pela destruição das hemácias (ou eritrócitos) da circulação. A hemólise intravascular pode ocorrer em várias condições clínicas, tais como as anemias hemolíticas, anemia falciforme, beta-talassemia, bem como em algumas reações transfusionais e em infecções, como as causadas pelo *Plasmodium* sp. e *Clostridium perfringens*. A hemólise libera quantidades significativas de DAMPs,

como o heme, nos vasos sanguíneos. O heme é capaz de amplificar a resposta inflamatória ao se ligar a receptores celulares do tipo Toll (MENDONÇA; SILVEIRA; CONRAN, 2016). Os níveis séricos da enzima LDH refletem o grau de hemólise intravascular. Níveis de LDH 1,6x maiores do que os normais ou  $\geq 400$  U/L são frequentemente encontrados em gestantes com a forma grave da PE (BURWICK *et al.*, 2018). Porém, em nosso estudo, os níveis de LDH das gestantes com PE estavam dentro da faixa de normalidade.

Foi observada uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de IL-33 e os níveis séricos de hemoglobina em gestantes com PE do nosso estudo. Wei *et al.*, (2015) observaram que os níveis de IL-33 se correlacionaram positivamente com os níveis de hemoglobina em pacientes com anemia falciforme. Este estudo identificou níveis proteicos e de RNAm da IL-33 nos estágios tardios da diferenciação dos eritrócitos, o que sugere que a IL-33 seja expressa durante a maturação dessas células sanguíneas. Além disso, os autores detectaram por *immunoblotting* que os níveis de IL-33 estavam aumentados no sobrenadante de amostras de sangue lisadas quando comparado a amostras não lisadas coletadas de camundongos. Assim, este estudo demonstrou que os eritrócitos são fontes relevante de IL-33, a qual é liberada na circulação em grandes quantidades após hemólise. A IL-33 liberada por eritrócitos pode contribuir para a resposta inflamatória que ocorre em doenças onde ocorre hemólise aumentada, como a PE.

O hematócrito é um parâmetro laboratorial que representa a porcentagem de volume ocupado pelos eritrócitos em relação ao volume total de sangue. Valores baixos de hematócrito refletem menor produção de hemácias ou sua maior lise / morte celular (NEMER, 2010). A eriptose é um processo fisiológico que visa a eliminação de eritrócitos senescentes ou danificados. Porém, quando excessiva, pode levar à anemia. Já foi demonstrado que a fosfatidilserina exposta na superfície de eritrócitos se liga a CXCL-16 expressa no endotélio, e que esse processo leva à eriptose, tipo especial de morte programada de eritrócitos. Os eritrócitos em eriptose são posteriormente “engolfados” por células fagocíticas e eliminados da circulação (LANG *et al.*, 2014). Foi observada uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos de CXCL-16 e os níveis de hematócrito das gestantes com PE em nosso estudo. Esse resultado era esperando, tendo em vista a relação existente



entre a CXCL-16 e a eritrose. Esperava-se também que os níveis da quimiocina se correlacionassem positivamente com os níveis de hemoglobina em gestantes com PE. No entanto, uma correlação inversa foi observada em nosso estudo.

## **6 CONCLUSÃO**

Os nossos resultados sugerem que as gestantes com PE possuem uma deficiência na produção sistêmica de IL-33 e CXCL-16 durante o terceiro trimestre de gestação. No entanto, mais estudos são necessários para investigar se isso está relacionado a falhas na regulação da resposta inflamatória materna e ao fenótipo pró-inflamatório comumente descrito nessas gestantes.

## REFERÊNCIAS

ABBASSI-GHANA VATI, M.; GREER, L.; FG, C. A Reference Table for Clinicians. **Obstetrics & Gynecology**, v. 114, n. 6, p. 1326–1331, 2009.

ABDEL-MONEIM ALKHOLY, E. et al. the Significance of Platelet Count, Mean Platelet Volume and Platelet Width Distribution Inpreeclampsia. **Aamj**, v. 11, n. 1, 2013.

ACCIOLY, E. **Nutrio em Obstetricia e Pediatria**, [s.d.].

ACOG COMMITTEE ON OBSTETRIC PRACTICE. ACOG Practice Bulletin No. 202: Gestational Hypertension and Preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, v. 133, n. 1, p. e1–e25, 2019.

ALIJOTAS-REIG, J.; MELNYCHUK, T.; GRIS, J. M. Regulatory T cells, maternal-foetal immune tolerance and recurrent miscarriage: New therapeutic challenging opportunities. **Medicina Clinica**, v. 144, n. 6, p. 265–268, 2015.

ALTARA, R. et al. Conflicting vascular and metabolic impact of the IL-33/sST2 axis. **Cardiovascular research**, v. 114, n. 12, p. 1578–1594, 2018.

BAINBRIDGE, S. A.; SIDLE, E. H.; SMITH, G. N. Direct placental effects of cigarette smoke protect women from pre-eclampsia: The specific roles of carbon monoxide and antioxidant systems in the placenta. **Medical Hypotheses**, v. 64, n. 1, p. 17–27, 2005.

BEILIN, L.; REDMAN, C. W. G.; BONNAR, J. Early platelet consumption in pre-eclampsia. **British Medical Journal**, v. 1, n. 6111, p. 467–469, 1978.

BELLOS, I. et al. The role of hemoglobin degradation pathway in preeclampsia: A systematic review and meta-analysis. **Placenta**, v. 92, p. 9–16, 2020.

BENEVENTI, F. et al. Maternal and fetal Leptin and interleukin 33 concentrations in pregnancy complicated by obesity and preeclampsia. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 7058, 2019.

BEZERRA MAIA E HOLANDA MOURA, S. et al. Prevention of preeclampsia. **Journal of Pregnancy**, v. 2012, 2012.

BIRSNER, M. L.; GYAMFI-BANNERMAN, C. Committee on Obstetric Practice Physical Activity and Exercise During Pregnancy and the Postpartum Period. **ACOG COMMITTEE OPINION Number**, v. 804, n. 804, p. 178–188, 2015.

BUPP, M. R. G. et al. The confluence of sex hormones and aging on immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 2018.

BURTIS, C.; ASHWOOD, E. **Tietz fundamentos de química clínica** BURTIS, C.; ASHWOOD, E. **Tietz fundamentos de química clínica**. [s.l: s.n.]. [s.l: s.n.].

BURWICK, R. M. et al. Evaluation of hemolysis as a severe feature of preeclampsia.

**Hypertension**, v. 72, n. 2, p. 460–465, 2018.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 154–168, 2018.

CHAIWORAPONGSA, T. et al. Pre-eclampsia part 1: Current understanding of its pathophysiology. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 8, p. 466–480, 2014.

CHARKIEWICZ, K. et al. Angiogenic factor screening in women with mild preeclampsia – New and significant proteins in plasma. **Cytokine**, v. 106, n. February, p. 125–130, 2017.

CHEN, H. et al. Decreased IL-33 production contributes to trophoblast cell dysfunction in pregnancies with preeclampsia. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

COLÉGIO AMERICANO DE OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA (ACOG, 2002). Practice bulletin #33: diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, v. 99, n. 1, p. 159–167, 2002.

DACAJ, R. et al. Elevated Liver Enzymes in Cases of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. **Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)**, v. 70, n. 1, p. 44–47, 2016.

DE HAAS, S. et al. Adaptación fisiológica del volumen del plasma materno durante el embarazo: una revisión sistemática y metaanálisis. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 49, n. 2, p. 177–187, 2017.

DE OLIVEIRA, L. G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. [Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction]. **Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia**, v. 32, n. 12, p. 609–16, 2010.

DEKKER, G.; ROBILLARD, P. Y.; ROBERTS, C. The etiology of preeclampsia: The role of the father. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 89, n. 2, p. 126–132, 2011.

DI CASTRO, M. A. et al. The chemokine CXCL16 modulates neurotransmitter release in hippocampal CA1 area. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

ESTENSEN, M. E. et al. Elevated inflammatory markers in preeclamptic pregnancies, but no relation to systemic arterial stiffness. **Pregnancy Hypertension**, v. 5, n. 4, p. 325–329, 2015.

FAN, D. X. et al. Trophoblast-Derived CXCL16 Decreased Granzyme B Production of Decidual  $\gamma\delta$  T Cells and Promoted Bcl-xL Expression of Trophoblasts. **Reproductive Sciences**, v. 26, n. 4, p. 532–542, 2019.

FEBRASGO. Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos. v. 8, p. 56, 2017.

FERNANDEZ, E. J.; LOLIS, E. S Structure , F Unction , and I Nhhibition. n. 1, 2002.

FOCK, V. et al. Macrophage-Derived IL-33 Is a Critical Factor for Placental Growth. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 7, p. 3734–3743, 2013.

FOLK, D. M. Hypertensive Disorders of Pregnancy: Overview and Current Recommendations. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 63, n. 3, p. 289–300, 2018.

GIANNAKOU, K.; EVANGELOU, E.; PAPTAEODOROU, S. I. Genetic and non-genetic risk factors for pre-eclampsia: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 51, n. 6, p. 720–730, 2018.

GÖKDEMİR, I. E. et al. Evaluation of ADAMTS12, ADAMTS16, ADAMTS18 and IL-33 serum levels in pre-eclampsia. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 29, n. 15, p. 2451–2456, 2016.

GOUGH, P. J. et al. A Disintegrin and Metalloproteinase 10-Mediated Cleavage and Shedding Regulates the Cell Surface Expression of CXC Chemokine Ligand 16. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 6, p. 3678–3685, 2004.

GRANNE, I. et al. ST2 and IL-33 in pregnancy and pre-eclampsia. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. SUPPL. 10, p. 5–12, 1994.

HAN, L. et al. Blood coagulation parameters and platelet indices: Changes in normal and preeclamptic pregnancies and predictive values for preeclampsia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–14, 2014.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 149–160, 2015.

HUANG, Y. et al. Human Trophoblasts Recruited T Lymphocytes and Monocytes into Decidua by Secretion of Chemokine CXCL16 and Interaction with CXCR6 in the First-Trimester Pregnancy. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 4, p. 2367–2375, 2008.

ISTITUTO DE MEDICINA. **Composition and Components of Gestational Weight Gain: Physiology and Metabolism**. [s.l.: s.n.].

J., J. et al. Hypertension in Pregnancy. **Adv Exp. Medicine, Biology-Neuroscience and respiration.**, v. 6, n. October 2014, p. 57–66, 2016.

JAIWAR, S. P. et al. Lactic dehydrogenase: A biochemical marker for preeclampsia-eclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 61, n. 6, p. 645–648, 2011.

JEONG, W. et al. Differential expression and functional roles of chemokine (C-C motif) ligand 23 and its receptor chemokine (C-C motif) receptor type 1 in the uterine

endometrium during early pregnancy in pigs. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 76, p. 316–325, 2017.

JOHANSSON, K.; MCSORLEY, H. J. Interleukin-33 in the developing lung—Roles in asthma and infection. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 30, n. 5, p. 503–510, 2019.

KHALIL, A. et al. Maternal age and adverse pregnancy outcome: A cohort study. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 42, n. 6, p. 634–643, 2013.

KIROLLOS, S. et al. A Systematic Review of Vascular Structure and Function in Pre-eclampsia: Non-invasive Assessment and Mechanistic Links. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. November, 2019.

KRAWCZYK, K. M. et al. Papillary renal cell carcinoma-derived chemerin, IL-8, and CXCL16 promote monocyte recruitment and differentiation into foam-cell macrophages. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 11, p. 1296–1305, 2017.

KRONBORG, C. S. et al. Longitudinal measurement of cytokines in pre-eclamptic and normotensive pregnancies. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 7, p. 791–796, 2011.

KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6469–6477, 2009.

KYROU, D. et al. Is the use of donor sperm associated with a higher incidence of preeclampsia in women who achieve pregnancy after intrauterine insemination? **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1124–1127, 2010.

LAI, Z.; KALKUNTE, S.; SHARMA, S. A critical role of interleukin-10 in modulating hypoxia-induced preeclampsia-like disease in mice. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 505–514, 2011.

LAM, C. et al. Uric acid and preeclampsia. **Seminars in Nephrology**, v. 25, n. 1, p. 56–60, 2005.

LANG, F. et al. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 138–153, 2014.

LEKVA, T. et al. CXC chemokine ligand 16 is increased in gestational diabetes mellitus and preeclampsia and associated with lipoproteins in gestational diabetes mellitus at 5 years follow-up. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 14, n. 6, p. 525–533, 2017.

LEWANDOWSKA, M.; WIĘCKOWSKA, B. The Influence of Various Smoking Categories on The Risk of Gestational Hypertension and Pre-Eclampsia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1743, 2020.

LIEW, F. Y.; GIRARD, J. P.; TURNQUIST, H. R. Interleukin-33 in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 11, p. 676–689, 2016.

LIN, S. HUI et al. Inflammation elevated IL-33 originating from the lung mediates inflammation in acute lung injury. **Clinical Immunology**, v. 173, p. 32–43, 2016.

LISONKOVA, S. et al. Maternal morbidity associated with early-onset and late-onset Preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology**, v. 124, n. 4, p. 771–781, 2014.

LURIE, S.; FEINSTEIN, M.; MAMET, Y. Disseminated intravascular coagulopathy in pregnancy: Thorough comprehension of etiology and management reduces obstetricians' stress. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 263, n. 3, p. 126–130, 2000.

MAYRINK, J. et al. Incidence and risk factors for Preeclampsia in a cohort of healthy nulliparous pregnant women: a nested case-control study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

MENDONÇA, R.; SILVEIRA, A. A. A.; CONRAN, N. Red cell DAMPs and inflammation. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 665–678, 2016.

METCALFE, A.; AHMED, S. B.; NERENBERG, K. Age-period-cohort effects in pre-existing and pregnancy-associated diseases amongst primiparous women. **Biology of Sex Differences**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2020.

MILLER, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation**, v. 8, p. 1–12, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. **Guia Alimentar para a População Brasileira Guia Alimentar para a População Brasileira**. v. 2, 2014.

MOL, B. W. J. et al. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 999–1011, 2016.

MÜLLER-DEILE, J. Preeclampsia from a renal point of view: Insides into disease models, biomarkers and therapy. **World Journal of Nephrology**, v. 3, n. 4, p. 169, 2014.

NAZE, C. CME Review Article. **Pediatric emergency care**, v. 33, n. 12, p. 792–793, 2017.

NEMER, N. E F. **Manual de solicitação e interpretação de exames laboratoriais**, 2010.

NUNES, T.; BERNARDAZZI, C.; DE SOUZA, H. S. Interleukin-33 and inflammatory bowel diseases: Lessons from human studies. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

OLIVEIRA PERUCCI, L. et al. Pre-eclampsia is associated with reduced resolvin D1 and maresin 1 to leukotriene B4 ratios in the plasma. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 2, p. 0–3, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Recomendações da OMS para prevenção e tratamento da pré-eclâmpsia**, 2018.

PALOMINO, D. C. AROLIN. T.; MARTI, L. C. AVALHEIR. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PANAGODAGE, S. et al. Low-Dose Acetylsalicylic Acid Treatment Modulates the Production of Cytokines and Improves Trophoblast Function in an in Vitro Model of Early-Onset Preeclampsia. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 12, p. 3217–3224, 2016.

PATRA, S. et al. Maternal and perinatal outcome in patients with severe anemia in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 91, n. 2, p. 164–165, 2005.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 1, p. 62–70, 2009.

PERUCCI, L. O. et al. Soluble endoglin, transforming growth factor-beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2014.

PERUCCI, L. O. et al. Annexin A1 Is increased in the plasma of preeclamptic women. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–12, 2015.

PERUCCI, L. O. et al. PERUCCI, L. O. et al. Resolution of inflammation pathways in preeclampsia—a narrative review. *Immunologic Research*, v. 65, n. 4, p. 774–789, 2017. Resolution of inflammation pathways in preeclampsia—a narrative review. **Immunologic Research**, v. 65, n. 4, p. 774–789, 2017.

PINHEIRO, M. B. et al. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. **Cytokine**, v. 62, n. 1, p. 165–173, 2013.

RAGHAVAN, R. et al. Dietary patterns before and during pregnancy and maternal outcomes: A systematic review. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 109, p. 705S-728S, 2019.

RANA, S. et al. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. **Circulation Research**, v. 124, n. 7, p. 1094–1112, 2019.

RAPHAEL, W.; SORDILLO, L. M. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 21167–21188, 2013.

REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Immunology of Pre-Eclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 534–543, 2010.

ROCCCELLA, E. J. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. **American Journal of**

**Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 1, p. 1–22, 2000.

Rostan, Octavie, Muhammad Imran Arshad, Claire Piquet-Pellorce, Florence Robert-Gangneux, Jean Pierre Gangneux, Michel Samson. “Crucial and diverse role of the interleukin-33/ST2 axis in infectious diseases”. *Infection and Immunity* 83, no 5, 2015.

SAITO, S.; SAKAI, M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 2, p. 161–173, 2003.

SALKER, M. S. et al. Disordered IL-33/ST2 Activation in Decidualizing Stromal Cells Prolongs Uterine Receptivity in Women with Recurrent Pregnancy Loss. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

SANTNER-NANAN, B. et al. Systemic Increase in the Ratio between Foxp3 + and IL-17-Producing CD4 + T Cells in Healthy Pregnancy but Not in Preeclampsia . **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 11, p. 7023–7030, 2009.

SCHANZ, A. et al. Pre-eclampsia is associated with elevated CXCL12 levels in placental syncytiotrophoblasts and maternal blood. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, n. 1, p. 32–37, 2011.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, n. 5, p. 479–490, 2005.

SEO, D. H. et al. Interleukin-33 regulates intestinal inflammation by modulating macrophages in inflammatory bowel disease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.

SHI, J. W. et al. The role of CXC chemokine ligand 16 in physiological and pathological pregnancies. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 4, p. 0–2, 2020.

SHIMAOKA, T. et al. Cell surface-anchored SR-PSOX / CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells Abstract : Direct contacts between dendritic cells ( DCs ) and T cells or natural killer T ( NKT ) cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 75, n. February, p. 267–274, 2004.

SHIMAOKA, T. et al. Critical Role for CXC Chemokine Ligand 16 (SR-PSOX) in Th1 Response Mediated by NKT Cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8172–8179, 2007.

SOTO, E. et al. Late-onset preeclampsia is associated with an imbalance of angiogenic and anti-angiogenic factors in patients with and without placental lesions consistent with maternal underperfusion. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 5, p. 498–507, 2012.



- SOUZA, A. I.; FILHO, M. B.; FERREIRA, L. O. C. Alterações hematológicas e gravidez. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 1, p. 29–36, 2002.
- STAMPALIJA, T. et al. Maternal plasma concentrations of sST2 and angiogenic/anti-angiogenic factors in preeclampsia. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 14, p. 1359–1370, 2013.
- STEEGERS, E. A. P. et al. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 631–644, 2010.
- TARAVATI, A.; TOHIDI, F. Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 57, n. 6, p. 779–790, 2018.
- THALOR, N. et al. A correlation between platelet indices and preeclampsia. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 41, n. 2, p. 129–133, 2019.
- TOK, A. et al. The serum level of soluble CXCL16 is increased in preeclampsia and associated with hepatic/renal damage. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2019.
- TOWNSLEY, D. M. Hematologic complications of pregnancy. **Seminars in Hematology**, v. 50, n. 3, p. 222–231, 2013.
- TROGSTAD, L.; MAGNUS, P.; STOLTENBERG, C. Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 329–342, 2011.
- UMESAWA, M.; KOBASHI, G. Epidemiology of hypertensive disorders in pregnancy: Prevalence, risk factors, predictors and prognosis. **Hypertension Research**, v. 40, n. 3, p. 213–220, 2017.
- VEST, A. R.; CHO, L. S. Hypertension in Pregnancy. **Cardiology Clinics**, v. 30, n. 3, p. 407–423, 2012.
- VISHNYAKOVA, P. et al. Role of the monocyte–macrophage system in normal pregnancy and preeclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, 2019.
- VOLOSHYNA, I. et al. Plasma IL-33 in atopic patients correlates with pro-inflammatory cytokines and changes cholesterol transport protein expression: A surprising neutral overall impact on atherogenicity. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 45, n. 10, p. 1554–1565, 2015.
- WANG, X. Q. et al. Trophoblast-derived CXCL16 induces M2 macrophage polarization that in turn inactivates NK cells at the maternal–fetal interface. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 12, p. 1038–1046, 2018.

WARREN, C. E. et al. A primary health care model for managing pre-eclampsia and eclampsia in low- And middle- income countries. **Reproductive Health**, v. 17, n. 1, p. 1–7, 2020.

WEI, J. et al. Cigarette smoking during pregnancy and preeclampsia risk: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Oncotarget**, v. 6, n. 41, p. 43667–43678, 2015a.

WEI, J. et al. Red blood cells store and release interleukin-33. **Journal of Investigative Medicine**, v. 63, n. 6, p. 806–810, 2015b.

WILES, K. et al. Serum Creatinine in Pregnancy: A Systematic Review. **Kidney International Reports**, v. 4, n. 3, p. 408–419, 2019.

WU, J. et al. IL-33 Is Required for Disposal of Unnecessary Cells during Ovarian Atresia through Regulation of Autophagy and Macrophage Migration. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 5, p. 2140–2147, 2015.

XU, W. D. et al. IL-33 in rheumatoid arthritis: Potential role in pathogenesis and therapy. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1057–1060, 2013.

YANG, H. et al. Platelets, inflammation, and prediction of the hypertension disorders of pregnancy. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 99–103, 2012.

YANG, Y. et al. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. **Nature Immunology**, v. 5, n. 5, p. 508–515, 2004.

YAO, Y.; XU, X. H.; JIN, L. Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAR, p. 1–13, 2019.

YU, J. et al. Decreased frequency of peripheral blood CD8+CD25+FoxP3+regulatory T cells correlates with IL-33 levels in pre-eclampsia. **Hypertension in Pregnancy**, v. 36, n. 2, p. 217–225, 2017.

ZHOU, W. H. et al. Co-expression of CXCR4 and CXCR7 in human endometrial stromal cells is modulated by steroid hormones. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 3, p. 2449–2460, 2015.

**ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade  
de Minas Gerais**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

**Parecer nº. ETIC 0618.0.203.000-10**

**Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de abril de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Pré-eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

## ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte



**Registro CEP: 035/2009** (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Belo Horizonte, 27 de abril de 2009.

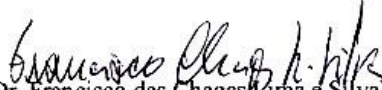
Interessada: Valeria Cristina Sandrim

### Parecer:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 24 de abril de 2009 analisou e **APROVOU** o protocolo de pesquisa “**Estudo haplotípico de novos variantes da eNOS em gestantes brancas e negras com pré-eclâmpsia: impacto sobre resposta terapêutica anti-hipertensiva.**”, registrado neste CEP sob número 035/2009, no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

### OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é de 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).

  
Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva  
Coordenador do CEP

## ANEXO 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)



0101171517110 217102201716	
RUBRICA:	DATA:
<i>Preculim</i>	21/06/2010
ÓRGÃO / ENTIDADE:	
FHEMIG - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais	

### FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS

#### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

#### Solicitação de Emenda

O CEP-FHEMIG recebeu, em 23 de Junho de 2010, solicitações de emenda ao Projeto: **“Pré-eclampsia e polimorfismos nos genes do fator VII e do receptor de estrogênio”**, enviados pela Pesquisadora Karina Braga Gomes Borges.

#### EMENDAS SOLICITADAS:

- Metodologia: inclusão de exames para a identificação de novos marcadores biológicos, importantes no diagnóstico e prognóstico da pré-eclampsia.
- Impacto ao sujeito da pesquisa: obtenção de coleta de 10 mL de sangue além do já utilizado.
- Alterações nos TCLE: (1) Para os grupos de gestantes com pré-eclâmpsia, (2) Para os grupos de gestantes controles, (3) Para o grupo de mulheres não gestantes.

#### CONSIDERAÇÕES:

- O projeto já foi apresentado e aprovado neste CEP em 2008.
- As alterações metodológicas são pertinentes e ampliam a qualidade do trabalho.
- O impacto aos participantes da pesquisa é mínimo e está devidamente previsto no TCLE.
- Os pesquisadores garantem o cumprimento da Resolução 196/96 do CNS/MS.

#### PARECER:

##### - A FAVOR DA EMENDA SOLICITADA.

- Os pesquisadores deverão citar quando solicitados o parecer de aprovação do CEP-FHEMIG 077/2008.

Belo Horizonte, 24 de Junho de 2010

*Vanderson Assis Romualdo*  
Vanderson Assis Romualdo  
Coordenador

**Vanderson Assis Romualdo**  
**COORDENADOR DO CEP-FHEMIG**

Alameda Vereador Álvaro Celso, 100 - Santa Efigênia - Belo Horizonte/MG  
CEP: 30150-260 - Fone: 0(xx)31 3239-9500 - Fax: 0(xx)31 3239-9579  
Site: <http://www.fhemig.mg.gov.br/> E-mail: [fhemig@fhemig.mg.gov.br](mailto:fhemig@fhemig.mg.gov.br)

**ANEXO 4 - Parecer do Comitê Ético em Pesquisa do Hospital Municipal  
Odilon Behrens**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Avaliação de Projeto de Pesquisa**

FR: 418196

**Número do Parecer:** 0681.0.000.216-11

**Título do Projeto:** "Pré-Eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório"

**Pesquisador Responsável:** Melina de Barros Pinheiro

**PARECER DO CEP/ HOB:** o projeto em apreço foi avaliado pelo CEP-HOB e aprovado.

Data da reunião: 12 de maio de 2011

Atenciosamente,

  
**Ricardo Melo Marinho**  
Coordenador do CEP/HOB

**ANEXO 5 – Declaração da Gerência da Unidade Básica de Saúde da Família  
(UBSF) – Guanabara / Betim**



**Prefeitura Municipal de Betim  
Secretaria Municipal de Saúde  
Hospital Público Regional de Betim - HPRB  
Maternidade do HPRB**



**Declaração**

Declaro, para os devidos fins, que estou de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "PRÉ-ECLÂMPSIA: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO" da Faculdade de Farmácia da UFMG, no posto de saúde UBSF Guanabara Betim.

Betim, 31 de agosto de 2010.

  
Wilson Ribeiro de Mello  
Enfermeiro  
Gerente UBSF Guanabara

## ANEXO 6 – Declaração da Diretoria do Hospital Regional de Betim (HPR)




Prefeitura Municipal de Betim  
Secretaria Municipal de Saúde  
Hospital Público Regional de Betim - HPRB  
Maternidade do HPRB





### Declaração

Declaramos, para os devidos fins, que estamos de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "PRÉ-ECLÂMPsia: INTER-RELAÇÃO DOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATÓRIO" da Faculdade de Farmácia da UFMG, na Maternidade do Hospital Público Regional de Betim, desde que seja aprovado por um comitê de ética em pesquisa.

Betim, 09 de novembro de 2010.

  
Denise da Silva Kattah  
Gerente Maternidade

  
Clésio Gontijo do Amaral  
Coordenador SEPPEM  
Serviço de Educação Permanente e  
Pesquisa Multiprofissional

  
Geraldo Marcio Viana Zanon  
Diretor HPRB