

Lícia Vasconcelos Carvalho da Silva

**Influência de polimorfismos funcionais nos genes lectina ligante de
manose 2 (*MBL2*) esintase de oxido nitrico 3 (*NOS3*) sobre oparto
prematuro espontâneo**

Recife

2015

Lícia Vasconcelos Carvalho da Silva

Influência de polimorfismos funcionais nos genes lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) esintase de oxido nitrico 3 (*NOS3*) sobre oparto prematuro espontâneo

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Abordagens Quantitativas em Saúde

Linha de pesquisa: Crescimento e Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Sophie Helena Eickmann
Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Recife

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

S586i Silva, Lícia Vasconcelos Carvalho da.
Influência de polimorfismos funcionais nos genes lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) e sintase de óxido nítrico 3 (*NOS3*) sobre o parto prematuro espontâneo / Lícia Vasconcelos Carvalho da Silva. – Recife: O Autor, 2015.
93 f.: il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientadora: Sophie Helena Eickmann.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa De Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Trabalho de parto prematuro. 2. Nascimento prematuro. 3. Genética. 4. Fatores de risco. I. Eickmann, Sophie Helena (Orientadora). II. Título.

618.92 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-202)

LICIA VASCONCELOS CARVALHO DA SILVA

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS FUNCIONAIS NOS GENES LECTINA
LIGANTE DE MANOSE 2 (*MBL2*) E SINTASE DE OXIDO NITRICO 3 (*NOS3*)
SOBRE O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

TESE APROVADA EM: 31/08/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sophie Helena Eickmann (orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Andrade Martins Esteves (examinador externo)
Faculdade ASCES

Prof^a. Dr^a. Taciana Duque de Almeida Braga (examinador externo)
Faculdade Pernambucana de Saúde

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães (examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Souza Ramos

DIRETOR CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

COORDENADORA DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS

Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE COLEGIADO CORPO DOCENTE PERMANENTE

Profa. Dra. Luciane Soares de Lima (Coordenadora)

Profa. Dra. Cláudia Marina Tavares de Araújo (Vice-Cordenadora)

Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz

Profa. Dra. Ana Bernarda Ludermir

Profa. Dra. Andréa Lemos Bezerra de Oliveira

Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto

Prof. Dr. Emanuel Savio Cavalcanti Sarinho

Profa. Dra. Estela Maria Leite Meirelles Monteiro

Profa. Dra. Gisélia Alves Pontes da Silva

Profa. Dra. Maria Gorete Lucena de Vasconcelos

Profa. Dra. Marília de Carvalho Lima

Prof. Dr. Paulo Sávio Angeiras de Góes

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

Profa. Dra. Sílvia Wanick Sarinho

Profa. Dra. Sophie Helena Eickmann

(Luis Henrique Sarmento Tenório - Representante discente - Doutorado)

(Juliene Gomes Brasileiro - Representante discente - Mestrado)

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Profa. Dra. Bianca Arruda Manchester de Queiroga

Profa. Dra. Cleide Maria Pontes

Profa. Dra. Daniela Tavares Gontijo

Profa. Dra. Kátia Galeão Brandt Profa.

Dra. Margarida Maria de Castro Antunes

Profa. Dra. Rosalie Barreto Belian

SECRETARIA

Paulo Sergio Oliveira do Nascimento (Secretário)

Juliene Gomes Brasileiro

Ao meu filho Mateus, pela alegria e amor que me
motivam a continuar

Ao meu esposo Etenildo, pelo companheirismo,
respeito, grande amor e dedicação

Aos meus pais, pelo amor sem medida, pelo esforço
e pelos ensinamentos sobre a vida

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua graça que me alcança e por Sua misericórdia, que se renova a cada manhã.

Aos meus pais, meu esposo e meu filho, pelo amor, pelos ensinamentos, pela motivação e pela compreensão da minha ausência.

Aos meus orientadores, Profa. Dr^a. Sophie Helena Eickmann e Prof. Dr^o. Sergio Crovella, pela confiança, bom humor e pelo aprendizado propiciado.

A Prof^a. Marília Lima, pelo carinho e pelo zelo.

A equipe de estudantes de iniciação científica, pela responsabilidade e dedicação.

A equipe do setor de Biologia Molecular do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami – LIKA, em especial, a Nathalia Alencar e a Natassia Javorski, pelo empenho, pela colaboração e por todos os ensinamentos.

Aos meus parceiros de trabalho da Faculdade Asces, pela alegria.

Aos profissionais das maternidades do Hospital das Clínicas da UFPE e do Hospital Agamenon Magalhães, pela colaboração.

Às mães e aos bebês dessa pesquisa, pela confiança.

RESUMO

Uma suscetibilidade genética materna e fetal para o parto prematuro espontâneo tem sido foco de investigações científicas que buscam melhorar a compreensão da fisiopatologia da prematuridade. O gene da lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) participa da regulação da resposta inflamatória materna e fetal, enquanto o gene da sintase de óxido nítrico 3 (*NOS3*) relaciona-se ao controle da contratilidade uterina durante a gestação, sendo possível que ambos estejam associados ao parto pré-termo. Diante disso, esta pesquisa objetivou avaliar a influência de polimorfismos funcionais nesses genes sobre o parto prematuro espontâneo, controlando por fatores de risco socioeconômicos, demográficos e gestacionais. Realizou-se um estudo clínico com um grupo de comparação composto por 189 díades puérpera-neonato, sendo 104 de parto pré-termo espontâneo e 85 de parto a termo, no período de junho de 2013 a agosto de 2014, nas maternidades do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e do Hospital Agamenon Magalhães. Os fatores de exclusão foram gestação múltipla, má-formação fetal e infecção congênita. Amostras de sangue periférico e do cordão umbilical foram coletadas para isolamento do DNA. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) convencional, seguida de sequenciamento dos produtos da PCR, e PCR em Tempo Real foram realizadas para genotipagem do *MBL2* e *NOS3*, respectivamente. A análise manual das sequências alélicas do *MBL2* utilizou o programa *CodonCode Aligner 5.0*, enquanto os haplótipos foram verificados por meio do programa *Haploview*. Já a discriminação alélica do gene *NOS3* utilizou o *software* SDS 2.3. Os dados foram analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) por meio de testes de associação bivariados e de regressão logística multivariada. Nas análises bivariadas, encontramos uma associação das variações nos códons 54 e 57 do gene *MBL2* materno e das variações no rs7096206 (X/Y) e no códon 52 do neonato com o parto pré-termo espontâneo. O haplótipo LYA predominou na amostra total, sendo mais observado no grupo de parto prematuro, enquanto o haplótipo LYB foi mais frequente no grupo de parto a termo. Além disso, as puérperas de parto prematuro apresentaram maior frequência de haplótipos que levam a uma produção alta da proteína MBL, enquanto nas de parto a termo prevaleceram aqueles que ocasionam uma baixa produção proteica. O polimorfismo genético do gene *NOS3* materno demonstrou associação limítrofe com a ocorrência da prematuridade. Na análise multivariada, a variação no códon 54 do gene *MBL2* materno, a história prévia de partos prematuros, a ocorrência de rotura prematura de membranas, a presença de infecção do trato urinário no momento do parto e o baixo peso da gestante demonstraram associação com o desfecho. O resultado concorda com a etiologia multifatorial do parto prematuro e sugere que níveis elevados de proteína MBL podem representar risco para essa intercorrência. Esses dados devem ser interpretados com cautela em virtude do pequeno tamanho amostral, porém fornecem informações exploratórias relevantes sobre a influência dos genes *MBL2* e *NOS3* na prematuridade. Além disso, reforçam a importância do acompanhamento pré-natal adequado para identificação de outros fatores de riscos maternos associados ao parto pré-termo espontâneo.

Palavras-chave: Trabalho de Parto Prematuro. Nascimento Prematuro. Genética. Fatores de Risco.

ABSTRACT

A maternal and fetal genetic susceptibility to spontaneous preterm birth has been the focus of scientific research to improve the understanding of the pathophysiology of prematurity. The *MBL2* gene participates in the regulation of maternal and fetal inflammatory response, while the *NOS3* gene is related to control of uterine contractility during pregnancy, it is possible that both are associated with preterm birth. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of functional polymorphisms in these genes on spontaneous preterm birth, controlling for socioeconomic, demographic and gestational risks. We conducted a clinical study with a comparison group of 189 puerperal -newborn dyads, with 104 of spontaneous preterm delivery and 85 of delivery at term, from June 2013 to August 2014, at the Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco and the Hospital Agamenon Magalhães in Recife. The exclusion criteria were multiple pregnancy, fetal malformation and congenital infection. Peripheral blood and of umbilical cord was collected for DNA isolation. Polymerase Chain Reaction (PCR) Conventional followed by sequencing of the PCR products, and Real Time PCR was performed for genotyping *MBL2* and *NOS3*, respectively. The manual analysis of allelic sequences *MBL2* used the CodonCode Aligner 5.0 program, while haplotypes were observed through Haploview program. The allelic discrimination of *NOS3* gene used the SDS 2.3 software. Data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) through bivariate association tests and logistic regression. In the bivariate analysis, we found an association of changes in codons 54 and 57 of breast *MBL2* gene and the variants rs7096206 (X / Y) and codon 52 of neonates with spontaneous preterm delivery. The haplotype LYA predominated in the total sample, more observed in the preterm group, while LYB haplotype was more frequent in the preterm delivery group. Additionally, the preterm mothers had a greater frequency of haplotypes that lead to high production of the MBL protein while in the term delivery prevailed ones that cause a low protein production. The genetic polymorphism of the gene *NOS3* mother showed borderline association with the occurrence of prematurity. In multivariate analysis, the variation in codon 54 breast *MBL2* gene, a history of preterm delivery, the occurrence of premature rupture of membranes, the presence of urinary tract infection at birth and low weight of pregnant women showed association with outcome. The result agrees with the multifactorial etiology of preterm birth and suggests that high levels of MBL protein may represent risk for this complication. These data should be interpreted with caution because of the small sample size, but provide relevant exploratory information about the influence of *MBL2* and *NOS3* genes in prematurity. In addition, they support the importance of prenatal care suitable for identifying other maternal risk factors associated with spontaneous preterm delivery.

Keywords: Obstetric Labor, Premature. Premature Birth. Genetics. Risk Factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação das membranas amnióticas envolvendo o feto durante a gestação.	21
Figura 2: A) Representação da estrutura do cromossomo e da cadeia de nucleotídeos. B) Esquematização de um polimorfismo genético envolvendo pares de bases nitrogenadas (SNP).	26
Figura 3: Estrutura do gene <i>MBL2</i> e localização das regiões polimórficas.	29
Figura 4: Distribuição da amostra considerada na análise dos polimorfismos funcionais nos genes <i>MBL2</i> materno e fetal e <i>NOS3</i> materno.	37
Quadro 1: Apresentação das variáveis do estudo.	38
Figura 5. Fluxograma das ações desenvolvidas durante a coleta dos dados maternos e neonatais nas maternidades.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil socioeconômico e demográfico das puérperas do hospital Agamenon Magalhães e do Hospital das Clínicas da UFPE de acordo com o tipo de parto.	52
Tabela 2: Perfil gestacional das puérperas do hospital Agamenon Magalhães e do Hospital das Clínicas da UFPE de acordo com o tipo de parto	53
Tabela 3: Frequência dos polimorfismos funcionais do gene <i>MBL2</i> materno e do neonato e do gene <i>NOS3</i> materno segundo os tipos de parto.	55
Tabela 4: Combinação dos genótipos do <i>MBL2</i> da díade mãe-filho de acordo com o tipo de parto	57
Tabela 5: Frequência dos haplótipos do gene <i>MBL2</i> nas puérperas e nos neonatos de acordo com o tipo de parto.	58
Tabela 6: Produção da proteína MBL a partir do genótipo combinado das puérperas e dos neonatos.	58
Tabela 7: Regressão logística dos fatores associados ao parto prematuro espontâneo.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MBL2 - Lectina ligante de manose²

NOS3 - Sintase de óxido nítrico ³

SNP – Polimorfismo de base única

RPM – Rotura prematura de membranas

RPPM – Rotura prematura pré-termo de membranas

ITU – Infecção do trato urinário

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

NO – Óxido nítrico

TPP – Trabalho de parto prematuro

PPT – Parto prematuro

PT – Parto a termo

IMC –Índice de massa corpórea

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	15
1.1	INTRODUÇÃO	15
1.2	PERGUNTA CONDUTORA	17
1.3	HIPÓTESE	17
1.4	OBJETIVOS	17
1.4.1	Geral	17
1.4.2	Específicos	17
1.5	ESTRUTURA DA TESE	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO	21
2.2	ETIOLOGIA DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO	21
2.3	GENÉTICA DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO	25
2.3.1	Contribuições do genótipo materno	27
2.3.1.1	O gene lectina ligante de manose 2 (<i>MBL2</i>)	28
2.3.1.2	O gene sintase de oxido nitrico 3 (<i>NOS3</i>)	31
2.3.2	Contribuições do genótipo fetal	34
3	MÉTODOS	36
3.1	TIPO DO ESTUDO	36
3.2	LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO	36
3.3	AMOSTRA	36
3.4	VARIÁVEIS DO ESTUDO	37
3.5	COLETA DOS DADOS	41
3.5.1	Condições socioeconômicas, demográficas e gestacionais	41

3.5.2	Dados biológicos	42
3.5.2.1	Coleta de sangue	42
3.5.2.2	Extração do DNA	43
3.5.2.3	Genotipagem do gene <i>MBL2</i>	44
3.5.2.3.1	<i>Amplificação do DNA</i>	44
3.5.2.3.2	<i>Purificação dos produtos da PCR</i>	45
3.5.2.3.3	<i>Sequenciamento dos produtos da PCR</i>	45
3.5.2.4	Genotipagem do gene <i>NOS3</i>	46
3.6	PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
3.7	ASPECTOS ÉTICOS	49
3.8	LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS E OPERACIONAIS	49
4	RESULTADOS	51
5	DISCUSSÃO	60
5.1	GENE <i>MBL2</i> E SUA RELAÇÃO COM O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO	61
5.2	GENE <i>NOS3</i> E SUA RELAÇÃO COM O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO	64
5.3	ASSOCIAÇÃO DOS FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS COM O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO	66
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE – Formulários de coleta de dados socioeconômicos, demográficos e gestacionais.	84
	ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	91

1 APRESENTAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

A elevada ocorrência de partos prematuros continua representando um importante problema de saúde pública no mundo, apesar dos avanços assistenciais à saúde e de uma melhor compreensão dos eventos relacionados à gestação e ao parto (GRACIE et al., 2011; BEZOLD et al., 2013; BLENCOWE et al., 2013).

Os avanços nos cuidados neonatais, como a melhor assistência ventilatória e a administração de surfactante ao recém-nascido, além do uso de corticoesteróides na gestação, permitiram reduzir a taxa de mortalidade associada ao parto prematuro espontâneo nos últimos anos (SANTOS et al., 2008), porém, as complicações da prematuridade ainda representam a maior causa mundial de morte neonatal, respondendo diretamente por 35% dos óbitos por ano, e a segunda maior causa de morte abaixo dos cinco anos, após a pneumonia (BLENCOWE et al., 2013).

Além disso, o nascimento prematuro pode levar a alterações no desenvolvimento neurológico, incluindo paralisia cerebral, transtornos comportamentais, disfunções cognitivas, entre outras, com impacto emocional, social e econômico para a família e para a sociedade (BECK et al., 2010; BEZOLD et al., 2013; BLENCOWE et al., 2013).

A etiologia do parto prematuro parece estar ligada à interação de múltiplos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (GIBSON et al., 2007; HOLST; GARNIER, 2008; BLENCOWE et al., 2013), sendo cerca de 50% dos casos considerados idiopáticos. Os eventos fisiopatogênicos que conduzem ao parto prematuro idiopático permanecem pouco esclarecidos (PENNELL et al., 2007; BECK et al., 2010).

Nesse sentido, os avanços tecnológicos na área da medicina genômica destacam-se pela possibilidade de fornecer novos subsídios para o conhecimento dos mecanismos patogênicos associados a diversos agravos, inclusive ao parto prematuro espontâneo (BEZOLD et al., 2013), e a identificação de polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) em genes envolvidos nos processos relacionados à duração da gestação tem sido uma crescente linha de investigação que visa identificar uma possível susceptibilidade genética materna e fetal para o parto prematuro espontâneo.

Até o momento, entretanto, grande parte das pesquisas que sugerem uma influência genética sobre a prematuridade apresenta resultados limitados visto que investiga apenas o genótipo das crianças ou das mães e não explora os possíveis efeitos da interação entre esses genótipos, tampouco a interação com os fatores ambientais sobre a duração da gestação humana (GIBSON et al., 2007; UZUN et al., 2013).

O tema abordado nessa tese é desafiador e, ao mesmo tempo, motivador. Na rotina de fisioterapeuta e docente de um curso de graduação em Fisioterapia, os questionamentos sobre a causada prematuridade nos pacientes, especialmente, quando os fatores de risco “clássicos” não estiveram presentes durante a gestação, são constantes e nos deixam, por vezes, sem palavras diante das famílias que aguardam esclarecimentos.

Essa motivação a compreender melhor a etiologia do parto pré-termo espontâneo foi valorizada quando, em 2011, uma parceria estabelecida entre os grupos de pesquisa **Saúde e Nutrição Materno Infantil** (Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da UFPE - POSCA) e **Variabilidade Genética Humana** (Departamento de Genética e LaboratórioImunopatologia Keizo Asami - LIKA), por meio dos professores doutores Sophie Helena Eickmann e Sergio Crovella, viabilizou o desenvolvimento desta pesquisa. Somando, dessa forma, as expertises desses grupos em torno de um projeto com potencial gerador de subsídios técnicos necessários à elaboração de marcadores genéticos de susceptibilidade para a prematuridade.

O tema “Prematuridade” está contemplado na linha de pesquisa em Crescimento e Desenvolvimento do Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, e os polimorfismos genéticos aqui examinados são de interesse dos grupos e já são investigados pelo grupo de Variabilidade Genética Humana em outros projetos de pesquisa.

Neste estudo, foram eleitos para investigação genética alguns polimorfismos de base única do gene Lectina ligante de manose2 (*MBL2*), que participa da modulação da resposta inflamatória da mãe e do neonato (PETERSEN et al., 2000; TURNER, 2003; BOHLSON et al., 2007); bem como do gene Sintase de óxido nítrico 3 (*NOS3*), que se relaciona à regulação do fluxo sanguíneo no útero e placenta e pode estar associado ao controle da quiescência uterina durante a gestação e trabalho de parto. Assim, esta pesquisa foi desenvolvida a partir da pergunta condutora, hipótese e objetivos abaixo explicitados.

1.2 PERGUNTA CONDUTORA

Os polimorfismos funcionais dos genes Lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) materno e fetal e do gene Sintase de oxido nítrico 3 (*NOS3*) materno estão associados ao parto prematuro espontâneo?

1.3 HIPÓTESE

Há uma suscetibilidade genética materna e fetal levando a uma maior frequência de parto prematuro espontâneo na presença de polimorfismos genéticos que reduzem a produção da proteína lectina ligante de manose (MBL) materna e fetal e alteram a produção do óxido nítrico endotelial (eNOS) materno.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Geral

Esta pesquisa objetivou investigar a influência de polimorfismos funcionais do gene Lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) materno e fetal e do gene Sintase de oxido nítrico 3 (*NOS3*) materno sobre o parto prematuro espontâneo.

1.4.2 Específicos

- (a) Caracterizar a amostra de puérperas e neonatos com relação aos aspectos socioeconômicos, demográficos e gestacionais;

- (b) comparar a frequência dos polimorfismos funcionais dos genes *MBL2* materno e fetal e do gene *NOS3* materno entre os grupos de pré-termo e termo;
- (c) investigar a associação da combinação dos genótipos do *MBL2* da díade mãe-filho com o parto prematuro espontâneo;
- (d) comparar a frequência de haplótipos que influenciam na expressão fenotípica do gene *MBL2* de puérperas e neonatos entre os grupos de pré-termo e termo;
- (e) investigar a associação dos polimorfismos funcionais dos genes *MBL2* materno e fetal e do gene *NOS3* materno com o parto prematuro espontâneo controlando por outros fatores de risco socioeconômicos, demográficos e gestacionais.

1.5 ESTRUTURA DA TESE

O presente capítulo traz uma apresentação desta tese, evidenciando o problema científico investigado, a hipótese e os objetivos da pesquisa.

O segundo capítulo apresenta uma revisão da literatura realizada a partir de consultas a artigos científicos indexados nas bases de dados MEDLINE, LILACS, SciELO e WHOLIS com o objetivo de construir a fundamentação teórica e empírica dessa pesquisa. Assim, foram pesquisadas as atualidades na definição, epidemiologia e etiologia do parto prematuro espontâneo, destacando os fatores de risco associados a esse tipo de prematuridade. Pesquisou-se sobre o estado da arte da genética da prematuridade e os avanços nas pesquisas sobre esse tema. Além disso, investigou-se o papel dos genes Lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) materno e fetal e do gene Sintase de óxido nítrico 3 (*NOS3*) materno sobre a duração da gestação humana e sobre o parto prematuro espontâneo.

O terceiro capítulo dedica-se a apresentar os métodos utilizados no delineamento da pesquisa, o fluxograma seguido para a coleta dos dados maternos e neonatais, as estratégias para extração do DNA e genotipagem dos genes *MBL2* e *NOS3*, e o tratamento estatístico utilizado na análise dos dados.

Os resultados da pesquisa são apresentados no quarto capítulo e discutidos no quinto capítulo, onde se evidencia a necessidade de considerar a interação dos polimorfismos genéticos, dos fatores ambientais e da epigenética na causalidade do parto prematuro espontâneo.

Por último, no sexto capítulo, estão expressas as considerações finais da tese e algumas recomendações acerca do tema pesquisado.

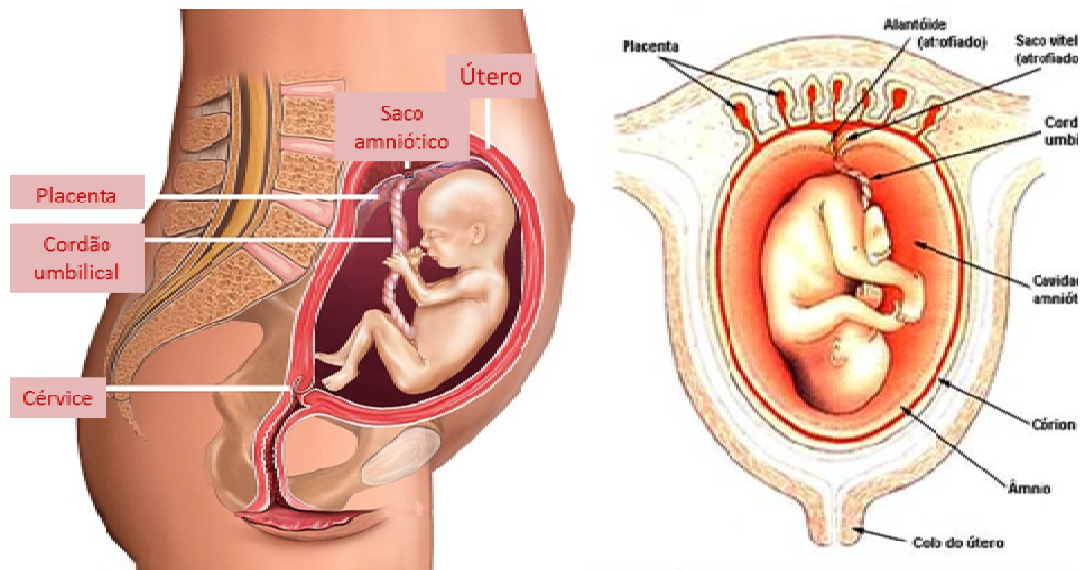
2 REVISÃO DE LITERATURA

O nascimento prematuro é aquele que ocorre antes de 37 semanas completas ou 259 dias de idade gestacional (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1977; BLENCOWE et al., 2013), podendo ser classificado de acordo com as semanas gestacionais em prematuro extremo, que ocorre antes de 28 semanas; prematuro grave, entre 28 e 31 semanas; e prematuro moderado com 32 a 36 semanas de idade gestacional (GOLDENBERG et al., 2008; IP et al., 2010; BLENCOWE et al., 2013). Nessa última categoria, enquadram-se ainda os nascimentos prematuros denominados limítrofes ou tardios, que ocorrem entre as 34^a e 36^a semanas gestacionais (BEZOLD et al., 2013; BLENCOWE et al., 2013).

A definição da idade da gestacional na prática clínica tem sido feita a partir de dados ultrassonográficos, da data da última menstruação (DUM), do exame obstétrico (como altura uterina e observação de grumos no líquido amniótico em presença de amniorrexe) ou da observação clínica do recém-nascido, não havendo ainda um método ideal de estimação da duração da gestação para uso em pesquisas. Nesse sentido, sugere-se a escolha justificada de um dos métodos ou o uso de dois métodos estimativos combinados (ASSUNÇÃO et al., 2011). Os erros na estimativa conferidos pela DUM parecem ser mais aleatórios do que os obtidos por meio do exame clínico que, por sua vez, é apontado como mais coerente do ponto de vista biológico. Por outro lado, a ultrassonografia realizada antes da 20^a semana de gestação, apesar da precariedade do acesso universal, tem sido considerada o padrão ouro no cálculo da idade gestacional (ASSUNÇÃO et al., 2011; PEREIRA et al., 2014).

O parto prematuro pode ocorrer a partir do início espontâneo do trabalho de parto, com preservação da integridade das membranas amnióticas (figura 1) ou com rotura prematura pré-termo das membranas (RPPM), sendo considerado espontâneo, ou ser induzido pela equipe de saúde diante da presença de intercorrências gestacionais que coloquem em risco a vida da mãe ou do feto (PENNEL et al., 2007; GOLDENBERG et al., 2008). Há indícios de que as duas situações que caracterizam o parto prematuro espontâneo podem estar associadas a fatores de risco distintos por meio de mecanismos fisiopatológicos diferentes (IP et al., 2010; BEZOLD et al., 2013).

Figura 1: Representação das membranas amnióticas envolvendo o feto durante a gestação.



Fonte: Google, 2015.

Nesse capítulo, faremos uma apresentação dos dados epidemiológicos atuais da prematuridade e uma revisão das principais condições socioeconômicas, demográficas e gestacionais relacionadas à etiologia do parto prematuro, apresentando a variabilidade genética materna e fetal como um fator possivelmente relacionado ao desencadeamento desta intercorrência gestacional.

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO

Em 2010, nasceram 15 milhões de crianças prematuras no mundo (BLENOWE et al., 2013). No Brasil, em 2011, a prevalência foi de 11,7% de todos os nascimentos, situação que colocou o país na décima posição entre os países com maior número de partos prematuros (VICTORA et al., 2013), mantendo-se praticamente constante em 2012 e em 2013 (11,9% e 11,5%). No Estado de Pernambuco, segundo dados do SINASC, a prevalência de nascidos vivos prematuros atingiu a média de 11,8% no período de 2011 a 2013, semelhantemente aos dados nacionais (SAÚDE, 2015).

A prevalência de partos prematuros elevou-se discretamente entre os anos 2000 e 2011, segundo o relatório de Victora e colaboradores (2013) apresentado à UNICEF Brasil,

semelhantemente ao que tem ocorrido em outros países. Apenas os Estados Unidos da América relatam uma pequena redução nas taxas de prematuridadetardia a partir de 2007, após mudanças nas práticas obstétricas relativas à indicação da interrupção da gestação e à realização de cirurgia cesariana, passando de 12,8% em 2006 para 11,7% em 2011 (BEZOLD et al., 2013; BLENCOWE et al., 2013). No Brasil, esse aumento contraria as melhorias apontadas pelos indicadores de qualidade materno-infantis para esse período (VICTORA et al., 2013).

Quanto aos partos prematuros espontâneos, a prevalência não é clara em muitos países (BLENCOWE et al., 2013). Um estudo recente de Passini e colaboradores (2014) em maternidades de referência de várias regiões do Brasil apontou uma prevalência de 8% entre os anos de 2011 e 2012, representando 65% de todos os partos pré-termo do período, desses 36% com membranas intactas e 29% associados à rotura prematura pré-termo de membranas.

2.2 ETIOLOGIA DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO

O nascimento prematuro espontâneo é um processo multifatorial que resulta da interação de diversos fatores que ocasionam uma mudança no estado de quiescência para o início das contrações uterinas e culmina com o parto antes de 37 semanas gestacionais (BLENCOWE et al., 2013). De acordo com a literatura, o trabalho de parto pode estar associado a um mecanismo autoimune e uma reação inflamatória fisiológica que ocasionam a expulsão do conceito quando o mesmo já está amadurecido, entretanto, os mecanismos envolvidos no “disparo” para o início do trabalho de parto pré-termo são pouco conhecidos (TÖRNBLÖM et al., 2005).

Nesse sentido, alguns mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos para justificar a cascata de eventos relacionados à liberação de substâncias químicas que ocasionam a dilatação abrupta do colo do útero, o início das contrações uterinas e a rotura prematura das membranas, culminando com parto prematuro espontâneo. Esses mecanismos podem estar relacionados à ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal materno ou fetal, que elevaria os níveis de cortisol, reduzindo a secreção de progesterona e aumentando a produção de estrógenos; à presença de infecção ou inflamação local ou sistêmica, associada a uma resposta imunológica materno-fetal inadequada; à inflamação da decídua uterina e à distensão patológica do útero (GOLDENBERG et al., 2008; MYKING et al., 2011; BEZOLD et al.,

2013). Ainda assim, a patogênese do nascimento prematuro espontâneo permanece pouco esclarecida, embora se reconheça que possa decorrer da ativação idiopática precoce de um processo normal do parto ou resultar de agressões patológicas.

Sabe-se que alguns fatores relacionados às características maternas, história gestacional e hábitos de vida da gestante, bem como variáveis associadas ao ambiente e às condições sociodemográficas da família podem estar implicados (GOLDENBERG et al., 2008; ALLEN, 2008; SHRESTHA et al., 2010; IP et al., 2010), mas a causa do nascimento prematuro espontâneo é desconhecida na metade dos casos (BECK et al., 2010; BLENCOWE et al., 2013).

Os fatores maternos descritos na literatura como importantes no desencadeamento do parto prematuro incluem idade abaixo de 18 e acima de 35 anos. Para as adolescentes, esse risco tem sido explicado por características socioeconômicas desfavoráveis que aumentam o uso de abortivo no início da gestação, o início tardio e o baixo número de consultas pré-natais. Por outro lado, entre as mulheres com idade acima de 35 anos, os riscos associam-se a existência de fatores biológicos que conferem risco obstétrico, como a presença de diabetes, hipertensão arterial e miomas, associados ao parto pré-termo indicado (SANTOS et al., 2009). Os dados sobre a influência da idade materna na ocorrência da prematuridade costumam ser conflitantes em virtude da existência de variáveis de confusão, como a paridade e as doenças preexistentes, dificilmente controladas nos estudos (SANTOS et al., 2009; IP et al., 2010; BLENCOWE et al., 2013).

A falta de acompanhamento pré-natal, o início do pré-natal após o primeiro trimestre gestacional, o baixo número de consultas (menor que 06) e a má qualidade da assistência também parecem associados ao parto prematuro espontâneo, sendo documentados por diversos estudos que ratificam a importância da realização de um pré-natal adequado para identificação de fatores de risco remediáveis para a prematuridade, bem como para a adoção precoce de medidas voltadas a inibir o trabalho de parto antes do termo (BEZERRA et al., 2006; IP et al., 2010; PASSINI et al., 2014).

A baixa renda e baixa escolaridade materna também podem estar associadas à prematuridade por comprometer o acesso da gestante às condições gestacionais adequadas de alimentação, moradia, cuidados à saúde, entre outras (WILCOX et al., 2008; ALLEN, 2008; HOLST; GARNIER, 2008; SHRESTHA et al., 2010; IP et al., 2010; SOUZA, N. C. M. LIMA, A. C. V. M. S. GALIARDO, DE, 2011; GRACIE et al., 2011; PASSINI et al., 2014). O dano associado a esses fatores, entretanto, parece ser minimizado a partir da realização sistemática das consultas de pré-natal (BEZERRA et al., 2006).

Com relação à primiparidade e ao intervalo interpartal menor que um ano, algumas pesquisas demonstram resultados contraditórios sobre a associação com o parto prematuro (BEZERRA et al., 2006; IP et al., 2010; BLENCOWE et al., 2013), apesar de ambos serem comumente investigados nos trabalhos voltados à identificação de fatores de risco para a prematuridade.

Além desses, evidências sugerem que a ansiedade produzida pelo estresse psicossocial também pode representar um risco para o início do trabalho de parto prematuro por aumentar a secreção do hormônio corticotrófico (CRH), que interage com as prostaglandinas e ocitocinas, provocando o início das contrações uterinas (ARAÚJO et al., 2007). Assim, alto nível de estresse durante a gestação tem sido investigado em inúmeras pesquisas como fator de risco, entretanto os resultados são contraditórios, especialmente em decorrência do reduzido número de gestantes que apontam a existência do estresse psicossocial na gestação (GOLDENBERG et al., 2008; WILCOX et al., 2008; ALLEN, 2008; HOLST; GARNIER, 2008; IP et al., 2010; GRACIE et al., 2011; PISCOYA et al., 2012; BLENCOWE et al., 2013; PASSINI et al., 2014). Ainda nesse sentido, o estado de separação conjugal pode associar-se ao parto prematuro por contribuir para o aumento no estresse psicossocial durante a gestação (BEZERRA et al., 2006).

Segundo a literatura, as substâncias contidas no cigarro também podem aumentar o risco de rotura prematura de membranas através de um prejuízo na função imune e da indução de mecanismos inflamatórios (BETA et al., 2011). Entretanto, na população brasileira, o consumo de tabaco, bem como de álcool e de drogas ilícitas durante a gestação, têm sido pouco associado à ocorrência da prematuridade, talvez em virtude do pequeno número de mulheres que admitem o uso dessas substâncias (BEZERRA et al., 2006; PASSINI et al., 2014).

Com relação às intercorrências gestacionais, o baixo índice de massa corporal da gestante de acordo com a idade gestacional é considerado um fator de risco para a prematuridade espontânea e para o baixo peso do neonato ao nascer, sendo os mecanismos possivelmente relacionados à baixa oferta de nutrientes ao feto e a uma maior frequência e intensidade de contrações uterinas após a 32ª semana gestacional, quando comparadas às mulheres com sobrepeso ou obesas (EHRENBERG et al., 2009; IP et al., 2010; BLENCOWE et al., 2013; PASSINI et al., 2014).

Do mesmo modo, a rotura prematura de membranas é tida como um importante fator desencadeador. É definida como rotura espontânea das membranas amnióticas após a 20ª semana gestacional e antes do início do trabalho de parto. Quando ocorre antes do termo,

classifica-se como rotura prematura pré-termo das membranas (RPPM) e responde por 30% de todos os partos prematuros e 20% das mortes perinatais (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2008; ROMERO; FRIEL; et al., 2010). A causa dessa complicação ainda é desconhecida, mas estudos em placentas de mulheres que tiveram RPPM apontam a inflamação aguda, especialmente relacionada à corioamnionite aguda, e as lesões vasculares como dois grandes achados patológicos (SAVASAN et al., 2010). Além dessas, a RPPM pode associar-se a deficiências nutricionais (vitamina C e cobre) e a histórias prévias de RPM.

As infecções também podem exercer um importante papel no nascimento prematuro espontâneo, sendo a regulação da resposta inflamatória materna e fetal uma das principais linhas de investigação da fisiopatologia da prematuridade. Nesse sentido, a infecção do trato urinário (ITU), a vaginose bacteriana e a infecção intrauterina, como a corioamnionite, estão associadas ao parto pré-termo (CRIDER et al., 2005; IAMS et al., 2008; FIGUEIRÓ-FILHO; BISPO, 2009; PISCOYA et al., 2012; BLENCOWE et al., 2013). O mecanismo pelo qual a infecção na gestação pode antecipar o início do trabalho de parto tem sido bastante investigado e envolve a ativação do sistema imune materno e fetal, com elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e produção de colagenase, responsável pela dissociação do colágeno nos tecidos. Esse mecanismo pode acarretar a remodelação precoce do colo uterino e provocar a rotura pré-termo das membranas amnióticas (TÖRNBLOM et al., 2005).

Por fim, dados epidemiológicos também indicam que a ocorrência de parto prematuro prévio, a história materna de nascimento pré-termo e a história familiar de prematuridade podem ser consideradas fatores de risco importante para a prematuridade, sugerindo uma interação genética, epigenética e ambiental no desencadeamento desta intercorrência gestacional (BLENCOWE et al., 2013).

2.3 GENÉTICA DO PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO

Informações relativas à fisiologia do parto prematuro espontâneo são frequentemente obtidas a partir de estudos genéticos em animais, porém a aplicabilidade dos achados sobre a gestação humana é limitada devido às diferenças entre as espécies em aspectos como: duração da gestação, número de fetos, formato do útero, níveis de progesterona no final da gestação, diferenças genômicas, entre outros. Assim, o melhor modelo para compreensão da duração da

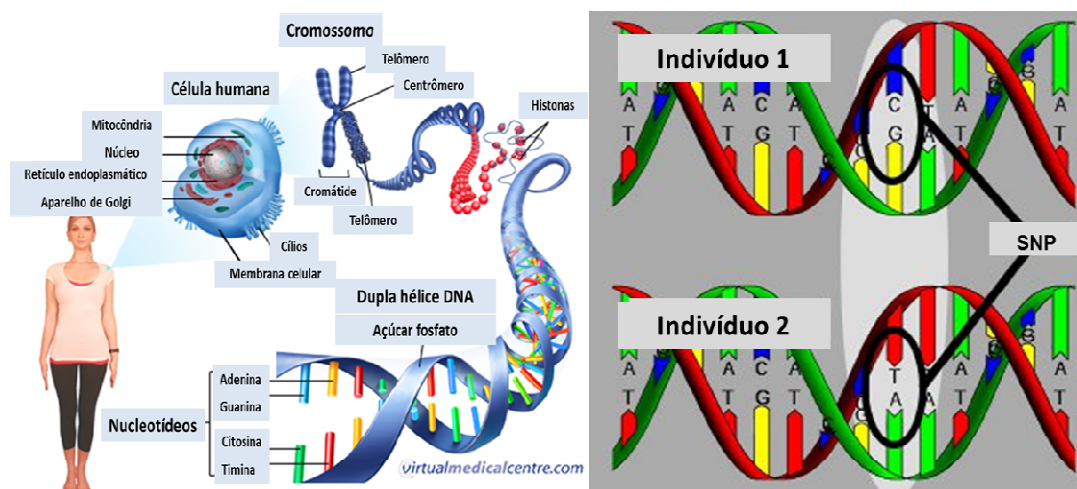
gestação humana a termo e pré-termo parece ser aquele que envolve o estudo da própria espécie, embora seja difícil controlar a variabilidade da exposição ambiental (BEZOLD et al., 2013).

Nesse sentido, a influência do genoma do neonato e dos pais sobre a etiologia e fisiopatologia do parto prematuro tem sido o foco de algumas pesquisas visando compreender a contribuição relativa da variância genética e do componente ambiental na duração da gestação humana (MIGONE et al., 1991; WILDSCHUT et al., 1991; GIBSON et al., 2007; WILCOX et al., 2008; HOLST; GARNIER, 2008; YORK et al., 2014).

Inicialmente tais investigações baseavam-se na descrição de características genéticas de famílias específicas, nos estudos com gêmeos e em achados epidemiológicos que apontavam, por exemplo, taxas mais elevadas de prematuridade na raça negra, nas mulheres que nasceram prematuras e naquelas que tiveram outros filhos pré-termo (BOYD et al., 2009; ROMERO; FRIEL; et al., 2010; MYKING et al., 2011). Nos últimos anos, entretanto, especialmente após a conclusão do Projeto Genoma Humano, tem crescido o interesse na investigação de polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) para compreensão da patogênese de doenças (ARRAES et al., 2006).

De acordo com a literatura, os SNPs são variações na sequência de DNA em algumas regiões do cromossomo que ocorrem numa frequência acima de 1% no genoma da população geral. São responsáveis pela variabilidade humana, pois produzem fenótipos diferentes de acordo com os SNPs apresentados (ROCHA et al., 2007) (figura 2).

Figura 2: A) Representação da estrutura do cromossomo e da cadeia de nucleotídeos. B) Esquematização de um polimorfismo genético envolvendo pares de bases nitrogenadas (SNP).



Fonte: Google, 2005.

Além disso, são considerados marcadores genéticos, visto que podem ser transmitidos hereditariamente juntos com outros SNPs em genes situados em regiões cromossômicas próximas a eles (ROCHA et al., 2007). Assim, podem representar uma importante ferramenta de identificação de genes envolvidos em doenças com etiologia mendeliana, poligênica ou de base multifatorial (MULLIGHAN et al., 2000; ARRAES et al., 2006).

Em adição, podem estar associados à suscetibilidade para algumas doenças visto que alguns SNPs podem alterar a razão de transcrição e/ou estabilidade do RNA mensageiro, a substituição de aminoácidos e modificar a estrutura, função e a interação dessas moléculas com outras proteínas, com repercussões funcionais (PENNEL et al., 2007). Nesse contexto, estima-se que os fatores genéticos expliquem 25 a 40% da variação da duração da gestação humana (ROMERO; VELEZ EDWARDS; KUSANOVIC; HASSAN; MAZAKI-TOVI; VAISBUCH; KIM; CHAIWORAPONGSA; PEARCE; FRIEL, L. A; et al., 2010; BEZOLD et al., 2013).

2.3.1 Contribuições do genótipo materno

Uma suscetibilidade genética para o parto prematuro parece ser transmitida matrilinearmente entre as gerações. O risco de uma mulher ter um parto pré-termo aumenta se ela nasceu prematura, se já teve outros partos prematuros e se sua mãe ou irmãs pariram prematuramente, mas parece não ser afetado pela ocorrência de partos prematuros na família do seu parceiro (DIZON-TOWNSON, 2001; BOYD et al., 2009; BEZOLD et al., 2013).

O genoma materno explica 13 a 23% da variação da idade gestacional nos nascimentos prematuros espontâneos (YORK et al., 2010, 2013, 2014). Diante disso, pesquisas buscam elucidar a fisiopatologia do parto prematuro a partir da análise de genes maternos envolvidos em processos que influenciam a duração da gestação, sendo a imunidade, infecção intrauterina e inflamação os mecanismos mais frequentemente investigados (DIZON-TOWNSON, 2001; CRIDER et al., 2005; BEZOLD et al., 2013; CHAN, 2014), além daqueles que regulam as mudanças no estado de quiescência para o de contratilidade uterina, influenciada por mediadores que inibem a contração (NORMAN et al., 1999; BEZOLD et al., 2013), e dos mecanismos relacionados ao controle do fluxo sanguíneo no útero e placenta. Busca-se encontrar polimorfismos de base única ou variações genéticas mais amplas que alteram a expressão dos genes e modificam a concentração de proteínas ou

outrossubstratos. Os resultados de muitas pesquisas, entretanto, não são replicáveis ou não podem ser generalizados para a população em virtude de limitações metodológicas (BEZOLD et al., 2013).

2.3.1.1 O gene lectina ligante de manose 2 (*MBL2*)

Os polimorfismos funcionais do gene lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) têm sido investigados na suscetibilidade a doenças infecciosas e/ou inflamatórias, como as infecções recorrentes, imunodeficiências secundárias, doenças cardíacas ateroscleróticas/coronárias, fibrose cística e doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, diabetes, dermatite atópica, entre outras (BONIOTTO et al., 2000; AITTONIEMI et al., 2004; TREVISIOL et al., 2005; BRANDÃO; GUIMARÃES; CARRERA; et al., 2008; BRANDÃO; GUIMARÃES; ARAUJO; et al., 2008).

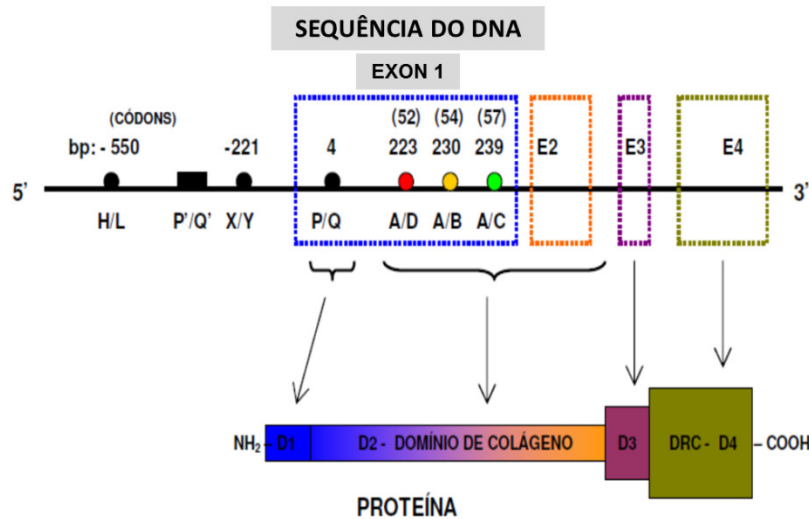
O gene *MBL2*, situado no cromossomo 10 (10q21), é responsável pela codificação da proteína Lectina ligante de manose (MBL) (IP et al., 2004), de origem hepática, que constitui uma das primeiras linhas de defesa do sistema imunológico. Suas funções relacionam-se ao reconhecimento de resíduos de carboidrato na membrana celular de patógenos e de células transformadas e apoptóticas (BOHLSON et al., 2007; FRASER et al., 2007), à ativação da via das lectinas do sistema complemento, bem como à opsonização e direcionamento à fagocitose de bactérias e vírus (TAKAHASHI et al., 2006; KOROGLU et al., 2010), podendo ser considerada uma proteína pró-inflamatória (GEIJN, VAN DE et al., 2008).

Os níveis séricos e funcionais da proteína MBL são determinados geneticamente por polimorfismos genéticos nas regiões estrutural e promotora do gene (KOROGLU et al., 2010). A baixa concentração funcional dessa proteína no soro está associada a um defeito opsonico comum que diminui a capacidade de ativação do Sistema Complemento (ISRAËLS et al., 2010). Sugere-se que essa situação torna o indivíduo propenso a infecções e inflamações subsequentes (IP et al., 2004), o que, em gestantes, pode representar um fator de risco para o parto prematuro.

O gene *MBL2* humano apresenta alguns sítios polimórficos conhecidos. A região promotora possui dois principais polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphism* - SNP), um na posição -550, onde ocorre a substituição de uma base guanina por uma citosina, representada pelo alelo H/L (rs11003125), e outro na posição -221, com a

substituição da base citosina por uma guanina, representada pelo alelo X/Y (rs7096206), afetando diretamente a expressão gênica e reduzindo os níveis da proteína MBL circulante (GARRED, 2003; GIBSON; MACLENNAN; GOLDWATER; et al., 2008; SCUDIERO et al., 2014) (figura 3).

Figura 3: Estrutura do gene *MBL2* e localização das regiões polimórficas.



Fonte: KALIL, 2006.

Já na região codificante ou estrutural do gene há SNPs nos códons 52 (rs5030737, troca de arginina por cisteína), 54 (rs1800450, troca de glicina por ácido aspártico) e 57 (rs1800451, troca de glicina por ácido glutâmico) do éxon 1, designados como alelo D, alelo B e alelo C respectivamente, que promovem mudança de aminoácidos na sequência protéica (GARRED, 2003; GIBSON; MACLENNAN; GOLDWATER; et al., 2008; FERRARONI, 2010). As substituições nos códons 54 e 57 quebram a estrutura do esqueleto de colágeno do gene, levando a uma ligação limitada entre as subunidades da MBL e causando níveis significativamente reduzidos da proteína funcional circulante no soro (SUMIYA et al., 1991; LIPSCOMBE et al., 1996). Já a substituição de aminoácidos codificada pela mutação no códon 52 pode resultar na formação de uma ponte dissulfeto extra e diminuir a estabilidade da molécula (MADSEN et al., 1998).

O alelo A designa o tipo selvagem, enquanto o alelo O representa as variantes alélicas B, C e D juntas (GEIJN, VAN DE et al., 2008). Assim, indivíduos com genótipo AA estão associados a altos níveis de proteína MBL circulante, enquanto a presença em heterozigose do alelo O (genótipo AO), associa-se à redução dos níveis e, em homozigose (genótipo OO), à quase completa ausência da proteína (WALLIS et al., 2004; RAJAGOPALAN et al., 2009;

ARAUJO et al., 2009). Cerca de 30% da população em geral com o genótipo AO ou OO apresentam níveis da proteína variando entre muito baixo a deficiente, sendo clinicamente considerados MBL deficientes (GEIJN, VAN DE et al., 2007).

A frequência dos polimorfismos na região codificante do *MBL2* varia entre os diferentes grupos étnicos. Alelos mutantes do códon 54 são comuns em populações de caucasóides (LIPSCOMBE et al., 1996), esquimós (MADSEN et al., 1998) e chineses de Hong Kong (LAU et al., 1996), com frequência gênica variando entre 11 e 17%. O alelo mutante do códon 57 é quase sempre encontrado em populações de origem africana, com frequência de 29% (SULLIVAN et al., 1996). Já a mutação no códon 52 é a menos comum das mutações estruturais, estando presente em populações caucasóides e negras com frequência gênica de 5% em ambas.

Os loci do *MBL2*(H/L e X/Y) estão intimamente ligados e, devido ao desequilíbrio de ligação do gene, podem ser reconstituídos em pelo menos sete haplótipos, que são repassados para outra geração:HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, HYPD, LYPB e LYQC. Cada indivíduo possui dois haplótipos para o gene *MBL2* e essa combinação também é considerada um determinante do nível de produção protéica, sendo as combinações entre os haplótipos HYPA, LYQA e LYPA associadas à elevada produção de MBL.Já a combinação entre esses e os demais está associada a níveis baixos, enquanto as combinações entre LXPA, HYPD, LYPB e LYQC estão associadas a uma produção insuficiente(BOUWMAN et al., 2006; ARAUJO et al., 2009; GIBSON et al., 2011). Um estudo sobre a distribuição dos haplótipos do *MBL2* na população brasileira observou uma maior frequência do HYPA entre os brasileiros com descendência europeia, oriental ou indígena. Por outro lado, o LYPA foi mais frequente entre os brasileiros afrodescendentes e o LYQA predominou entre aqueles sem descendência definida (BOLDT et al., 2006).

Sabe-se que o período da gestação é marcado por profundas mudanças na imunidade materna para permitir a formação e a acomodação do feto. Essas mudanças são investigadas com maior foco nas alterações do sistema imunológico adaptativo, porém, há indícios de que certos componentes da imunidade inata também são ajustados(ANNELLS et al., 2004, 2005).

De acordo com Van de Geijn e colaboradores (2007 e 2008) os níveis séricos da proteína MBL, presente no ambiente uterino, elevam-se a partir do primeiro trimestre gestacional e reduzem aos níveis basais em até seis semanas após o parto, sugerindo uma relação com a nidação, placentação e manutenção da gravidez.Esse aumento na concentração é maior entre as mulheres com genótipo AA, comparadas àquelas com genótipo AO ou OO.

A deficiência na concentração dessa proteína tem sido relatada como um risco para o parto prematuro e para o baixo peso ao nascer (ANNELLS et al., 2004), sendo também associada à corioamnionite (ANNELLS et al., 2005). Esses dados indicam que os altos níveis de MBL podem ser benéficos para a gestação. Por outro lado, também há relato de maior frequência de parto prematuro espontâneo em mulheres com elevada produção de MBL, sugerindo que altos níveis dessa proteína em resposta a processos inflamatórios presentes na gestação também podem predispor ao parto pré-termo (GEIJN, VAN DE et al., 2008; VIANNA; CHIES, 2009).

De acordo com Holst e Garnier (HOLST; GARNIER, 2008) e Enquobahrie e colaboradores (ENQUOBAHRIE et al., 2009), a presença da infecção do trato geniturinário em mulheres e a consequente liberação de endotoxinas pelo bacilo induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro e ativa uma cascata de eventos que eleva a produção de prostaglandinas e do hormônio de liberação de corticotrofinas (CRH), provocando contrações uterinas e, posteriormente, o relaxamento da musculatura do colo do útero.

Essa sequência de eventos culminaria com a expulsão prematura do bebê em gestantes com uma resposta inflamatória exacerbada, decorrente de polimorfismos funcionais em genes que regulam a resposta imunológica. Assim, tais variações elevariam a magnitude ou a duração da resposta inflamatória da gestante diante de um estímulo infeccioso, sendo o conhecimento dos mecanismos envolvidos nesse processo de grande interesse científico (ROMERO et al., 2007; GIBSON et al., 2007; THAN et al., 2008; HOLST; GARNIER, 2008; KUSANOVIC et al., 2009).

2.3.1.2 O gene sintase de óxido nítrico 3 (*NOS3*)

A descoberta de um fator de relaxamento derivado do endotélio, posteriormente identificado como óxido nítrico, foi uma grande conquista da medicina na década de 80 (MAUL et al., 2003).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre atuante na sinalização de inúmeros processos biológicos. Sua síntese ocorre pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina, sendo mediada por uma família de enzimas denominadas sintetases de óxido nítrico (NOS), codificadas por genes distintos (BUHIMSCHI et al., 1996; ALI et al., 1997). Há três

diferentes formas dessas enzimas: a isoforma endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS), sendo que as duas primeiras são expressas constitutivamente e reguladas pela liberação de cálcio, enquanto a terceira enzima é cálcio-independente e pode ser induzida pela liberação de citocinas (TÖRNBLÖM et al., 2005).

A isoforma endotelial da NOS (eNOS), expressa principalmente no endotélio vascular, desempenha importante papel na regulação da reatividade vascular e manutenção do tônus vascular basal em diversos órgãos, inclusive nos órgãos reprodutores femininos. Sua regulação depende da liberação de cálcio, que representa um importante sinalizador citoplasmático atuando a partir de ligações com proteínas intracelulares receptoras específicas. Uma dessas proteínas é a calmodulina, presente em praticamente todas as células. Ligada ao cálcio, forma o complexo Ca^{2+} /calmodulina, que influencia diretamente os níveis da enzima eNOS (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

A eNOS é produzida em baixa concentração e é um importante vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, sendo considerada um agente protetor para várias doenças, como a aterosclerose, doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, nefropatia diabética, entre outras. Investiga-se também o papel da eNOS no sistema imunológico e na mediação de processos inflamatórios (MAUL et al., 2003; ALBRECHT et al., 2003; WROBLEWSKA-SENIUK et al., 2011).

O gene eNOS, chamado óxido nítrico sintase 3 (*NOS3*), localiza-se no cromossomo 7q35-36 e há relatos de que alguns de seus polimorfismos poderiam ocasionar uma redução ou interrupção na atividade de transcrição, alterando a atividade enzimática e o controle da produção do óxido nítrico, tornando os indivíduos que apresentam tais polimorfismos susceptíveis a doenças isquêmicas cerebrais, doenças coronarianas, diabetes, paralisia cerebral, entre outras (ALBRECHT et al., 2003; KUZMANIĆ ŠAMIJA et al., 2011).

Segundo Maul e colaboradores (2003), o óxido nítrico exerce um papel ativo na cascata de eventos envolvidos na manutenção da gestação e na preparação do corpo e do colo do útero para o início do trabalho de parto, especialmente por meio da regulação da contratilidade uterina.

Estudos experimentais em ratas têm demonstrado que as isoformas endotelial e induzida do óxido nítrico estão presentes em vários tipos de células uterinas, e que a produção do óxido nítrico nessas células varia de acordo com a fase da gestação. Assim, durante a maior parte da gestação, a produção do NO mantém-se elevada para suprimir a contratilidade uterina e manter a gestação, e reduz-se nos momentos que antecedem o trabalho de parto, permitindo o aumento das contrações. Por outro lado, os níveis permanecem baixos nas

células do colo do útero ao longo da gestação, mantendo o estado basal de contração do colo, e elevam-se especialmente durante o parto, para possibilitar o relaxamento do tecido e a passagem do concepto (BUHIMSCHI et al., 1996; ALI et al., 1997; NORMAN et al., 1999; LEDINGHAM et al., 2000; MAUL et al., 2003; THÉVENON et al., 2009).

Ali e colaboradores (1997) sugerem que a mudança nos níveis de óxido nítrico no útero pode ser dependente dos níveis de progesterona, e que esses dois componentes agem sinergicamente na manutenção da gestação e no início do trabalho de parto. Dessa forma, os polimorfismos dos genes da NOS, que alterariam os níveis de produção do óxido nítrico no útero, poderiam relacionar-se ao parto prematuro.

Além disso, os baixos níveis da isoforma endotelial do óxido nítrico também podem relacionar-se aos prejuízos no relaxamento dos vasos e na circulação sanguínea materna, sendo associados aos quadros de pré-eclampsia, considerada um fator de risco importante para o parto prematuro. Entretanto, os resultados dos estudos sobre a atividade da eNOS e os níveis de óxido nítrico na circulação uterina e placentária de gestantes com ou sem pré-eclampsia ainda permanecem controversos (STEINERT et al., 2002).

Algumas variações polimórficas são encontradas no gene *NOS3* humano. Uma delas é o polimorfismo Glu298Asp (rs1799983), localizado no exon 7, caracterizado pela substituição de uma base guanina (G) por uma timina (T). De acordo com Kuzmanic Šamija e colaboradores (2011), esse SNP altera a estrutura primária da proteína, pode ocasionar mudanças na enzima eNOS e está associado à variabilidade nos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO). Nesse sentido, o genótipo G/G é associado à produção de elevados níveis de NO, enquanto o genótipo G/T associa-se a níveis intermediários e o T/T aos baixos níveis de óxido nítrico no organismo (KUZMANIĆ ŠAMIJA et al., 2011).

Estudos relacionam esse polimorfismo à hipertensão arterial, doença arterial coronariana, espasmos vasculares (ALBRECHT et al., 2003) e ao risco de paralisia cerebral em crianças que nasceram prematuras (GIBSON et al., 2008). Os resultados das pesquisas com os polimorfismos de base única do *NOS3* ainda são duvidosos e os efeitos funcionais pouco conhecidos.

2.3.2 Contribuições do genótipo fetal

Os fatores genéticos fetais explicam 11 a 35% da variação da idade gestacional nos partos prematuros espontâneos, de acordo com a descendência racial (YORK et al., 2010, 2013, 2014; BEZOLD et al., 2013). Apesar do genótipo materno exercer uma maior contribuição sobre a duração da gestação humana, segundo a maioria das pesquisas, a interação entre os genomas materno e fetal pode alterar o risco para o parto pré-termo espontâneo (MYKING et al., 2011; YORK et al., 2014).

O papel do genótipo fetal sobre esse desfecho não está claro. Especula-se que mutações em genes relacionados à produção de colágeno comprometem a integridade tissular do feto, o desenvolvimento da placenta e a produção e resposta ao hormônio liberador de corticotrofinas (CRH). Porém não há evidências de que variações genéticas no gene CRH estão associadas a mudanças na duração da gestação. Além disso, uma associação entre o nascimento prematuro espontâneo e o gene fator de crescimento insulina-símile 1 (IGF1R) do feto também já foi verificada (YORK et al., 2013).

Até o momento, poucas pesquisas investigaram a influência dos polimorfismos funcionais do gene *MBL2* fetal sobre o nascimento prematuro espontâneo (GEIJN, VAN DE et al., 2007, 2008). A maioria das pesquisas envolvendo esse gene busca uma associação entre a presença de variantes genéticas e a incidência de morbidades neonatais que se relacionam aos processos infecciosos e inflamatórios, como sepse e paralisia cerebral (GIBSON; MACLENNAN; GOLDWATER; et al., 2008; DZWONEK et al., 2008; HOLST; GARNIER, 2008; KOROGLU et al., 2010; ISRAËLS et al., 2010; GIBSON et al., 2011).

Entretanto, segundo Gibson e colaboradores (2008), os fetos que apresentam uma deficiência da proteína MBL são mais suscetíveis a infecções subclínicas e a eventos inflamatórios no útero, causando riscos para gestação. Por outro lado, a resposta inflamatória fetal exacerbada diante de uma infecção também poderia estar associada ao parto prematuro espontâneo em mulheres com rotura prematura das membranas (ROMERO et al., 1998).

Assim como nos estudos com o gene *MBL2*, as pesquisas do gene *NOS3* fetal comumente investigam as complicações durante a gestação e o período neonatal, como a restrição no crescimento fetal (WROBLEWSKA-SENIUK et al., 2011), o risco para hemorragia intraventricular (MARG et al., 2005; BALLABH, 2010; VANNEMREDDY et al., 2010), para paralisia cerebral (NELSON et al., 2005; GIBSON et al., 2008; KUZMANIĆ ŠAMIJA et al., 2011) e para doenças respiratórias em prematuros (POGGI et al., 2015), não

havendo dados científicos relativos à influência do gene *NOS3* fetal sobre o parto pré-termo espontâneo.

A regulação da resposta imunológica materna e fetal durante a gestação é um dos principais mecanismos relacionados à duração da gestação humana, sendo uma importante linha de investigação genética para o parto prematuro espontâneo, porém poucos estudos focaram o papel do gene *MBL2* até o momento. Por outro lado, as mudanças no estado de quiescência uterina durante a gestação e a regulação do fluxo sanguíneo no útero também são processos determinantes na duração da gestação e tem sido pouco investigados, sobretudo no que se refere à influência do óxido nítrico nesse contexto, justificando a realização desta pesquisa.

Os dados apresentados nesta revisão da literatura evidenciam a multicausalidade do parto pré-termo e o interesse científico sobre os eventos fisiopatogênicos envolvidos na ocorrência desta intercorrência gestacional. Além disso, apontam a variação genética materna e fetal como fatores que podem contribuir na investigação da etiologia da prematuridade, visto que metade dos casos ainda é considerada idiopática, considerando os possíveis efeitos da interação entre os fatores genéticos e os fatores ambientais que cercam a gestante.

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo clínico com um grupo de comparação composto por puérperas que tiveram parto pré-termo espontâneo e outras que pariram a termo, e seus respectivos neonatos.

3.2 LOCALIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido nas maternidades do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e do Hospital Agamenon Magalhães, na cidade de Recife, Pernambuco. A coleta das informações aconteceu, especificamente, nos centros de obstetrícia (COB), alojamentos conjuntos e nas unidades de cuidados intermediários neonatais (UCIN) e de terapia intensiva neonatal (UTIN) de ambas as maternidades.

Os referidos hospitais são públicos e considerados de referência em gestação de alto risco na cidade, atendendo uma população de mulheres com características socioeconômicas, demográficas e gestacionais semelhantes.

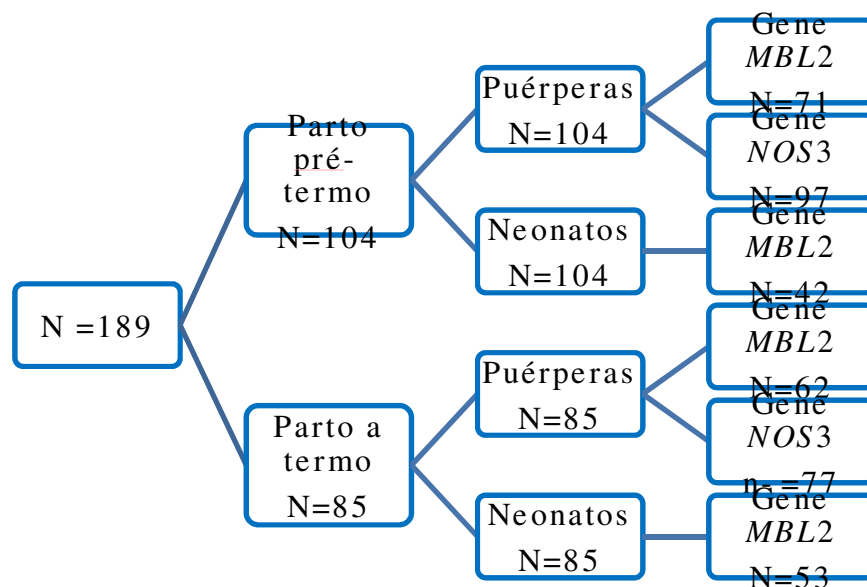
3.3 AMOSTRA

Foram convidadas a participar dessa pesquisa puérperas nas primeiras 48 horas pós-parto que pariram nas referidas maternidades no período de junho de 2013 a agosto de 2014 e que não apresentaram fator de exclusão. Seis puérperas de parto pré-termo recusaram a participação, já entre as puérperas de parto a termo não houve recusas. Dessa forma, a amostra total foi de 189 díades puérpera-neonato, sendo 104 de parto prematuro espontâneo (55%) e 85 de parto a termo (45%).

Os fatores de exclusão para ambos os grupos foram: gestação múltipla, má-formação fetal e crianças com quadro clínico de infecção congênita. O recrutamento dos neonatos se deu após a seleção das mães. Assim, ao serem convidadas a participar da pesquisa, as mães também eram solicitadas a autorizar a participação dos recém-nascidos.

As informações socioeconômicas, demográficas e gestacionais foram observadas na totalidade da amostra, porém houve perda amostral para análise dos polimorfismos do gene *MBL2* e do gene *NOS3*, conforme figura 4.

Figura 4: Distribuição da amostra considerada na análise dos polimorfismos funcionais nos genes *MBL2* materno e fetal e *NOS3* materno.



3.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO

A variável dependente do estudo foi o parto prematuro espontâneo. A definição das demais variáveis está apresentada no quadro a seguir:

Quadro 1: Apresentação das variáveis do estudo

Variáveis socioeconômicas e demográficas	Detalhamento	Categorização
Idade materna	Idade materna em anos	<20
		20 a 34
		≥35
Escolaridade materna	Anos de estudo formal	<5
		5 a 8
		≥9
Habilidade para leitura	Facilidade para leitura de uma carta ou revista	Sim
		Com dificuldade ou não lê
Ocupação	Envolvimento em atividade laboral remunerada durante a gestação	Não
		Sim
Renda familiar <i>per capita</i> mensal em salário mínimo	Razão entre o rendimento total da família no mês anterior à entrevista e o número de pessoas na residência, tendo como referência o salário mínimo de R\$ 724,00.	≤ 0,25
		0,26-0,50
		> 0,50
Origem geográfica materna de acordo com as regiões do Estado de Pernambuco	Região do Estado de Pernambuco onde nasceu a avó materna do neonato	Região metropolitana do Recife
		Zona da mata
		Agreste
		Sertão
		Outro Estado
Cor da pele	Cor da pele da puérpera na opinião do entrevistador, segundo categorias propostas pelo IBGE.	Branca
		Parda
		Preta
		Amarela
		Indígena
Situação conjugal	Situação conjugal dos pais da criança durante a gestação	Unidos
		Separados
Estresse psicossocial	Relato materno de estresse psicossocial na gestação	Não
		Sim
Variáveis gestacionais	Descrição	Categorização
Fumo	Qualquer consumo de cigarro durante a gestação	Não
		Sim
Álcool	Qualquer consumo de bebida alcoólica durante a gestação	Não
		Sim
Drogas	Qualquer consumo de bebida alcoólica durante a gestação	Não
		Sim
Estado nutricional materno	Estado nutricional da gestante ao final da gestação segundo IMC = peso (kg)/ altura (m) ² por semana gestacional (ATALAH S et al., 1997)	Baixo peso
		Adequado
		Sobrepeso
		Obesidade
Paridade	Número de partos prévios	Primípara
		Múltipara
Intervalo gestacional	Intervalo de tempo entre a penúltima e a última gestação em meses	≤18
		>18
Início do pré-natal	Trimestre gestacional em que realizou a primeira consulta de pré-natal	1º trimestre
		A partir do 2º trimestre
Número de consultas de pré-natal	Número de consultas de pré-natal realizadas utilizando a referência mínima de 06	< 6
		≥ 6

	consultas estabelecida pelo Ministério da Saúde do Brasil	
Qualidade da assistência de pré-natal	Qualidade da assistência de pré-natal segundo a percepção da puérpera	Ótima ou boa Regular ou ruim
ITU na gestação	Infecção no trato urinário (ITU) durante a gestação segundo prontuário ou relato materno	Não Sim
ITU no parto	Infecção no trato urinário (ITU) presente no momento do parto, registrada em prontuário	Não Sim
Vaginose bacteriana	Vaginose bacteriana durante a gestação registrada em prontuário	Não Sim
Corioamnionite	Registro em prontuário de corioamnionite ou infecção intramniótica aguda.	Não Sim
RPM	Rotura prematura de membranas, definida como rotura espontânea das membranas amnióticas após a 20ª semana gestacional e antes do início do trabalho de parto, registrada em prontuário.	Não Sim
Parto prematuro prévio	Puérpera teve outros filhos prematuros	Não Sim
Mãe prematura	Puérpera nasceu prematura	Não Sim
Antecedentes familiares de prematuridade	Membros da família materna nasceram prematuros	Não Sim
Aborto	Puérpera já sofreu algum aborto	Não Sim
Diabetes gestacional	Diabetes durante a última gestação	Não Sim
Hipertensão gestacional	Hipertensão durante a última gestação	Não Sim
Pré-eclâmpsia	Pré-eclâmpsia durante a última gestação registrada em prontuário	Não Sim
Incompetência istmocervical	Incompetência istmocervical na última gestação registrada em prontuário	Não Sim
Idade gestacional do neonato em semanas	Idade gestacional do neonato em semanas completas	<28 (prematuridade extrema) 28-31 (prematuridade grave) 32-35 (prematuridade moderada) 34-36 (prematuridade limítrofe) ≥37 (a termo)
Peso do neonato ao nascer	Em gramas, verificado nas primeiras 24 horas de vida. Classificação de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011)	<1.000 (extremo baixo peso) 1.000-1.499 (muito baixo peso) 1.500-2.499 (baixo peso) ≥2.500 (adequado)
Sexo do neonato	Verificado pela equipe de neonatologia	Masculino Feminino
Variáveis genéticas	Descrição	Categorização
Gene <i>NOS3</i> materno		
rs1799983	SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina por uma timina, que pode se	G/G G/T

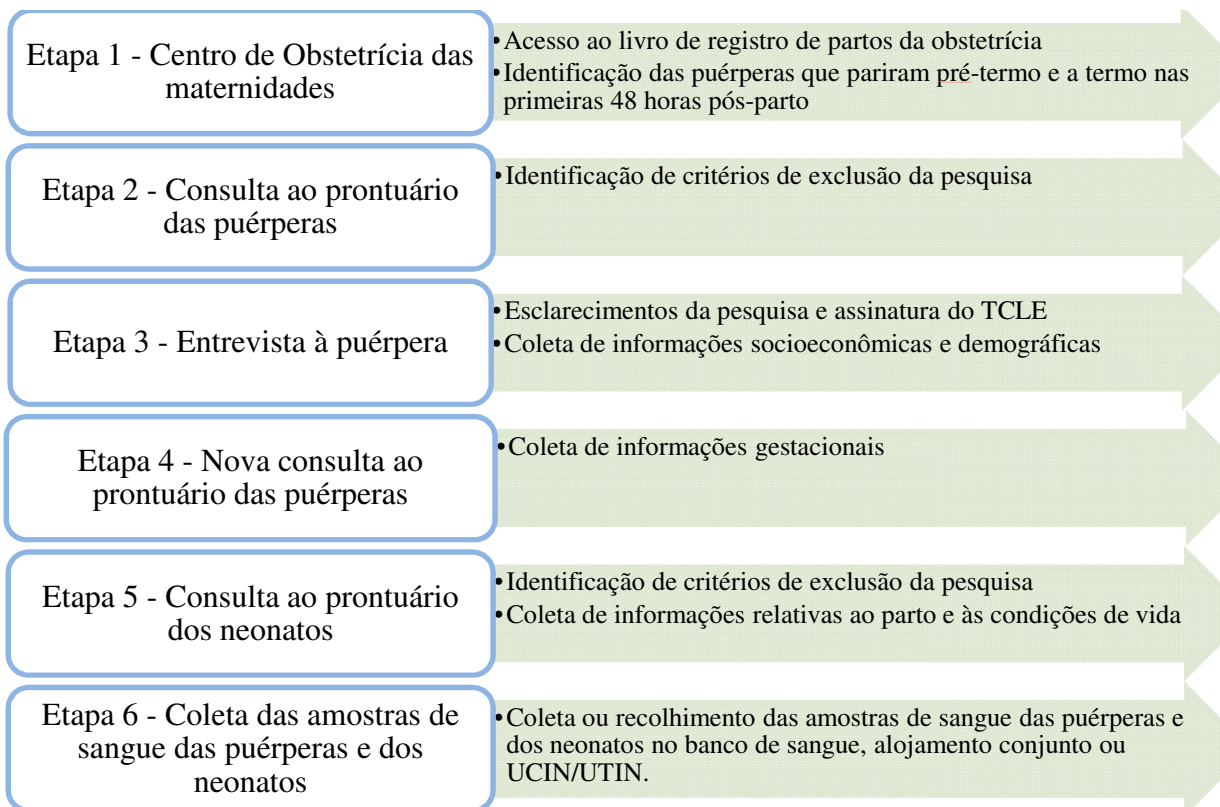
	manifestar na forma heterozigota (G/T) ou homozigota (T/T)	T/T
Frequência alélica G/T do rs1799983	Frequência do alelo G (selvagem) e do alelo T (variante)	G T
Gene <i>MBL2</i> materno e fetal		
rs11003125 (H/L)	SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina por uma citosina, que pode se manifestar na forma heterozigota (H/L) ou homozigota (L/L)	H/H H/L L/L
Frequência alélica H/L	Frequência do alelo H (selvagem) e do alelo L (variante)	H L
rs7096206 (X/Y)	SNP caracterizado pela substituição de uma base citosina por uma guanina, que pode se manifestar na forma heterozigota (Y/X) ou homozigota (Y/Y)	X/X X/Y Y/Y
Frequência alélica X/Y	Frequência do alelo X (selvagem) e do alelo Y (variante)	X Y
Códon 52 (A/D)	SNP caracterizado pela substituição de uma base citosina por uma timina, que resulta na substituição do aminoácido arginina por cisteína. Pode se manifestar na forma heterozigota (A/D) ou homozigota (D/D)	A/A A/D D/D
Frequência alélica A/D	Frequência do alelo A (selvagem) e do alelo D (variante)	A D
Códon 54 (A/B)	SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina por uma adenina, que resulta na substituição do aminoácido glicina por ácido aspártico. Pode se manifestar na forma heterozigota (A/B) ou homozigota (B/B)	A/A A/B B/B
Frequência alélica A/B	Frequência do alelo A (selvagem) e do alelo B (variante)	A B
Códon 57 (A/C)	SNP caracterizado pela substituição de uma base guanina por uma adenina, que resulta na substituição do aminoácido glicina por ácido glutâmico. Pode se manifestar na forma heterozigota (A/C) ou homozigota (C/C)	A/A A/C C/C
Frequência alélica A/C	Frequência do alelo A (selvagem) e do alelo C (variante)	A C
Genótipo A/O	Combinação dos SNPs rs52, rs 54 e rs 57. O genótipo A/A indica a ausência de polimorfismos nessas regiões do exon 1 do gene <i>MBL2</i>	A/A A/O O/O
Frequência alélica A/O	Frequência do alelo A (selvagem) e do alelo O (variante)	A O
Haplótipos do <i>MBL2</i>	Observação das combinações alélicas resultantes do desequilíbrio de ligação do gene <i>MBL2</i>	
Nível da proteína MBL	Nível esperado de acordo com a combinação dos haplótipos apresentada	Deficiente Baixo Alto

3.5 COLETA DOS DADOS

3.5.1 Condições socioeconômicas, demográficas e gestacionais

A coleta dos dados nas maternidades ocorreu no período de junho de 2013 a agosto de 2014 e seguiu o fluxograma abaixo (figura 5). As informações socioeconômicas, demográficas e gestacionais foram obtidas por meio de consulta aos prontuários e de entrevista às puérperas, utilizando um formulário pré-codificado e com questões fechadas (anexo 1), aplicado por uma equipe composta pelo pesquisador principal e por três iniciantes de pesquisa vinculados ao curso de graduação em medicina da Universidade Federal de Pernambuco.

Figura 5. Fluxograma das ações desenvolvidas durante a coleta dos dados maternos e neonatais nas maternidades.



O diagnóstico de parto prematuro espontâneo foi estabelecido pelas equipes médicas das maternidades a partir da presença de trabalho de parto prematuro (TPP), associado ou não à rotura prematura pré-termo das membranas, que resultava no parto antes de 37 semanas

completas ou 259 dias de gestação. Trabalho de parto prematuro se caracterizou pela presença de contrações uterinas regulares e persistentes numa frequência mínima de duas vezes a cada 10 minutos, dilatação cervical igual ou superior a um centímetro, esvaecimento cervical igual ou superior a 80% e progressão das alterações cervicais (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 1997; BITTAR et al., 2005).

A idade gestacional do neonato foi verificada pelas equipes hospitalares por meio da data da última menstruação ou pelo exame de ultrassonografia, e confirmada pelo método de Capurro somático, que se baseia em características da textura da pele, formato da orelha, tamanho da glândula mamária, pregas plantares, sinal do cachecol, posição da cabeça e formação do mamilo. Quando havia divergência na idade gestacional apontada por esses métodos, a idade mais elevada foi considerada para enquadrar a mãe/bebê no grupo de parto pré-termo ou de parto a termo.

3.5.2 Dados biológicos

3.5.2.1 Coleta de sangue

Amostras de sangue das puérperas e dos neonatos foram fornecidas pelo banco de sangue do Hospital Agamenon Magalhães, sendo provenientes de acesso venoso periférico e de cordão umbilical, respectivamente. Já no Hospital das Clínicas da UFPE, o sangue periférico das puérperas foi coletado durante o internamento por um profissional Biomédico devidamente habilitado para o procedimento, enquanto o sangue periférico dos neonatos foi disponibilizado pela Unidade de Cuidados Intermediários Neonatais ou de Cuidados Intensivos Neonatais, seguindo a rotina de solicitação de exames complementares. Assim, quando havia a necessidade de realização de exames nos neonatos, cerca de 0,5 ml de sangue eram disponibilizados para essa pesquisa, reduzindo a exposição dos bebês a procedimentos invasivos.

As amostras foram mantidas em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE) para processamento e verificação dos polimorfismos genéticos.

3.5.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pela pesquisadora principal e por uma estudante de iniciação científica vinculada ao grupo de Variabilidade Genética Humana utilizando a técnica de *desalting out* adaptada para pequenos volumes de sangue (MILLER et al., 1988; CARDOZO et al., 2009; KAMADA et al., 2014), sendo, posteriormente, as amostras quantificadas e armazenadas em freezer a -20° C.

Na adaptação da técnica de *salting out*, volumes de 0,25 ml de sangue total dos tubos com EDTA foram transferidos para microtubos de 1,5ml, sendo acrescentados 0,5 ml de solução de RCBL (*red blood cell lysis*), ao invés de 0,8 ml sugeridos no protocolo original, para lise das hemácias. Seguiu-se a homogeneização por inversão durante 30 segundos e à centrifugação a 13.000 rpm durante 3 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o processo se repetiu até a obtenção de um precipitado claro, sem vestígios de hemoglobina.

Após esta etapa, adicionaram-se às amostras 60 µl de tampão de proteinase K®, 04µl de proteinase K® 20U/mg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10µl de SDS® (sulfato dodecil de sódio, Sigma Chemical CO, Steinheim, Germany) a 20% e 160µl de água ultrapura, com homogeneização em Vortex até a dissolução completa do *pellet*. Os microtubos foram incubados em banho-maria a 55°C por 30 minutos, com uma suave agitação, e esfriados em temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 50µl de solução saturada de NaCl (6M), com agitação em Vortex e centrifugação por 6 minutos a 13.000rpm.

Os sobrenadantes foram transferidos para outros microtubos e novamente centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm, sendo, mais uma vez, transferidos para novos microtubos. Em seguida, 500 µl de etanol absoluto (99,5%) gelado eram adicionados lentamente pela parede dos tubos para a precipitação do DNA.

Os tubos foram vertidos e invertidos, gentilmente, por várias vezes, para a precipitação, e centrifugados a 13.000 rpm por 3 minutos. Após descarte dos sobrenadantes, acrescentaram-se 500µl de etanol a 70% gelado, ao invés de 1,0ml, seguindo-se por uma nova centrifugação de 13.000 rpm por 3 minutos. Depois dos sobrenadantes desprezados, os tubos foram mantidos abertos para secagem do álcool e 35 µl de água ultrapura foram adicionados para reidratação do DNA. Os tubos foram incubados *overnight*,

posteriormente, as amostras foram mantidas a 4° C para quantificação da concentração de DNA obtida.

Uma adaptação semelhante da técnica de *Salting Out* foi feita por Cardozo e colaboradores (2009), porém, neste estudo, os volumes são ainda menores do que os utilizados por esses autores em virtude das particularidades da nossa amostra, representada por neonatos prematuros com condições de saúde instáveis que apresentavam restrição à coleta de sangue em volume superior ao que nos foi fornecido. Essa adaptação à técnica não comprometeu a concentração de DNA obtida nas amostras, tampouco a qualidade dos resultados da genotipagem.

3.5.2.3 Genotipagem do gene *MBL2*

3.5.2.3.1 Amplificação do DNA

Inicialmente o gene *MBL2* foi amplificado por meio do método de Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) convencional considerando um volume final de 10 µl de solução contendo: 1,0 µl de DNA genômico (concentração média de 150 ng/µl), 1,2 µl de água ultrapura autoclavada, 0,4 µl de cada *primer* do MBL (5' – GCCAGTGGTTTTTGGACTCAC -3', *forward primer*; 5'- CCTCATATCCCCAGGCAGT - 3', *reverse primer*) e 7 µl de PCR Master Mix 2 x (Promega), que contém 50 unidades/mL de Taq Polimerase, 400µM de dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl₂, segundo informações do fabricante.

As reações foram realizadas em um termociclador, que utilizou um gradiente de temperatura de 54° a 52° C, durante 40 ciclos, para amplificação. A desnaturação ocorreu a 95°C durante 10 minutos. A primeira fase da hibridação se deu em 10 ciclos de 95° C por 20 segundos, 54° C por 30 segundos e 72° C por 60 segundos, enquanto a segunda fase ocorreu em 30 ciclos nas mesmas condições, com aumento da temperatura em 0,2° C a cada ciclo. A extensão ocorreu em 72°C por 7 minutos. Posteriormente, os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose a 2%.

3.5.2.3.2 Purificação dos produtos da PCR

Posteriormente, a purificação dos produtos de PCR foi realizada adicionando uma solução contendo 0,5 µl da enzima Exonuclease I, 1,0 µl da enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), 0,5 µl de solução tampão e 3 µl de água ultrapura, considerando um volume de 0,5 µl de produto de PCR. Os tubos contendo 10 µl de solução final foram colocados em um termocilador em dois ciclos, o primeiro com temperatura de 37° C durante 45 min e o segundo a 80° C durante 15 min. As enzimas utilizadas degradaram o excesso de DNA de fita simples (primers) e os nucleotídeos não incorporados durante a reação de PCR (dNTPs), e foram inativadas ao atingir a temperatura de 80° C.

Em seguida, as amostras foram quantificadas para verificar a concentração de DNA utilizando o equipamento NanoDrop 2000 e diluídas em água ultrapura até atingir uma concentração de 50 ng/µl.

3.5.2.3.3 Sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos purificados após amplificação foram sequenciados bidirecionalmente utilizando-se o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados na amplificação (*primer MBL forward e reverse*). A reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 poços, cada um contendo um produto de PCR purificado, o *mix* de reação e apenas um dos iniciadores. O volume final em cada poço da placa foi de 10 µl no qual continha 20–40 ng de DNA (2 µL de DNA), 0.5 µl de pré-mix *BigDye*, 1,75 µl de tampão de sequenciamento, 4,75 µl de água ultrapura e 1 µl de iniciador a 5 pmol/µL. Posteriormente, a placa preparada foi ciclada num termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA), em 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Após a ciclagem, os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados a fim de eliminar o excesso de iniciadores, sais, dNTPs e ddNTPs não incorporados.

A cada poço da placa foram adicionados 1,0 µl de EDTA 125 mM e 1,0 µL de acetato de sódio 3 M. Em seguida, 25 µl de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de

sequenciamento, sendo esta vedada, homogeneizada e incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 40 minutos a 3700 rpm e 20°C. Nesta etapa ocorreu a precipitação das moléculas de DNA. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e os *pellets* lavados com 35 µl de etanol 70% e a placa novamente homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm e 4°C. O etanol foi outra vez descartado por inversão e o excesso retirado por evaporação a 95°C.

Após a precipitação, as amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida *HiDi* (Applied Biosystems, USA). A placa foi vedada com uma *septa* específica para separação eletroforética em capilar. O sequenciamento foi realizado por separação eletroforética em capilar em um sequenciador modelo *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Os dados do sequenciamento foram coletados com o *software Data Collection* (Applied Biosystems). Após a coleta, os dados passaram por uma inspeção de qualidade por meio do *Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystems).

A análise manual das sequências foi realizada no *CodonCode Aligner 5.0* (CodonCode Corporation) a fim de identificar sua composição de bases e a presença dos SNPs investigados nesta pesquisa, tendo como referência a sequência consenso do gene *MBL* disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/194018744>. Já a identificação dos haplótipos foi feita por meio do *software Haploview*.

3.5.2.4 Genotipagem do gene *NOS3*

A genotipagem do SNP rs1799983 do gene *NOS3* utilizou sondas TaqMan® disponíveis comercialmente (Applied Biosystems, USA) em reações conduzidas segundo o protocolo do fabricante. As amostras foram amplificadas pelo método de Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) em Tempo Real utilizando o equipamento ABI7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems), que utiliza o software SDS (v.2.3) para a discriminação alélica (Applied Biosystems).

A TaqMan® é um fragmento de DNA utilizado para detectar sequências específicas no DNA amplificado pela PCR em Tempo Real através da complementaridade de bases. Essa sonda apresenta na extremidade 5' um corante *reporter* fluorescente e um corante silenciador *quencher* na extremidade 3'. Assim, quando a sequência alvo é detectada, a sonda se anela ao DNA e é clivada através da atividade da enzima nuclease 5' da Taq DNA polimerase,

separando os corantes e emitindo um sinal fluorescente. Cada emissão de luz, portanto, indica o sucesso no processo de amplificação da sequência alvo do DNA durante a PCR (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Assim, foi possível detectar a presença ou ausência do polimorfismo rs 1799983 do gene *NOS3* no DNA das puérperas.

3.6 PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os formulários da pesquisa foram revisados regularmente para avaliação da consistência dos dados socioeconômicos, demográficos e gestacionais obtidos nas entrevistas e análise dos prontuários.

A digitação do banco de dados e as análises estatísticas foram realizadas no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®, versão 20). O princípio de Hardy-Weinberg foi testado nas variáveis de cunho genético, com intuito de verificar a presença ou não de equilíbrio gênico populacional, utilizando o *software* SNPStats.

Em seguida, as variáveis foram exploradas para verificação das medidas de tendência central, de dispersão e de frequência. As medidas extremas (*outliers*) foram conferidas para identificação de erros na digitação do banco de dados.

A comparação da frequência dos polimorfismos estudados entre os grupos foi realizada pelos testes de qui-quadrado ou teste de Fisher, dependendo da natureza dos dados. Essas análises também permitiram estabelecer uma relação inicial de associação entre as variáveis genéticas, socioeconômicas, demográficas e gestacionais com o desfecho (parto prematuro ou a termo). Para isso, considerou-se o nível de significância estatística com valor de p igual ou menor que 0,05.

Numa etapa seguinte, as variáveis explanatórias cujo valor de p foi menor que 0,20 nas análises bivariadas foram selecionadas para serem inseridas na análise de regressão logística multivariada.

O número de consultas de pré-natal, apesar de apresentar valor de $p < 0,20$, não foi inserido no modelo de regressão por entendermos que as puérperas de parto pré-termo tiveram menor chance de completar o número mínimo de 06 consultas em virtude da antecipação do parto. Seguindo esse raciocínio, a ocorrência de hipertensão gestacional e de pré-eclâmpsia também não entraram no modelo de regressão logística porque comumente acometem as gestantes nas últimas semanas gestacionais. Nesse sentido, as puérperas que tiveram parto pré-termo

espontâneo não apresentaram a mesma chance de desenvolver essas intercorrências que as de parto a termo. Além disso, as puérperas que tiveram a indicação clínica de interrupção do parto antes de 37 semanas gestacionais não participaram desta pesquisa.

Com relação aos polimorfismos genéticos do gene *MBL2*, cada variável foi agrupada em duas categorias (selvagem ou polimórfica) com intuito de aumentar o número de indivíduos por grupo e permitir a inserção no modelo de regressão. A categoria polimórfica foi definida como aquela em que o alelo mutante estava presente em heterozigose ou em homozigose. Esse ajuste possibilitou a entrada do SNP no códon 54 do gene *MBL2* materno, enquanto os demais perderam a significância ou permaneceram com uma amostra insuficiente. Dessa forma, nenhum SNP ou haplótipo nongenotípico do neonato foi incluído no modelo de regressão. As variáveis relativas às frequências alélicas e haplotípicas também não entraram no modelo por representarem informações agrupadas, e não de cada indivíduo.

A análise de regressão logística utilizou como estratégia um modelo hierarquizado que considerou três níveis de relação das variáveis explanatórias com o desfecho. O posicionamento das variáveis em cada nível do modelo (distal, intermediário e proximal) se deu a partir do estabelecimento de relações lógicas de causalidade entre elas. Dessa forma, no nível 1 (distal), entraram as variáveis socioeconômicas e demográficas (cor da pele, idade e renda familiar *per capita*), no nível 2, incluíram-se as variáveis estado nutricional da gestante no final da gestação e intervalo gestacional, no nível 3, inseriu-se a variável presença de infecção do trato urinário no parto e os SNPs maternos códon 54 (gene *MBL2*) rs1799983 (gene *NOS3*) e, no último nível (proximal), entraram as variáveis ocorrência de parto prematuro prévio, antecedentes familiares de prematuridade e ocorrência de rotura prematura de membranas. Assim, foram obtidas as razões de chances (*Odds Ratio* - OR) não ajustadas e ajustadas ao modelo, o valor de *p*, bem como os intervalos de confiança de 95% de cada variável.

O método *enter* foi adotado na realização da regressão logística. Considerou-se categoria de referência aquela com menor chance de ser uma categoria de risco para o parto prematuro, exceto para a variável Códon 54 do gene *MBL2* materno, visando demonstrar o fator protetor do polimorfismo nessa região estrutural.

A estratégia utilizada para os ajustes das OR adotou os seguintes procedimentos: inicialmente, as variáveis do nível distal (nível 1) foram incluídas no modelo e ajustadas entre si. Aquelas cujo valor de *p* foi menor que 0,10 foram mantidas no modelo, mesmo que perdessem a significância estatística após a inclusão das variáveis dos níveis mais

inferiores. Essa estratégia foi mantida com a entrada das variáveis do nível intermediário (níveis 2 e 3) e do nível proximal (nível 4).

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE sob o parecer de número 166.364 em 11 de dezembro de 2012 (anexo 2). Os aspectos éticos contidos nas Resoluções 196/96 e 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde foram respeitados. Houve uma forte preocupação em poupar os neonatos dos procedimentos de coleta de sangue, dessa forma, na medida do possível, as amostras de sangue foram obtidas durante a realização de coletas que faziam parte da rotina dos serviços ou foram advindas do cordão umbilical, minimizando a exposição dos mesmos a procedimentos invasivos e dolorosos.

Todas as puérperas assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que consentia sua participação e de seu neonato na pesquisa. Antes disso, o documento era lido e as eventuais dúvidas sobre o estudo eram esclarecidas.

O trabalho foi desenvolvido a partir de recursos fornecidos pelos grupos de pesquisa em Saúde e Nutrição Materno Infantil e em Variabilidade Genética Humana. Não houve conflito de interesses.

3.8 LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS E OPERACIONAIS

As principais limitações metodológicas desta pesquisa foram o pequeno tamanho amostral e o modo de recrutamento da amostra, que se deu por conveniência a partir de uma população de alto risco atendida em hospitais de referência na cidade. Além disso, a coleta das informações relativas à história familiar de prematuridade e à história materna de nascimento prematuro, em alguns momentos, só foi possível graças à participação de parentes da puérpera (em especial, da mãe) na entrevista.

Inicialmente, a coleta de dados se daria apenas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), entretanto, dificuldades operacionais no acesso às amostras de

sangue dos neonatos levaram à ampliação do local de coleta ao Hospital Agamenon Magalhães. As perdas na coleta de sangue dos neonatos prematuros totalizaram 40% da amostra. Somada a essas dificuldades, a Unidade de Cuidados Intermediários e a Unidade de Terapia Intensiva do HC, que alojavam os neonatos participantes, sofreram algumas interdições no período do estudo em virtude de superlotação ou de riscos para infecção hospitalar.

Além das perdas relativas à coleta de sangue, muitas amostras sofreram hemólise antes da extração do DNA, necessitando de serem tratadas laboratorialmente antes da realização da técnica de *salting out*. Além disso, experiências internas do grupo de Variabilidade Genética Humana (UFPE/LIKA) indicam que a utilização do *primer* MBL (produto com 999 pares de bases) nas reações de PCR e de sequenciamento do gene *MBL2* também pode ter contribuído para a perda de informações em várias amostras. A região a ser amplificada nesse gene é extensa e, comumente, falhas nas reações utilizando esse *primer* tem sido observadas. Por outro lado, essa ainda parece ser a estratégia menos onerosa para investigação dos SNPs eleitos. As perdas na genotipagem do gene *MBL2* representaram cerca de 25% das amostras de sangue das puérperas e 36% das amostras dos neonatos. Já as perdas na genotipagem do gene *NOS3* materno foram de 8%.

Outro problema operacional foi o acesso às informações socioeconômicas, demográficas e biológico-gestacionais no prontuário das puérperas, que representou uma grande dificuldade em ambos os hospitais, seja pelas limitações nos registros das informações, seja pela dificuldade na localização desses documentos após a alta hospitalar.

Além disso, esta pesquisa não foi financiada por órgãos de fomento, o que inviabilizou a ampliação da equipe de pesquisadores, bem como do número de polimorfismos genéticos a ser investigado.

Uma vez que a amostra do presente estudo não é representativa da população geral, seus resultados devem ser considerados como exploratórios, prestando-se como guia para novas investigações sobre o tema.

4 RESULTADOS

Com relação à idade gestacional dos neonatos prematuros, observou-se um predomínio de casos de prematuridade limítrofe ou tardia (N=54, 54%) nesta pesquisa, enquanto ocorreram 17 casos (17%) de prematuridade moderada (17%), 18 casos (18%) de prematuridade grave e 11 (11%) de extrema, com média de idade gestacional de 32,6 semanas e mediana de 34 semanas gestacionais. A idade gestacional mínima foi de 24 semanas e a máxima de 36 semanas completas entre os neonatos pré-termo.

Quanto ao peso ao nascer, a maioria dos prematuros apresentou baixo peso (N=58, 56,9%). Além disso, houve 16 casos (15,7%) de neonatos com muito baixo peso e 11 casos (10,8%) de extremo baixo peso, de acordo com os critérios de classificação do peso ao nascer estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde apresentados no quadro 1. Por outro lado, no grupo de parto a termo, oito neonatos (9,4%) tiveram baixo peso ao nascer, enquanto os demais nasceram com peso adequado (N=77, 90,6%).

A respeito do perfil socioeconômico e demográfico das puérperas, a tabela 1 mostra que não existiram diferenças significativas entre os grupos de parto pré-termo (PPT) e de parto a termo (PT). Destaca-se que não houve diferença entre as puérperas quanto à cor da pele, segundo informação do entrevistador, e quanto à origem geográfica da família materna, fatores considerados importantes em estudos genéticos (LEWIS, 2002).

Estresse psicossocial na gestação foi referido pela maioria das mulheres de ambos os grupos, sem diferença estatística entre eles. Já o impacto negativo desse estresse sobre a gravidez foi relatado por 25 puérperas (24%) de PPT em comparação a 13 puérperas (15,3%) do grupo a termo. Outro aspecto estudado foi o consumo de drogas ilícitas, sendo citado por apenas duas mulheres do grupo de parto pré-termo (1,9%) e nenhuma a termo (dados não apresentados em tabela).

Tabela 1: Perfil socioeconômico e demográfico das puérperas do hospital Agamenon Magalhães e do Hospital das Clínicas da UFPE de acordo com o tipo de parto.

Variáveis socioeconômicas e demográficas maternas	Pré-termo		Termo		p
	N	%	N	%	
Idade (anos)					
<20	39	37,5	29	34,1	0,182 ^{††}
20 a 34	62	59,6	48	56,5	
≥35	03	2,9	08	9,4	
Escolaridade (anos)					
<5	11	10,6	08	9,4	0,919 [†]
5 a 8	36	34,6	28	32,9	
≥9	57	54,8	49	57,6	
Habilidade para leitura					
Sim	93	89,4	72	84,7	0,333 [†]
Com dificuldade ou não lê	11	10,6	13	15,3	
Ocupação					
Sim	36	34,6	31	36,5	0,791 [†]
Não	68	65,4	54	63,5	
Renda familiar <i>per capita</i> mensal em salário mínimo					
≤ 0,25	40	38,5	29	34,1	0,187 [†]
0,26-0,50	43	41,3	29	34,1	
> 0,50	21	20,2	27	31,8	
Origem geográfica materna de acordo com as regiões do Estado de Pernambuco¹					
Região metropolitana do Recife	44	42,7	44	51,8	0,470 ^{††}
Zona da mata	23	22,3	24	28,2	
Agreste	16	15,5	11	12,9	
Sertão	04	3,9	02	2,4	
Outro Estado	07	6,8	02	2,4	
Cor da pele					
Branca	10	9,6	15	17,6	0,089 [†]
Parda	81	77,9	54	63,5	
Preta	13	12,5	16	18,8	
Situação conjugal					
Unidos	84	80,8	71	83,5	0,623 [†]
Separados	20	19,2	14	16,5	

[†]Teste qui-quadrado

^{††}Teste Exato de Fisher

¹Sem informação de 10 puérperas do grupo PPT e duas do grupo PT

Com relação ao acompanhamento pré-natal, cinco puérperas (4,8%) do grupo PPT não frequentaram a nenhuma consulta, enquanto todas as puérperas de parto a termo participaram regularmente. Quanto à história de aborto, 20 mulheres (19,2%) do grupo PPT e 18 mulheres (21,2%) do grupo PT abortaram previamente, não havendo diferença estatística entre os grupos, com frequência de abortos variando entre 01 e 03 episódios. Anomalias uterinas e doenças autoimunes não foram identificadas na amostra (dados não apresentados em tabela).

A tabela 2 mostra algumas diferenças identificadas entre os grupos nos aspectos gestacionais. Observa-se que o estado nutricional da gestante, a existência de infecção do trato

urinário no momento do parto, ocorrência de corioamnionite e a rotura prematura de membranas mostraram-se associados ao parto pré-termo espontâneo. Além desses, parto prematuro prévio e existência de outros nascimentos prematuros na família também demonstram associação com o desfecho.

Tabela 2: Perfil gestacional das puérperas do hospital Agamenon Magalhães e do Hospital das Clínicas da UFPE de acordo com o tipo de parto.

Variáveis gestacionais	Pré-termo		Termo		p
	N	%	N	%	
Fumo					
Sim	06	5,8	08	9,4	0,341 [†]
Não	98	94,2	77	90,6	
Álcool					
Sim	17	16,3	16	18,8	0,655 [†]
Não	87	83,7	69	81,2	
Início do pré-natal					
1º trimestre	78	78,8	67	78,8	0,995 [†]
A partir do 2º trimestre	21	21,2	18	21,2	
Número de consultas de pré-natal					
< 6	62	62,6	22	25,9	<0,001 [†]
≥ 6	37	37,4	63	74,1	
Qualidade da assistência de pré-natal					
Ótima ou boa	76	76,8	68	80	0,596 [†]
Regular ou ruim	23	23,2	17	20	
Estado nutricional da gestante¹					
Baixo peso	35	38,5	15	18,3	0,002 [†]
Adequado	32	35,2	27	32,9	
Sobrepeso/Obesidade	24	26,4	40	48,8	
Paridade					
Primípara	63	60,6	45	52,9	0,291 [†]
Múltipara	41	39,4	40	47,1	
Intervalo gestacional em meses					
Primípara	63	60,6	45	52,9	0,101 [†]
≤18	12	11,5	05	5,9	
>18	29	27,9	35	41,2	
ITU na gestação					
Sim	44	42,3	38	44,7	0,741 [†]
Não	60	57,7	47	55,3	
ITU no parto					
Sim	21	20,2	07	8,2	0,021 [†]
Não	83	79,8	78	91,8	
Vaginose bacteriana					
Sim	13	12,5	10	11,8	0,878 [†]
Não	91	87,5	75	88,2	
Corioamnionite					
Sim	07	6,7	0	0	0,017 ^{††}
Não	97	93,3	85	100	
Rotura Prematura de Membranas²					
Sim	41	39,8	12	14,1	<0,001 [†]
Não	62	60,2	73	85,9	

Continua na próxima página

Tabela 2 (continuação): Perfil gestacional das puérperas do hospital Agamenon Magalhães e do Hospital das Clínicas da UFPE de acordo com o tipo de parto.

Variáveis gestacionais	Pré-termo		Termo		p
	N	%	N	%	
Mãe nasceu prematura³					
Sim	10	10	09	10,6	0,896 [†]
Não	90	90	76	89,4	
Antecedentes familiares de prematuridade					
Sim	52	50	29	34,1	0,028 [†]
Não	52	50	56	65,9	
Parto prematuro prévio⁴					
Sim	19	46,3	04	10	<0,001 [†]
Não	22	53,7	36	90,0	
Aborto					
Sim	20	19,2	18	21,2	0,740 [†]
Não	84	80,8	67	78,8	
Diabetes gestacional					
Sim	06	5,8	01	1,2	0,131 ^{††}
Não	98	94,2	84	98,8	
Incompetência istmocervical					
Sim	03	2,9	1,0	1,2	0,629 ^{††}
Não	101	97,1	84	98,8	
Hipertensão gestacional⁵					
Sim	10	9,6	46	54,1	<0,001 [†]
Não	94	90,4	39	45,9	
Pré-eclâmpsia⁵					
Sim	07	6,7	38	44,7	<0,001 [†]
Não	97	93,3	47	55,3	
Sexo do neonato⁶					
Masculino	47	46,5	49	57,6	0,131 [†]
Feminino	54	53,5	36	42,4	

† Teste qui-quadrado

†† Teste Exato de Fisher

¹ Sem informação de 13 puérperas do grupo PPT e três do grupo PT² Sem informação de uma puérpera do grupo PPT³ Sem informação de quatro puérperas do grupo PPT⁴ Excluindo as primíparas⁵ Puérperas que tiveram indicação clínica de interrupção do parto antes de 37 semanas gestacionais não foram incluídas nesta pesquisa⁶ Sem informação de três neonatos do grupo PPT

Nas análises genéticas, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi atendido apenas na investigação do SNP rs3125 do gene *MBL2* materno. As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos investigados nas puérperas e nos neonatos desta pesquisa estão expressas na tabela 3.

Com relação ao gene *MBL2*, os dados indicam a associação dos SNPs nos códonos 54 e 57 maternos e do SNPs no rs7096206 do neonato com a prematuridade, com maior frequência do alelo B (polimórfico) entre as mulheres e neonatos do grupo a termo. Além disso, a variação no códon 52 do neonato demonstrou associação limítrofe com o parto pré-termo. As

variações no genótipo A/O da díade mãe-filho foram associadas ao parto prematuro espontâneo em ambos os grupos, com maior frequência do alelo O entre as mulheres de parto a termo e entre os neonatos prematuros. Já o genótipo G/T do rs1799983 do gene *NOS3* materno predominou no grupo PPT com significância limítrofe ($p=0,078$).

Tabela 3: Frequência dos polimorfismos funcionais do gene *MBL2* materno e do neonato e do gene *NOS3* materno segundo os tipos de parto.

Variáveis genéticas	Puérperas					Neonatos				
	Pré-termo		Termo		p	Pré-termo		Termo		p
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Gene <i>MBL2</i>										
rs11003125 (H/L)										
H/H	08	11,3	06	9,7	0,886 ^{††}	0	0,0	05	9,4	0,093 ^{††}
H/L	27	38,0	26	41,9		17	40,5	23	43,4	
L/L	36	50,7	30	48,4		25	59,5	25	47,2	
Frequência alélica H/L										
H	43	30,0	38	31,0	0,949 [†]	17	20,2	33	31,1	0,090 [†]
L	99	70,0	86	69,0		67	79,8	73	68,9	
rs7096206 (X/Y)										
X/X	02	2,8	03	4,8	0,633 ^{††}	0	0,0	06	12,2	0,002 ^{††}
X/Y	19	26,8	13	21,0		14	32,6	05	10,2	
Y/Y	50	70,4	46	74,2		29	67,4	38	77,6	
Frequência alélica X/Y										
X	23	16,0	19	15,0	0,845 [†]	14	16,3	17	17,3	0,847 [†]
Y	119	84,0	105	85,0		72	83,7	81	82,7	
Códon 52										
A/A	65	91,5	55	93,2	0,396 ^{††}	37	88,1	36	97,3	0,057 ^{††}
A/D	06	8,5	03	5,1		05	11,9	0	0,0	
D/D	0	0,0	01	1,7		0	0,0	01	2,7	
Frequência alélica A/D										
A	136	96,0	113	96,0	1,0 ^{††}	79	94,0	72	97,3	0,449 ^{††}
D	06	4,0	05	4,0		05	6,0	02	2,7	
Códon 54										
A/A	67	94,4	47	81,0	0,012 ^{††}	35	89,7	24	75,0	0,096 ^{††}
A/B	04	5,6	05	8,6		01	2,6	0	0,0	
B/B	0	0,0	06	10,3		03	7,7	08	25,0	
Frequência alélica A/B										
A	138	97,0	99	85,0	0,001 ^{††}	71	91,0	48	75,0	0,010 [†]
B	04	3,0	17	15,0		07	9,0	16	25,0	
Códon 57										
A/A	64	91,1	45	90,0	0,001 ^{††}	38	90,5	36	92,3	0,504 ^{††}
A/C	07	9,9	0	0,0		02	4,8	0	0,0	
C/C	0	0,0	05	10,0		02	4,8	03	7,7	
Frequência alélica A/C										
A	135	95,0	90	90,0	0,129 [†]	78	92,9	72	92,3	0,894 [†]
C	07	5,0	10	10,0		06	7,1	06	7,7	
Genótipo A/O										
A/A	56	78,9	28	60,9	<0,001 ^{††}	26	68,4	17	65,4	0,004 ^{††}
A/O	15	21,1	06	13,0		08	21,1	09	34,6	
O/O	0	0,0	12	26,1		04	10,5	0	0,0	

Continua na próxima página

Tabela 3 (continuação): Frequência dos polimorfismos funcionais do gene *MBL2* materno e do neonato e do gene *NOS3* materno segundo os tipos de parto.

Variáveis genéticas	Puérperas					Neonatos				
	Pré-termo		Termo		p	Pré-termo		Termo		p
	N	%	N	%		N	%	N	%	
Gene <i>MBL2</i>										
Frequência alélica A/O										
A	127	89,4	62	67,4	<0,001 [†]	60	79,0	43	82,7	0,600 [†]
O	15	10,6	30	32,6		16	21,0	09	17,3	
Gene <i>NOS3</i>										
rs1799983 (G/T)										
G/G	55	56,7	51	66,2	0,078 ^{††}	-	-	-	-	
G/T	38	39,2	19	24,7		-	-	-	-	
T/T	04	4,1	07	9,1		-	-	-	-	
Frequência alélica G/T										
G	148	76,3	121	78,6	0,614 [†]	-	-	-	-	
T	46	23,7	33	21,4		-	-	-	-	

[†]Teste qui-quadrado

^{††}Teste Exato de Fisher

Quando os genótipos do *MBL2* da mãe e do filho foram analisados juntos, apenas o códon 54 esteve associado à prematuridade, observando-se a prevalência do genótipo selvagem na díade mãe-filho do grupo prematuro e do genótipo variante na díade de parto a termo (tabela 4).

Tabela 4: Combinação dos genótipos do *MBL2* da díade mãe-filho de acordo com o tipo de parto.

Genótipos do <i>MBL2</i> da díade mãe-filho	Pré-termo		Termo		<i>p</i>
	N	%	N	%	
rs11003125 (H/L)					
Ambos H/H	0	0,0	02	4,3	0,158 [†]
Mãe H/L ou L/L	0	0,0	03	6,5	
Filho H/L ou L/L	03	8,6	01	2,2	
Ambos H/L ou L/L	32	91,4	40	87,0	
rs7096206 (X/Y)					
Ambos X/X	0	0,0	01	2,3	0,177 [†]
Mãe X/Y ou Y/Y	0	0,0	04	9,3	
Filho X/Y ou Y/Y	02	5,7	01	2,3	
Ambos X/Y ou Y/Y	33	94,3	37	86,1	
Códon 52					
Ambos A/A	27	77,1	29	87,9	0,357 [†]
Mãe A/D ou D/D	03	8,6	03	9,1	
Filho A/D ou D/D	05	14,3	01	3,0	
Ambos A/D ou D/D	0	0,0	0	0,0	
Códon 54					
Ambos A/A	30	88,2	18	69,2	0,017 [†]
Mãe A/B ou B/B	01	2,9	02	7,7	
Filho A/B ou B/B	03	8,8	01	3,8	
Ambos A/B ou B/B	0	0,0	05	19,2	
Códon 57					
Ambos A/A	29	85,3	29	96,7	0,616 [†]
Mãe A/C ou C/C	02	5,9	0	0,0	
Filho A/C ou C/C	01	2,9	0	0,0	
Ambos A/C ou C/C	02	5,9	01	3,3	
Genótipo A/O					
Ambos A/A	18	54,5	09	50,0	0,310 [†]
Mãe A/O ou O/O	05	15,2	04	22,2	
Filho A/O ou O/O	07	21,2	01	5,6	
Ambos A/O ou O/O	03	9,1	04	22,2	

[†]Teste Exato de Fisher

Com relação aos haplótipos do *MBL2*, houve um predomínio do LYA na amostra total, com maior frequência nas puérperas e neonatos do grupo de parto pré-termo ($p=0,001$ e $p=0,003$). Por outro lado, o haplótipo LYB foi mais evidente nas puérperas e neonatos do grupo de parto a termo ($p<0,001$ e $p=0,010$). Do mesmo modo, o HYA predominou entre os recém-nascidos a termo ($p=0,022$) (tabela 5).

Tabela 5: Frequência dos haplótipos do gene *MBL2* nas puérperas e nos neonatos de acordo com o tipo de parto.

Haplótipos do <i>MBL2</i>	Genótipo materno					Genótipo do neonato				
	Pré-termo N=126	%	Termo N=86	%	<i>p</i>	Pré-termo N=60	%	Termo N=40	%	<i>p</i>
HYA	30	23,81	20	23,26	0,926 [†]	06	10,00	11	27,50	0,022 [†]
LYA	74	58,73	30	34,88	0,001 [†]	38	63,33	13	32,50	0,003 [†]
LXA	12	9,52	10	11,63	0,622 [†]	08	13,33	06	15,00	0,814 [†]
HYD	02	1,59	03	3,49	0,397 ^{††}	0	0,00	0	0,00	-
LYB	02	1,59	14	16,28	<0,001 [†]	04	6,67	10	25,00	0,010 [†]
LYC	06	4,76	09	10,47	0,112 [†]	04	6,67	0	0,00	0,148 ^{††}

[†]Teste qui-quadrado^{††}Teste Exato de Fisher

A tabela 6 mostra a distribuição da amostra de puérperas e de neonatos com relação ao nível de produção da proteína MBL inferido a partir da combinação dos haplótipos. As puérperas do grupo prematuro apresentaram maior frequência de haplótipos combinados associados à produção protéica mais elevada do que as de parto a termo. Com relação aos neonatos, a frequência de haplótipos combinados associados à produção alta não diferiu entre os grupos, enquanto a frequência das combinações associadas à deficiência na produção foi maior no grupo a termo.

Tabela 6: Produção da proteína MBL a partir da combinação dos haplótipos entre as puérperas e entre os neonatos.

Produção de MBL materna e do neonato*	Pré-termo		Termo		p	OR	IC (95%)
	N	%	N	%			
Produção materna							
Deficiente	04	7,0	11	27,5	0,021 [†]	1,00	-
Baixa	16	28,1	10	25,0		4,40	1,09-17,68
Alta	37	64,9	19	47,5		5,35	1,50-19,09
Produção do neonato							
Deficiente	02	8,3	07	41,2	0,005 ^{††}	-	-
Baixa	08	33,8	0	0,0		-	-
Alta	14	58,3	10	58,8		-	-

[†]Teste qui-quadrado^{††}Teste Exato de Fisher

* Inferida a partir do haplótipo combinado, considerada alta na combinação dos haplótipos HYA e LYA; baixa, nas combinações de HYA ou LYA com LXA, HYD, LYB ou LYC; e deficiente, quando as combinações ocorrem entre LXA, HYD, LYB e LYC (GIBSON et al., 2011).

Quando as variáveis com valor de *p* menor que 0,20 na análise bivariada foram analisadas por meio de regressão logística, o baixo peso da gestante em relação à idade gestacional, a ocorrência de RPM, de infecção do trato urinário no parto e o histórico materno de outros partos prematuros permaneceram associados à prematuridade. Além dessas,

apresença do SNP no códon54 no genótipo materno também se manteve associada ao desfecho, apresentando-se como um fator de proteção para a ocorrência do parto prematuro espontâneo na amostra investigada (tabela 7).

Tabela 7: Regressão logística dos fatores associados ao parto prematuro espontâneo.

Variáveis	OR não ajustado	<i>p</i>	OR ajustado	IC (95%)	<i>p</i>
Nível 1					
Cor da pele					
Preta	1,22	0,093	1,16	0,38-3,53	0,092
Parda	2,25		2,24	0,92-5,46	
Branca	1,00		1,00		
Nível 2					
Estado nutricional da gestante					
Baixo peso	3,89	0,003	3,47	1,55-7,78	0,010
Adequado	1,97		1,78	0,85-3,74	
Sobrepeso/Obesidade	1,00		1,00		
Nível 3					
Gene <i>MBL2</i> materno (códon54)					
A/B ou B/B (variante)	0,25	0,026	0,20	0,045-0,91	0,037
A/A (selvagem)	1,00		1,00		
ITU no parto					
Sim	2,82	0,026	10,23	1,80-58,20	0,009
Não	1,00		1,00		
Nível 4					
Parto prematuro prévio					
Primípara	2,29		2,21	0,77-6,33	
Sim	7,77	0,001	14,12	2,22-89,80	0,018
Não	1,00		1,00		
Antecedentes familiares de prematuridade					
Sim	1,93	0,029	1,79	0,69-4,61	0,229
Não	1,00		1,00		
Rotura Prematura de Membranas					
Sim	4,02	<0,001	2,97	1,08-8,13	0,034
Não	1,00		1,00		

Nível 1: ajustado pela idade materna e renda familiar *per capita* mensal

Nível 2: ajustado pelo intervalo intergestacional

Nível 3: ajustado pelo SNP no gene *NOS3* materno (rs1799983)

□

5 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa, os polimorfismos funcionais do gene lectina ligante de manose (*MBL2*) materno, relacionados à redução nos níveis de proteína MBL, demonstraram efeito protetor sobre a ocorrência do parto prematuro espontâneo, mesmo após o controle das variáveis socioeconômicas, demográficas e gestacionais, contrariando a hipótese inicial desta pesquisa. Quanto ao genótipo fetal, a maioria dos achados também sugere que a deficiência de MBL pode representar um fator de proteção para a prematuridade. Com relação ao polimorfismo investigado no gene da sintase endotelial de óxido nítrico (*NOS3*) materno, uma associação limítrofe foi observada entre os grupos, apontando para uma predominância do genótipo heterozigoto nas mulheres que tiveram parto prematuro e do genótipo mutante homozigoto entre as puérperas de parto a termo.

5.1 GENE *MBL2* E SUA RELAÇÃO COM O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO

Os polimorfismos da região promotora do gene *MBL2* materno (H/L e X/Y) predominaram na amostra, no entanto, sem apresentar diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Os genótipos polimórficos H/L e L/L representaram 88,7% do genótipo das mães de parto pré-termo (PPT) e 90,3% daquelas de parto a termo (PT). Semelhantemente, os genótipos X/Y e Y/Y estiveram presentes em 97,2% do grupo de PPT e 95,2% do grupo de parto a termo PT. A elevada frequência desses SNPs talvez seja justificada pela composição da amostra, formada por puérperas assistidas em maternidades de referência em gestação de alto risco.

Por outro lado, cada polimorfismo de base única (SNP) da região codificante do gene *MBL2* foi observado em cerca de 10% da amostra materna como um todo. Apenas o códon 54 (A/B) diferiu significativamente entre os grupos, com maior frequência dos genótipos polimórficos (A/B e B/B) nas puérperas que pariram no termo ($p=0,012$). Em adição, 21,1% das mulheres do grupo PPT e 39,1% do grupo PT apresentaram os genótipos A/O e O/O, com predomínio do alelo O também entre as mulheres do grupo PT ($p<0,001$).

Dessa forma, os dados obtidos sugerem que mulheres que carregam o genótipo relacionado a uma menor produção da proteína MBL pariram no termo e apontam para um

efeito protetor do SNP no códon 54 do gene *MBL2* materno sobre o parto prematuro espontâneo na amostra investigada. Esse efeito permaneceu estatisticamente significativo após o controle das variáveis socioeconômicas, demográficas e gestacionais no modelo de regressão logística multivariada.

Semelhantemente, Van de Geijn (2008), comparando os polimorfismos funcionais do gene *MBL2* entre puérperas de parto pré-termo e de parto a termo, observaram a associação do genótipo A/A (relacionado à produção de altos níveis da proteína MBL) com o parto prematuro, evidenciando um efeito de proteção exercido pelos SNPs da região codificante do gene nas gestantes de termo.

De acordo com Romero e colaboradores (2010), as concentrações de interleucina 6 (IL-6) no líquido amniótico de gestantes no segundo trimestre de gravidez são mais elevadas naquelas que evoluem para o parto pré-termo do que nas mulheres que entram em trabalho de parto a termo, sendo considerada um fator de risco para a prematuridade. Nesse sentido, Holst, Garnier e colaboradores (2008) relatam um aumento no risco de parto prematuro na presença de polimorfismos nos genes das interleucinas que induzem uma resposta imunológica exagerada. Em adição, numa revisão sistemática sobre as variações genéticas associadas ao parto prematuro, Crider e colaboradores (2005) afirmam que os polimorfismos que elevam a magnitude ou duração da resposta inflamatória estão associados à prematuridade, enquanto aqueles que levam a uma diminuição da resposta inflamatória reduzem o risco desta intercorrência.

Esses achados diferem dos observados por Annells e colaboradores (2004), que associaram o SNP no códon 54 materno ao nascimento prematuro abaixo de 29 semanas de gestação, porém sem fazer distinção aos tipos de prematuridade (espontânea ou indicada), enquanto os outros SNPs do gene *MBL2* não mostraram associação significativa. No presente estudo, entretanto, as análises consideraram apenas os nascimentos prematuros espontâneos, além disso, não houve a estratificação dos dados de acordo com a idade gestacional.

Em nosso estudo, semelhante ao genótipo materno, os SNPs na região promotora do gene *MBL2* dos neonatos também predominaram entre os grupos, porém com maior frequência nos prematuros. Já na região codificante do gene, os genótipos polimórficos foram menos evidentes, havendo uma maior frequência do SNP no códon 52 (A/D) entre os neonatos pré-termo ($p=0,057$), enquanto nos códons 54 e 57 não houve diferença entre os grupos. Esses dados assemelham-se aos observados por Bodamer e colaboradores (2006), que foram pioneiros na investigação da contribuição dos polimorfismos funcionais do gene *MBL2* do neonato sobre a ocorrência do parto prematuro. Os autores estudaram neonatos prematuros e

nascidos a termo, sem distinguir os tipos de prematuridade na amostra (espontânea ou indicada), e encontraram a associação apenas do códon 52 e do genótipo O/O dos neonatos com o nascimento pré-termo, com predomínio do alelo D.

Nesta pesquisa, o genótipo O/O dos neonatos só foi observado nos nascidos prematuros ($p=0,004$), sugerindo uma menor concentração dos níveis séricos da proteína MBL entre eles, mas não houve diferença na distribuição dos alelos A e O entre os grupos. Os resultados de Van de Geijn (2007) indicam que o genótipo fetal não altera a concentração sérica da proteína MBL materna, nem os níveis de atividade dessa proteína durante a gestação, porém, segundo Bodamer e colaboradores (2006), pode influenciar o nível de proteína MBL do próprio feto e participar da defesa a patógenos, bem como da regulação da resposta imunológica fetal diante de infecção.

Os elementos do sistema complemento são detectados no feto nas primeiras semanas de gestação, sendo sua síntese iniciada a partir da 9ª semana fetal, mas os níveis das proteínas permanecem baixos até os primeiros dias de vida pós-natal. No final da gestação de termo, os componentes do sistema complemento podem atingir até 10% dos níveis maternos, podendo ser menores entre os prematuros (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005; BODAMER et al., 2006; GIBSON et al., 2011). Dessa forma, acreditamos que a regulação da resposta inflamatória propiciada pela proteína MBL fetal exerça uma menor contribuição sobre a duração da gestação humana que a regulação feita pela MBL materna. Ressalta-se, porém, que, nesta pesquisa, a reduzida amostra de genótipos dos recém-nascidos não permitiu a inclusão das variáveis genéticas dos neonatos no modelo de regressão adotado.

Por outro lado, é possível que exista uma interação dos genótipos da mãe e do filho influenciando o risco para o parto prematuro (MYKING et al., 2011; UZUN et al., 2013). Assim, quando combinados os genes *MBL2* da díade mãe-filho, apenas o códon 54 manteve-se associado à prematuridade, com predomínio do genótipo selvagem (A/A) no grupo pré-termo e do genótipo variante (A/B ou B/B) na díade de parto a termo. Outros estudos do gene *MBL2* com análises semelhantes não foram encontrados na literatura.

Sobre a diferença observada na análise dos códons 52, 54 e 57 maternos e dos neonatos, estudos afirmam que existem diferenças nos fenótipos bioquímicos dessas variantes estruturais e que os alelos B, C e D estão envolvidos separadamente nos processos biológicos em humanos, sendo que todas as três variações tem efeitos nos níveis da proteína MBL (MADSEN et al., 1994; GARRED, 2003; BODAMER et al., 2006).

Com relação à frequência haplotípica, houve um predomínio do haplótipo LYA na amostra total. Esse resultado está de acordo com os achados de Boldt e colaboradores (2006),

que observaram a maior prevalência do LYA na população brasileira com descendência africana ou sem caracterização étnica definida, predominante no presente estudo. De acordo com a literatura, esse haplótipo está associado a níveis altos/intermediários de proteína MBL (BOUWMAN et al., 2006; ARAUJO et al., 2009; FERRARONI, 2010), tendo sido observado em maior frequência nas puérperas e neonatos do grupo PPT, comparados ao grupo PT. Por outro lado, o haplótipo LYB, associado a níveis baixos de produção proteica, foi mais frequente no grupo a termo. Em adição, o genótipo combinado das puérperas evidenciou uma maior frequência de combinações haplotípicas associadas ao alto nível de proteína nas mulheres do grupo PPT, quando comparadas às de parto a termo, enquanto as combinações associadas à deficiência na produção proteica foram mais frequentes naquelas do grupo PT.

A ação da proteína MBL sobre a gestação humana está relacionada à criação de um ambiente inflamatório uterino adequado, primordial para uma boa placentação, e à regulação da resposta do sistema imune inato diante das infecções que podem acometer o binômio materno-fetal. Esse último efeito se dá pela ativação da via da lectina no sistema complemento, cujo produto final é a formação de uma complexa membrana de ataque (membrane attack complex - MAC) que exerce uma eficiente função de defesa contra patógenos (GEIJN, VAN DE et al., 2007).

A proposta de que um perfil de inflamação excessiva durante a gestação pode exercer um papel determinante no desencadeamento do trabalho de parto prematuro tem sido evidenciada na literatura (ANNELLS et al., 2004, 2005; BODAMER et al., 2006; FRAKKING et al., 2006; HOLST; GARNIER, 2008; VIANNA; CHIES, 2009; ROMERO et al., 2010; CAPECE et al., 2014), podendo a própria gestação ser considerada como um estado de inflamação (GEIJN, VAN DE et al., 2008). Dessa forma, altos níveis da proteína MBL no sangue poderiam conferir desvantagem biológica por agravar as respostas inflamatórias diante de um processo infeccioso, aumentando a magnitude da inflamação e favorecendo a liberação de citocinas inflamatórias responsáveis pelo início do trabalho de parto e pela dilatação da cérvix uterina (CARVALHO et al., 2007; GEIJN, VAN DE et al., 2008; HOLST; GARNIER, 2008).

Até o momento, sabe-se que o perfil adequado de resposta inflamatória durante a gestação é importante para a manutenção da mesma, bem como a indução de um ambiente pró-inflamatório no útero é essencial para permitir uma correta angiogênese na interface da região materno-fetal nas primeiras semanas gestacionais. Nesse sentido, a proteína MBL pode exercer um papel importante durante a gravidez (GEIJN, VAN DE et al., 2007; VIANNA;

CHIES, 2009), entretanto, os resultados das pesquisas são contraditórios em relação aos níveis protéicos e sua associação com a duração da gestação.

5.2 GENE *NOS3* E SUA RELAÇÃO COM O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO

Com relação ao rs1799983 do gene *NOS3* materno, houve um predomínio do genótipo G/G em ambos os grupos (PPT=56,7%; PT= 66,2%), com maior frequência do genótipo heterozigoto no grupo de puérperas de parto prematuro (PPT=39,2%; PT=24,7%) e do genótipo polimórfico T/T no grupo de comparação (PPT=4,1%; PT=9,1%), com diferença limítrofe entre eles ($p=0,078$). As frequências dos alelos G e T não diferiram entre os grupos ($p=0,614$).

Kuzmanić Šamija e colaboradores (2011), investigando a associação desse SNP com a ocorrência de hemorragia intraventricular em crianças com Paralisia Cerebral, encontraram frequência semelhante dos genótipos G/G (46,9%) e G/T (46,1%), e uma baixa frequência do genótipo T/T (7%) entre crianças do grupo controle nascidas prematuramente e a termo, mas não fizeram distinção dessa frequência de acordo com a idade gestacional. Semelhantemente, outro estudo envolvendo 342 recém-nascidos com idade gestacional igual ou menor que 28 semanas observou que 48,5% dos neonatos pré-termo apresentaram o genótipo G/G, enquanto os genótipos G/T e T/T foram observados em 42,4% e em 9,1% dos prematuros, respectivamente, porém não houve comparação com recém-nascidos a termo (POGGI et al., 2015).

Os genótipos mutantes dos polimorfismos do gene *NOS3* reduzem a atividade da enzima eNOS e, conseqüentemente, os níveis de óxido nítrico (NO) no endotélio vascular, sendo o alelo T associado a vasoespasma arterial e à patogênese de doenças cardiovasculares em adultos (VANNEMREDDY et al., 2010; POGGI et al., 2015).

Em mulheres, o miométrio é um dos locais onde ocorre a síntese de óxido nítrico. A concentração desse radical livre parece se elevar durante a gestação e decrescer a partir do terceiro trimestre, podendo manter o estado de quiescência uterina por meio da regulação da conectividade tissular e do relaxamento miometrial (BUHIMSCHI et al., 1996; ALI et al., 1997; CAPECE et al., 2014).

O papel da enzima eNOS na modulação do tônus miometrial durante a gestação humana é reforçado por Norman e colaboradores (1999), que, através de biópsia uterina

realizada no momento do parto e de técnicas de imuno-histoquímica, observaram níveis significativamente altos de eNOS no miométrio de mulheres que tiveram parto pré-termo indicado, comparados aos encontrados naquelas de parto a termo. Os autores atribuem essa expressão fenotípica elevada às diferenças na idade gestacional, visto que as mulheres que tiveram indicação clínica de interrupção da gestação não entraram em trabalho de parto espontâneo, ou seja, não alcançaram a fase natural de redução dos níveis de óxido nítrico no miométrio, necessária ao início das contrações uterinas, e de aumento nos níveis desse radical livre na cérvix, importante para a promoção do relaxamento e expulsão do concepto.

Ainda nesse sentido, Ledingham e colaboradores (2000) observaram maiores níveis de eNOS na cérvix uterina de mulheres antes e após o trabalho de parto, comparados aos evidenciados em mulheres não gestantes, sugerindo uma influência da atividade dessa enzima na regulação do relaxamento cervical. Já Tornblom e colaboradores (2005) observaram níveis significativamente mais elevados das três isoformas da NOS na cérvix de mulheres que pariram prematuramente comparadas às de parto a termo, e associaram o aumento na expressão da enzima eNOS ao início do trabalho de parto. Por outro lado, há indícios que contrariam a hipótese da modulação do tônus do miométrio e do colo uterino exercida pela eNOS (BARTLETT et al., 1999).

De acordo com a literatura, o início do trabalho de parto pode ser considerado uma reação autoimune regulada pela sinalização de diferentes neurotransmissores. Na cérvix uterina, essa reação se caracteriza pela infiltração de leucócitos, neutrófilos e macrófagos seguida da produção de citocinas pró-inflamatórias e de colagenase, que causa a dissociação do colágeno do tecido conjuntivo. A produção de citocinas aumenta a liberação de óxido nítrico, especialmente pela ativação da enzima iNOS. O NO liberado, por sua vez, potencializa a cascata de citocina e, junto com a ação das prostaglandinas (PGE_2 e $PGE_{2\alpha}$), inicia uma potente vasodilatação e promove a degradação da matrix extracelular, permitindo o relaxamento e a dilatação cervical (TÖRNBLOM et al., 2005). Em adição, a pressão mecânica exercida pelo sangue na parede do vaso eleva a liberação de cálcio e aumenta a produção de óxido nítrico pela enzima eNOS, potencializando a vasodilatação e o relaxamento do colo do útero. Nesse sentido, o óxido nítrico pode ser considerado como um mediador inflamatório do relaxamento cervical, visto que regula a cascata de citocina e promove a vasodilatação da cérvix.

Capece e colaboradores (2014), entretanto, por meio de uma recente revisão de literatura, não encontraram evidências de que os polimorfismos no gene *NOS3* estão associados ao parto prematuro espontâneo com ou sem rotura prematura de

membranas. Talvez esse fato seja justificado pelo reduzido número de publicações relativas a esse tema. Além disso, há relatos de que cada uma das isoformas das sintetases de óxido nítrico (NOS) contribui na manutenção dos níveis adequados de NO durante a gestação, porém o efeito isolado delas não é crucial (NORMAN et al., 1999; TÖRNBLOM et al., 2005). Assim, sugere-se a investigação dessas sintases de modo agrupado em busca dos efeitos do óxido nítrico sobre a duração da gestação humana.

Não foram identificadas publicações científicas com objetivos semelhantes ao desta pesquisa para comparação dos resultados observados. Nesse sentido, esta investigação contribui para o conhecimento sobre o tema e, em adição, evidencia a necessidade de novos estudos, com maior tamanho amostral e maior número de SNPs investigados, para melhor compreensão da relação dos genes das sintases de óxido nítrico (NOS) com o parto prematuro espontâneo.

5.3 ASSOCIAÇÃO DOS FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS COM O PARTO PREMATURO ESPONTÂNEO

A análise de regressão logística multivariada evidenciou que a presença do SNP no códon 54 do gene *MBL2* materno, bem como o baixo peso da gestante de acordo com a idade gestacional, a ocorrência de rotura prematura de membranas, de infecção do trato urinário no parto e o histórico materno de outros partos prematuros permaneceram associados ao parto pré-termo espontâneo. Apenas a presença do polimorfismo no genótipo materno foi considerada um fator de proteção, enquanto as demais se apresentaram como risco para a ocorrência do parto prematuro espontâneo na amostra investigada. Esses achados ratificam a hipótese de que a etiologia da prematuridade é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais.

Apesar de a literatura apontar para a idade materna abaixo de 19 anos e a baixa renda familiar *per capita* como fatores de risco para o parto prematuro espontâneo (BLENCOWE et al., 2013; PASSINI et al., 2014), nesta pesquisa, essas variáveis não estiveram associadas à prematuridade. Esses achados concordam com as observações de Ip e colaboradores (2010) e talvez sejam justificados pela característica homogênea da amostra, composta por mulheres assistidas em maternidades públicas de referência em gestação de alto risco da cidade do Recife (Brasil), com perfis socioeconômico e demográfico semelhantes.

Houve um predomínio da cor parda entre as mulheres que pariram prematuramente, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,092$). Esses achados assemelham-se aos observados por Passini e colaboradores (2014) em um estudo multicêntrico sobre os fatores associados ao nascimento prematuro espontâneo no Brasil e écoerente com a composição étnico-racial da população brasileira.

De acordo com York e colaboradores (2014), a disparidade nas taxas de nascimento prematuro entre americanos com descendência africana e aqueles com descendência europeia, de aproximadamente 18% e 11,5% respectivamente, não pode ser explicada apenas pelas diferenças alélicas existentes entre as duas categorias, mas também pela diferença nos fatores ambientais que cercam a mulher durante a gestação. Embora se reconheça a existência de aspectos clínicos que elevem o risco de prematuridade entre as mulheres negras, como a maior frequência de cérvix uterina curta (LOCKWOOD; KUCZYNSKI, 2001), essa combinação multifatorial (genética e ambiental) no desencadeamento do parto prematuro tem sido crescentemente apontada na literatura, especialmente quando se discutem as contribuições da raça da gestante (FISCELLA, 2005; YORK et al., 2010, 2014).

No tocante aos fatores relacionados à gestação, encontramos uma maior chance de ocorrência de parto prematuro entre as puérperas que não completaram 06 consultas de pré-natal, entretanto, a relação do número de consultas realizadas com o número esperado para a idade gestacional não foi explorada neste estudo. Já o consumo de álcool, de drogas ilícitas e o fumo foram admitidos por um número pequeno de mulheres e não impactaram no desfecho da prematuridade, concordando com as observações de Ip e colaboradores (2010) e de Passini e colaboradores (2014).

Quanto ao estado nutricional, avaliado pelo IMC em relação à idade gestacional, mulheres com baixo peso no final da gestação tiveram três vezes mais chance de parir prematuramente do que aquelas com peso adequado ou sobrepeso, semelhantemente aos achados de Ip e colaboradores (2010), que realizaram um estudo do tipo caso-controle para investigar os fatores de risco para o parto prematuro de acordo com os subtipos clínicos da prematuridade, e observaram um risco duas vezes maior de parto prematuro espontâneo entre as mulheres com índice de massa corporal abaixo de $18,5 \text{ kg/m}^2$. Em adição, Ehrenberg e colaboradores (2009) relatam que mulheres obesas ou com sobrepeso tem menor frequência de parto prematuro espontâneo do que aquelas com peso adequado ou baixo peso. Os achados desses autores indicam que as mulheres com peso mais elevado apresentam menor frequência e potência das contrações uterinas antes de 35 semanas de gestação do que as demais, assim o

excesso de peso poderia ser considerado um fator de proteção para a prematuridade espontânea (EHRENBERG et al., 2009; PASSINI et al., 2014).

Já a hipertensão gestacional e a pré-eclâmpsia foram mais frequentemente observadas entre as mulheres do grupo a termo, enquanto a presença de diabetes gestacional foi semelhante entre os grupos. Ressalta-se que a inclusão das puérperas nesta pesquisa se deu a partir da ocorrência do trabalho de parto prematuro espontâneo, assim, aquelas que apresentaram hipertensão grave, pré-eclâmpsia ou diabetes com indicação de interrupção da gestação não participaram desta investigação. Resultados similares têm sido encontrados na literatura, que apontam a associação dessas variáveis apenas com o parto prematuro indicado, mas não com a prematuridade espontânea (TORLONI et al., 2009; IP et al., 2010; PASSINI et al., 2014).

Ainda sobre as intercorrências gestacionais, a infecção do trato urinário (ITU) durante a gestação acometeu quase 45% da amostra de puérperas, sem impacto estatístico para a prematuridade. Ressalta-se, porém, que quase a totalidade das mulheres deste estudo utilizou medicamento antibiótico no tratamento dessa doença. Já a evidência dessa infecção no momento do parto foi considerada um fator de risco para o parto prematuro, mesmo controlado por outras variáveis ($p=0,009$). Em nosso estudo, a prevalência de infecção urinária na gestação foi mais elevada do que a observada por Passini e colaboradores (2014) em puérperas das diversas regiões do Brasil. Os autores identificaram uma maior frequência desse agravo nas mulheres que pariram prematuramente, entretanto não esclareceram se a infecção do trato urinário na gestação, avaliada na referida pesquisa, contemplou a presença de ITU no momento do parto.

Sabe-se que alguns fatores mecânicos e hormonais observados durante a gravidez contribuem para provocar mudanças no trato urinário materno que predis põem ao desenvolvimento da infecção. Por conseguinte, a ITU aumenta a concentração sanguínea de fosfolipase A, podendo promover a conversão de prostaglandina E_2 (PGE_2) em prostaglandina E_{2d} (PGE_{2d}) e o estímulo das fibras uterinas para o início das contrações. Mesmo em níveis baixos, essa atividade contrátil uterina pode reduzir as trocas placentárias e favorecer o início do trabalho de parto pré-termo (HOLST; GARNIER, 2008; FIGUEIRÓ-FILHO; BISPO, 2009).

Nesse sentido, do ponto de vista clínico, constata-se uma possibilidade de que a ocorrência de ITU na gestação, além da presença de ITU no momento do parto, poderiater influenciado a antecipação do trabalho de parto nas puérperas do grupo PPT, tendo em vista o

fato de a maioria delas ter sido considerada produtora de altos níveis de proteína MBL, relacionada a uma exacerbação da resposta inflamatória, conforme discussão anterior.

A ocorrência de corioamnionite ou infecção intra-amniótica aguda, também demonstrou associação com o parto prematuro espontâneo ($p=0,017$), sendo um fator comumente relacionado à infecção do trato urinário e à rotura prematura de membranas (MACHADO et al., 2012). Acredita-se que, diante de um estímulo infeccioso, tanto o feto como a mãe respondem com uma reação inflamatória aguda dentro da cavidade amniótica na tentativa de proteger o feto. Essa reação envolve a ativação de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios associados à sequência de eventos que culminam com a dissociação do colágeno no tecido das membranas amnióticas e do colo do útero, ocasionando a rotura das membranas e promovendo o relaxamento cervical (FIGUEIRÓ-FILHO; BISPO, 2009; MACHADO et al., 2012). Nesse contexto, a rotura prematura das membranas, considerada uma intercorrência na gravidez fortemente associada ao parto prematuro espontâneo (MELO, 2011), elevou significativamente a chance para este desfecho na amostra investigada. Segundo a Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (2008), a infecção é uma das principais causas dessa complicação, sendo que 32 a 35% dos casos tem cultura de líquido amniótico positiva.

Por último, a recorrência de parto prematuro espontâneo demonstrou relação com o desfecho investigado na análise multivariada, o que não foi observado com a existência de outros casos de prematuridade na família e com o fato da puérpera ter nascido prematura. Estes dados suportam o papel da interação entre os fatores genéticos e os fatores de risco ambientais individuais no parto pré-termo. Eles são consonantes com a literatura e corroboram com as observações de Boyd e colaboradores (2009) e de Passini e colaboradores (2014), que indicam a história prévia de parto prematuro espontâneo como um dos principais marcadores para identificação de mulheres com risco para o parto pré-termo. Além disso, suportam a importância de uma anamnese adequada durante o início do acompanhamento de pré-natal para subsidiar medidas de apoio ao binômio mãe-filho.

Conclui-se que a presença dos polimorfismos funcionais nos códons 54 e 57 do gene lectina ligante de manose 2 (*MBL2*) materno promoveu um efeito protetor sobre a ocorrência do parto pré-termo espontâneo na amostra investigada. A associação do códon 54 com o parto prematuro permaneceu significativa após o controle das variáveis socioeconômicas, demográficas e gestacionais reconhecidas como fatores associados à prematuridade, e também quando considerada uma possível interação entre os genótipos na díade mãe-filho. Além disso, sugere-se que a maior frequência do haplótipo LYA no grupo de parto prematuro e do

haplótipo LYB no grupo de parto a termo, sugerindo níveis séricos de proteína MBL mais elevados entre as puérperas e neonatos do grupo PPT, pode ter contribuído para a ocorrência da prematuridade. Por outro lado, uma associação limítrofe foi estabelecida entre a variação genética materna do gene *NOS3* e o parto pré-termo espontâneo.

Esses achados devem ser interpretados com cautela em virtude do pequeno tamanho amostral do presente estudo, especialmente na análise dos dados genéticos, que necessitam de grande amostra para permitir a extrapolação dos resultados para a população.

□

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As investigações relativas à prematuridade espontânea são necessárias para esclarecer os mecanismos fisiológicos dessa intercorrência gestacional e visam contribuir para a adoção de práticas clínicas mais efetivas na prevenção do parto pré-termo, com impacto na saúde da população. As pesquisas sobre esse tema, entretanto, são complexas em virtude das dificuldades na conceituação da prematuridade e das limitações dos métodos de estimação da idade gestacional. Além disso, a ausência de bases de dados padronizados no Brasil, bem como de registros qualificados da atenção obstétrica e neonatal também representam barreira nas investigações.

Ainda assim, mais recentemente, os investimentos nos estudos de base genética tem favorecido o conhecimento de novos mecanismos envolvidos no controle da duração da gestação humana. Algumas limitações nos estudos dos polimorfismos genéticos, entretanto, têm sido discutidas na comunidade científica. Os mesmos podem regular isoladamente uma via de ação, mas não se relacionar a outras vias ativas, ou mesmo ter seu efeito inicial modificado pela interação com outros SNPs do mesmo gene ou pela interação com outros genes envolvidos no desencadeamento do parto pré-termo espontâneo. Diante disso, crescentemente, as investigações têm focado conjuntos de variações genéticas ou mesmo a análise do genoma inteiro dos indivíduos.

Essa nova estratégia de investigação pode ser considerada um passo importante para a identificação de marcadores genéticos e de mecanismos envolvidos na antecipação do trabalho de parto, além disso, pode auxiliar na compreensão do impacto do genótipo materno e fetal sobre a prematuridade espontânea. Essas pesquisas, entretanto, requerem um elevado investimento financeiro em insumos laboratoriais e em tecnologia. Pesquisas exploratórias preliminares podem, então, contribuir para indicação de genes-alvo e, assim, colaborar nas investigações mais complexas sobre a etiologia e fisiopatologia do parto pré-termo espontâneo.

Nesse sentido, o presente estudo fornece informações exploratórias relevantes, e até pioneiras, sobre a influência de polimorfismos funcionais nos genes *MBL2* e *NOS3* na ocorrência da prematuridade espontânea, podendo ser a regulação da resposta inflamatória materna o principal elo entre esses genes e o desfecho analisado. Ressalta-se, porém, a necessidade de outras investigações, com maior tamanho amostral e maior número de

variações genéticas estudadas, para possibilitar a análise da interação dos genótipos mãe-filho e compreender melhor os mecanismos de ação dos referidos genes.

Esse conhecimento relativo a uma possível suscetibilidade genética para a prematuridade pode culminar, num futuro próximo, na dosagem de proteínas marcadoras (como a proteína MBL) como parte da rotina de exames pré-natais e precisa estar atrelado ao acompanhamento das condições gestacionais e dos fatores ambientais que cercam a mulher, visto que a interação entre esses fatores pode ser responsável pelo desencadeamento dos mecanismos envolvidos no início prematuro do trabalho de parto.

Dessa forma, sugere-se o cuidado adequado às gestantes durante a realização das consultas de pré-natal visando à identificação daquelas que apresentam marcadores bioquímicos de suscetibilidade genética para o parto prematuro, história familiar de prematuridade ou episódio de parto prematuro prévio, bem como à identificação de fatores preveníveis do parto prematuro espontâneo, como a ocorrência de infecção do trato urinário e o baixo peso da gestante de acordo com a idade gestacional.

□

REFERÊNCIAS

- AITTONIEMI, J.; FAN, Y.-M.; LAAKSONEN, R.; et al. The effect of mannan-binding lectin variant alleles on coronary artery reactivity in healthy young men. **International journal of cardiology**, v. 97, n. 2, p. 317–8, 2004.
- ALBRECHT, E. W. J. A.; STEGEMAN, C. A.; HEERINGA, P.; HENNING, R. H.; GOOR, H. VAN. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of pathology**, v. 199, n. 1, p. 8–17, 2003.
- ALI, M.; BUHIMSCHI, I.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R. E. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. **Molecular human reproduction**, v. 3, n. 11, p. 995–1003, 1997.
- ALLEN, M. C. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants. **Current opinion in neurology**, v. 21, n. 2, p. 123–8, 2008.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. **Guidelines for perinatal care**. 4th ed. Elk Grove Village, 1997.
- ANNELLS, M. F.; HART, P. H.; MULLIGHAN, C. G.; et al. Interleukins-1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 191, p. 2056–2067, 2004.
- ANNELLS, M. F.; HART, P. H.; MULLIGHAN, C. G.; et al. Polymorphisms in immunoregulatory genes and the risk of histologic chorioamnionitis in Caucasoid women: a case control study. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 5, p. 4, 2005.
- ARAÚJO, D. M. R.; PEREIRA, N. D. L.; KAC, G. Ansiedade na gestação, prematuridade e baixo peso ao nascer: uma revisão sistemática da literatura. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 4, p. 747–756, 2007.
- ARAUJO, J.; SEGAT, L.; GUIMARÃES, R. L.; et al. Mannose binding lectin gene polymorphisms and associated auto-immune diseases in type 1 diabetes Brazilian patients. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 131, n. 2, p. 254–9, 2009.
- ARRAES, L. C.; SOUZA, P. R. DE; BRUNESKA, D.; et al. A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 39, n. 6, p. 719–23, 2006.
- ASSUNÇÃO, P. L. DE; NOVAES, H. M. D.; ALENCAR, G. P.; MELO, A. S. D. O.; ALMEIDA, M. F. DE. Desafios na definição da idade gestacional em estudos populacionais sobre parto pré-termo: o caso de um estudo em Campina Grande (PB), Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 14, n. 3, p. 455–466, 2011.

ATALAH S, E.; CASTILLO L, C.; CASTRO S, R.; ALDEA P, A. Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional en embarazadas. **Revista Medica de Chile**, v. 125, p. 1429–1436, 1997.

BALLABH, P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. **Pediatric research**, v. 67, n. 1, p. 1–8, 2010.

BARTLETT, S. R.; BENNETT, P. R.; CAMPA, J. S.; et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms in pregnant human myometrium. **The Journal of physiology**, v. 521 Pt 3, p. 705–716, 1999.

BECK, S.; WOJDYLA, D.; SAY, L.; et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 88, n. 1, p. 31–8, 2010.

BETA, J.; AKOLEKAR, R.; VENTURA, W.; SYNGELAKI, A.; NICOLAIDES, K. H. Prediction of spontaneous preterm delivery from maternal factors, obstetric history and placental perfusion and function at 11-13 weeks. **Prenatal Diagnosis**, v. 31, n. August 2010, p. 75–83, 2011.

BEZERRA, L. C.; OLIVEIRA, S. M. J. V. DE; LATORRE, M. D. R. D. D. O. Prevalência e fatores associados à prematuridade entre gestantes submetidas à inibição de trabalho de parto prematuro. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 6, n. 2, p. 223–229, 2006.

BEZOLD, K. Y.; KARJALAINEN, M. K.; HALLMAN, M.; TERAMO, K.; MUGLIA, L. J. The genomics of preterm birth: from animal models to human studies. **Genome medicine**, v. 5, n. 4, p. 34, 2013.

BITTAR, R. E.; CARVALHO, M.; ZUGAIB, M. Condutas para o trabalho de parto prematuro. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 27, n. 9, p. 561–566, 2005.

BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; CHOU, D.; et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. **Reproductive health**, v. 10 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S2, 2013.

BODAMER, O. A; MITTERER, G.; MAURER, W.; et al. Evidence for an association between mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene polymorphisms and pre-term birth. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 8, n. 8, p. 518–524, 2006.

BOHLSON, S. S.; FRASER, D. A; TENNER, A. J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. **Molecular immunology**, v. 44, n. 1-3, p. 33–43, 2007.

BOLDT, A. B. W.; CULPI, L.; TSUNETO, L. T.; et al. Diversity of the MBL2 Gene in Various Brazilian Populations and the Case of Selection at the Mannose-Binding Lectin Locus. **Human Immunology**, v. 67, n. OCTOBER, p. 722–734, 2006.

BONIOTTO, M.; CROVELLA, S.; PIRULLI, D.; et al. Polymorphisms in the MBL2 promoter correlated with risk of HIV-1 vertical transmission and AIDS progression. **Genes and immunity**, v. 1, n. 5, p. 346–8, 2000.

BOUWMAN, L. H.; ROEP, B. O.; ROOS, A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. **Human immunology**, v. 67, n. 4-5, p. 247–56, 2006.

BOYD, H. A.; POULSEN, G.; WOHLFAHRT, J.; et al. Maternal contributions to preterm delivery. **American journal of epidemiology**, v. 170, n. 11, p. 1358–64, 2009.

BRANDÃO, L. A. C.; GUIMARÃES, R. L.; ARAUJO, J.; et al. Association between MBL2 polymorphism and T1D: does ethnicity play a role in the susceptibility of this multifactorial disease? **Human immunology**, v. 69, n. 9, p. 577–9, 2008.

BRANDÃO, L. A. C.; GUIMARÃES, R. L.; CARRERA, M.; et al. MBL2 functional allelic variants and increased risk for the development of atopic dermatitis in Brazilian children. **Archives of dermatology**, v. 144, n. 3, p. 412–3, 2008.

BUHIMSCHI, I.; ALI, M.; JAIN, V.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R. E. Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 11, n. 8, p. 1755–66, 1996.

CAPECE, A.; VASIEVA, O.; MEHER, S.; ALFIREVIC, Z.; ALFIREVIC, A. Pathway Analysis of Genetic Factors Associated with Spontaneous Preterm Birth and Pre-Labor Preterm Rupture of Membranes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108578, 2014.

CARDOZO, D. M.; GUELSIN, G. A.; CLEMENTINO, S. L.; et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 651–656, 2009.

CARVALHO, E. G.; UTIYAMA, S. R. R.; KOTZE, L. M. S.; REASON, I. T. M. Lectina ligante de manose (MBL): características biológicas e associação com doenças and diseases association. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 30, n. 5, p. 187–193, 2007.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CHAN, R. L. Biochemical Markers of Spontaneous Preterm Birth in Asymptomatic Women. **BioMed research international**, v. 2014, p. 164081, 2014. Hindawi Publishing Corporation. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3914291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 26/2/2014.

CRIDER, K. S.; WHITEHEAD, N.; BUUS, R. M. Genetic variation associated with preterm birth: a HuGE review. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 7, n. 9, p. 593–604, 2005.

DIZON-TOWNSON, D. S. Preterm labour and delivery: a genetic predisposition. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 15 Suppl 2, p. 57–62, 2001.

DZWONEK, A. B.; NETH, O. W.; THIÉBAUT, R.; et al. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. **Pediatric research**, v. 63, n. 6, p. 680–5, 2008.

EHRENBERG, H. M.; IAMS, J. D.; GOLDENBERG, R. L.; et al. Maternal obesity, uterine activity, and the risk of spontaneous preterm birth. **Obstetrics and gynecology**, v. 113, n. 1, p. 48–52, 2009.

ENQUOBAHRIE, D. A.; WILLIAMS, M. A.; QIU, C.; et al. Early pregnancy peripheral blood gene expression and risk of preterm delivery: a nested case control study. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 9, p. 56, 2009.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. **Rotura Prematura das Membranas Projeto Diretrizes**, 2008.

FERRARONI, N. R. **Níveis séricos e polimorfismos gênicos da Lectina Ligadora de Manose (MBL) e da Serino Protease Associada à MBL (MASP)-2 em uma amostra da população brasileira**, 2010. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.; BISPO, A. Infecção do trato urinário na gravidez: aspectos atuais. **Femina**, v. 37, n. 165-171, 2009.

FISCELLA, K. Race, genes and preterm delivery. **Journal of the National Medical Association**, v. 97, n. 11, p. 1516–26, 2005.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265–271, 2000.

FRAKKING, F. N. J.; BROUWER, N.; ZWEERS, D.; et al. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. **Clinical and experimental immunology**, v. 145, n. 1, p. 5–12, 2006.

FRASER, D. A; ARORA, M.; BOHLSON, S. S.; LOZANO, E.; TENNER, A. J. Generation of inhibitory NFkappaB complexes and phosphorylated cAMP response element-binding protein correlates with the anti-inflammatory activity of complement protein C1q in human monocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 10, p. 7360–7, 2007.

GARRED, P. Mannose-binding lectin deficiency—revisited. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 2-4, p. 73–84, 2003.

GEIJN, F. E. VAN DE; DOLHAIN, R. J. E. M.; RIJS, W. VAN; et al. Mannose-binding lectin genotypes are associated with shorter gestational age. An evolutionary advantage of low MBL production genotypes? **Molecular Immunology**, v. 45, p. 1514–1518, 2008.

GEIJN, F. E. VAN DE; ROOS, A; MAN, Y. A DE; et al. Mannose-binding lectin levels during pregnancy: a longitudinal study. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 362–371, 2007.

GIBSON, C. S.; MACLENNAN, A. H.; DEKKER, G. A.; et al. Candidate genes and cerebral palsy: a population-based study. **Pediatrics**, v. 122, n. 5, p. 1079–85, 2008.

GIBSON, C. S.; MACLENNAN, A. H.; DEKKER, G. A.; et al. Genetic polymorphisms and spontaneous preterm birth. **Obstetrics and gynecology**, v. 109, n. 2 Pt 1, p. 384–91, 2007.

GIBSON, C. S.; MACLENNAN, A. H.; GOLDWATER, P. N.; et al. Mannose-binding lectin haplotypes may be associated with cerebral palsy only after perinatal viral exposure. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 198, n. 5, p. 509.e1–8, 2008.

GIBSON, C. S.; MACLENNAN, A. H.; HAAN, E. A.; PRIEST, K.; DEKKER, G. A. Fetal MBL2 haplotypes combined with viral exposure are associated with adverse pregnancy outcomes. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 24, n. 6, p. 847–54, 2011.

GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F.; IAMS, J. D.; ROMERO, R. Epidemiology and causes of preterm birth. **Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 75–84, 2008.

GRACIE, S.; PENNELL, C.; EKMAN-ORDEBERG, G.; et al. An integrated systems biology approach to the study of preterm birth using “-omic” technology--a guideline for research. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 11, n. 1, p. 71, 2011. BioMed Central Ltd.

HOLST, D.; GARNIER, Y. Preterm birth and inflammation-The role of genetic polymorphisms. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 141, n. 1, p. 3–9, 2008.

IAMS, J. D.; ROMERO, R.; CULHANE, J. F.; GOLDENBERG, R. L. Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. **Lancet**, v. 371, n. 9607, p. 164–75, 2008.

IP, M.; PEYMAN, E.; LOHSOONTHORN, V.; WILLIAMS, M. A. A case-control study of preterm delivery risk factors according to clinical subtypes and severity. **The journal of obstetrics and gynaecology research**, v. 36, n. 1, p. 34–44, 2010.

IP, W. K.; TO, Y. F.; CHENG, S. K.; LAU, Y. L. Serum mannose-binding lectin levels and mbl2 gene polymorphisms in different age and gender groups of southern Chinese adults. **Scandinavian journal of immunology**, v. 59, n. 3, p. 310–4, 2004.

ISRAËLS, J.; FRAKKING, F. N. J.; KREMER, L. C. M.; et al. Mannose-binding lectin and infection risk in newborns: a systematic review. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 95, n. 6, p. F452–61, 2010.

KALIL, K. F. **POLIMORFISMO DO ÉXON 1 DO GENE DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL) EM INDIVÍDUOS EXPOSTOS À MALÁRIA CAUSADA POR Plasmodium vivax**, 2006. Universidade Federal do Pará.

KAMADA, A. J.; PONTILLO, A.; GUIMARÃES, R. L.; et al. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 960–963, 2014.

KOROGLU, O. A.; ONAY, H.; ERDEMIR, G.; et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism and early neonatal outcome in preterm infants. **Neonatology**, v. 98, n. 4, p. 305–12, 2010.

KUSANOVIC, J. P.; ROMERO, R.; JODICKE, C.; et al. Amniotic fluid soluble human leukocyte antigen-G in term and preterm parturition, and intra-amniotic infection/inflammation. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 22, n. 12, p. 1151–66, 2009.

KUZMANIĆ ŠAMIJA, R.; PRIMORAC, D.; REŠIĆ, B.; et al. Association of NOS3 tag polymorphisms with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Croatian Medical Journal**, v. 52, n. 3, p. 396–402, 2011.

LAU, Y. L.; LAU, C. S.; CHAN, S. Y.; KARLBERG, J.; TURNER, M. W. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 706–8, 1996.

LEDINGHAM, M. A.; THOMSON, A. J.; YOUNG, A.; et al. Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. **Mol Hum Reprod**, v. 6, n. 11, p. 1041–1048, 2000.

LEWIS, C. M. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. **Briefings in bioinformatics**, v. 3, n. 2, p. 146–153, 2002.

LIPSCOMBE, R. J.; BEATTY, D. W.; GANCZAKOWSKI, M.; et al. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 4, n. 1, p. 13–9, 1996.

LOCKWOOD, C. J.; KUCZYNSKI, E. Risk stratification and pathological mechanisms in preterm delivery. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 15 Suppl 2, p. 78–89, 2001.

MACHADO, J. R.; ROCHA, L. P.; BARRILARI, S. E. G.; et al. Influência das intercorrências maternas e fetais nos diferentes graus de corioamnionite. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 34, n. 4, p. 153–7, 2012.

MADSEN, H. O.; GARRED, P.; KURTZHALS, J. A. L.; et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, v. 40, p. 37–44, 1994.

MADSEN, H. O.; VIDEM, V.; SVEJGAARD, A.; SVENNEVIG, J. L.; GARRED, P. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. **Lancet**, v. 352, n. 9132, p. 959–60, 1998.

- MARG, A.; MENDOZA, Y. A. L. A.; CAR, U. I. S. F.; AJ, V.; CARRIZOS, A. Hemorragia intraventricular en el neonato prematuro. **Iatreia**, v. 18, n. 1, p. 71–77, 2005.
- MAUL, H.; LONGO, M.; SAADE, G. R.; GARFIELD, R. E. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. **Current pharmaceutical design**, v. 9, p. 359–380, 2003.
- MELO, N. R. DE. Manual de Gestação de Alto Risco. **Febrasgo**, p. 1–220, 2011.
- MIGONE, A.; EMANUEL, I.; MUELLER, B.; DALING, J.; LITTLE, R. E. Gestational duration and birthweight in white, black and mixed-race babies. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 5, n. 4, p. 378–91, 1991.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MULLIGHAN, C. G.; MARSHALL, S. E.; WELSH, K. I. Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency. **Scandinavian journal of immunology**, v. 51, n. 2, p. 111–22, 2000.
- MUSSI-PINHATA, M. M.; REGO, M. A C. Particularidades imunológicas do pré-termo extremo : um desafio para a prevenção da sepse hospitalar Immunological peculiarities of extremely preterm infants : a challenge for the prevention of nosocomial sepsis. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 1 (suplemento), p. 59–68, 2005.
- MYKING, S.; MYHRE, R.; GJESSING, H. K.; et al. Candidate gene analysis of spontaneous preterm delivery: new insights from re-analysis of a case-control study using case-parent triads and control-mother dyads. **BMC medical genetics**, v. 12, n. 1, p. 174, 2011. BioMed Central Ltd.
- NELSON, K. B.; DAMBROSIA, J. M.; IOVANNISCI, D. M.; et al. Genetic polymorphisms and cerebral palsy in very preterm infants. **Pediatric research**, v. 57, n. 4, p. 494–9, 2005.
- NORMAN, J. E.; THOMPSON, A J.; TELFER, J. F.; et al. Myometrial constitutive nitric oxide synthase expression is increased during human pregnancy. **Molecular human reproduction**, v. 5, n. 2, p. 175–81, 1999.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Movimento**, v. 33, p. 10–13, 2004.
- PASSINI, R.; CECATTI, J. G.; LAJOS, G. J.; et al. Brazilian Multicentre Study on Preterm Birth (EMIP): Prevalence and Factors Associated with Spontaneous Preterm Birth. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109069, 2014.
- PENNELL, C. E.; JACOBSSON, B.; WILLIAMS, S. M.; et al. Genetic epidemiologic studies of preterm birth: guidelines for research. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 196, n. 2, p. 107–18, 2007.

PEREIRA, A. P. E.; LEAL, M. D. C.; GAMA, S. G. N. DA; et al. Determinação da idade gestacional com base em informações do estudo Nascer no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 59–70, 2014.

PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSEN, L.; et al. Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. **Molecular immunology**, v. 37, n. 14, p. 803–11, 2000.

PISCOYA, M. D. B. V.; XIMENES, R. A. A.; SILVA, G. M.; JAMELLI, S. R.; COUTINHO, S. B. Maternal periodontitis as a risk factor for prematurity. **Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society**, v. 54, n. 1, p. 68–75, 2012.

POGGI, C.; GIUSTI, B.; GOZZINI, E.; et al. Genetic Contributions to the Development of Complications in Preterm Newborns. **Plos One**, v. 10, p. e0131741, 2015.

RAJAGOPALAN, R.; SALVI, V. P.; JENSENIUS, J. C.; RAWAL, N. New insights on the structural/functional properties of recombinant human mannan-binding lectin and its variants. **Immunology letters**, v. 123, n. 2, p. 114–24, 2009.

ROCHA, A. P. DA; MAGALHÃES, P. K. R.; MAIA, A. L.; MACIEL, L. M. Z. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p. 723–730, 2007.

ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; et al. The role of inflammation and infection in preterm birth. **Seminars in reproductive medicine**, v. 25, n. 1, p. 21–39, 2007.

ROMERO, R.; FRIEL, L. A.; VELEZ EDWARDS, D. R.; et al. A genetic association study of maternal and fetal candidate genes that predispose to preterm prelabor rupture of membranes (PROM). **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 203, n. 4, p. 361.e1–361.e30, 2010. Elsevier Inc.

ROMERO, R.; GOMEZ, R.; GHEZZI, F.; et al. A fetal systemic inflammatory response is followed by the spontaneous onset of preterm parturition. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 179, n. 1, p. 186–93, 1998.

ROMERO, R.; VELEZ EDWARDS, D. R.; KUSANOVIC, J. P.; HASSAN, S. S.; MAZAKI-TOVI, S.; VAISBUCH, E.; KIM, C. J.; CHAIWORAPONGSA, T.; PEARCE, B. D.; FRIEL, L. A.; et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 202, n. 5, p. 431.e1–34, 2010. Elsevier Inc.

ROMERO, R.; VELEZ EDWARDS, D. R.; KUSANOVIC, J. P.; HASSAN, S. S.; MAZAKI-TOVI, S.; VAISBUCH, E.; KIM, C. J.; CHAIWORAPONGSA, T.; PEARCE, B. D.; FRIEL, L. A.; et al. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 202, n. 5, p. 431.e1–34, 2010.

SANTOS, G. H. N.; MARTINS, M. D. G.; SOUSA, M. D. S.; BATALHA, S. D. J. C. Impacto da idade materna sobre os resultados perinatais e via de parto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 31, p. 326–34, 2009.

SANTOS, R. S.; ARAÚJO, A. P. Q. C.; PORTO, M. A. S. Early diagnosis of abnormal development of preterm newborns: assessment instruments. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4, p. 289–299, 2008.

SAÚDE, M. DA. DATASUS. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 15/10/2015.

SAVASAN, Z. A.; ROMERO, R.; CHAIWORAPONGSA, T.; et al. Evidence in support of a role for anti-angiogenic factors in preterm prelabor rupture of membranes. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 23, n. 8, p. 828–41, 2010.

SCUDIERO, O.; MONACO, M. L.; NIGRO, E.; et al. Mannose-binding lectin genetic analysis: Possible protective role of the HYPA haplotype in the development of recurrent urinary tract infections in men. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 19, p. 100–102, 2014. International Society for Infectious Diseases.

SHRESTHA, S.; DANGOL, S. S.; SHRESTHA, M.; SHRESTHA, R. P. B. Outcome of preterm babies and associated risk factors in a hospital. **JNMA; journal of the Nepal Medical Association**, v. 50, n. 180, p. 286–90, 2010.

SOUZA, N. C. M. LIMA, A. C. V. M. S. GALIARDO, H. E DE. Comportamento visual e perfil socioeconômico e demográfico de recém-nascidos prematuros da Maternidade do Hospital das Clínicas de Pernambuco - UFPE. **Arq Bras Oftalmol.**, v. 74, n. 1, p. 33–36, 2011.

STEINERT, J. R.; WYATT, A. W.; POSTON, L.; JACOB, R.; MANN, G. E. Preeclampsia is associated with altered Ca²⁺ regulation and NO production in human fetal venous endothelial cells. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 7, p. 721–3, 2002.

SULLIVAN, K. E.; WOOTEN, C.; GOLDMAN, D.; PETRI, M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**, v. 39, n. 12, p. 2046–51, 1996.

SUMIYA, M.; SUPER, M.; TABONA, P.; et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, v. 337, n. 8757, p. 1569–70, 1991.

TAKAHASHI, K.; IP, W. E.; MICHELOW, I. C.; EZEKOWITZ, R. A. B. The mannose-binding lectin: a prototypic pattern recognition molecule. **Current opinion in immunology**, v. 18, n. 1, p. 16–23, 2006.

THAN, N. G.; ROMERO, R.; EREZ, O.; et al. A role for mannose-binding lectin, a component of the innate immune system in pre-eclampsia. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 60, n. 4, p. 333–45, 2008.

THÉVENON, A. D.; LEKE, R. G. F.; SUGUITAN, A. L.; ZHOU, J. A.; TAYLOR, D. W. Genetic polymorphisms of mannose-binding lectin do not influence placental malaria but are associated with preterm deliveries. **Infection and immunity**, v. 77, n. 4, p. 1483–91, 2009.

TORLONI, M. R.; BETRÁN, A. P.; DAHER, S.; et al. Maternal BMI and preterm birth: a systematic review of the literature with meta-analysis. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 22, n. July, p. 957–970, 2009.

TÖRNBLOM, S. A.; MAUL, H.; KLIMAVICIUTE, A.; et al. mRNA expression and localization of bNOS, eNOS and iNOS in human cervix at preterm and term labour. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 3, p. 33, 2005.

TREVISIOL, C.; BONIOTTO, M.; GIGLIO, L.; et al. MBL2 polymorphisms screening in a regional Italian CF Center. **Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society**, v. 4, n. 3, p. 189–91, 2005.

TURNER, M. . The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 423–429, 2003.

UZUN, A.; DEWAN, A. T.; ISTRAIL, S.; PADBURY, J. F. Pathway-based genetic analysis of preterm birth. **Genomics**, v. 101, n. 3, p. 163–170, 2013. Elsevier Inc.

VANNEMREDDY, P.; NOTARIANNI, C.; YANAMANDRA, K.; NAPPER, D.; BOCCHINI, J. Is an endothelial nitric oxide synthase gene mutation a risk factor in the origin of intraventricular hemorrhage? **Neurosurgical focus**, v. 28, n. 1, p. E11, 2010.

VIANNA, P.; CHIES, J. A. B. **Imunoregulação da gestação: rumo ao sucesso**, 2009. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

VICTORA, C.; BARROS, F.; MATIJASEVICH, A.; SILVEIRA, M. **PESQUISA PARA ESTIMAR A PREVALÊNCIA DE NASCIMENTOS PRÉ-TERMO NO BRASIL E EXPLORAR POSSÍVEIS CAUSAS**, 2013. Pelotas: UFPEL. Disponível em: <http://www.unicef.org/brazil/pt/br_prematuridade_possiveis_causas.pdf>. .

WALLIS, R.; SHAW, J. M.; UITDEHAAG, J.; et al. Localization of the serine protease-binding sites in the collagen-like domain of mannose-binding protein: indirect effects of naturally occurring mutations on protease binding and activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 14, p. 14065–73, 2004.

WILCOX, A. J.; SKJAERVEN, R.; LIE, R. T. Familial patterns of preterm delivery: maternal and fetal contributions. **American journal of epidemiology**, v. 167, n. 4, p. 474–9, 2008.

WILDSCHUT, H. I.; LUMEY, L. H.; LUNT, P. W. Is preterm delivery genetically determined? **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 5, n. 4, p. 363–72, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 56, p. 247–253, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on optimal feeding of low birth-weight infants in low-and middle-income countries.** WHO Library, 2011. Disponível em: <(www.who.int)>. .

WROBLEWSKA-SENIUK, K.; NOWICKI, S.; BOUGUÉNEC, C. LE; NOWICKI, B.; YALLAMPALLI, C. Maternal/fetal mortality and fetal growth restriction: role of nitric oxide and virulence factors in intrauterine infection in rats. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 205, n. 1, p. 83.e1–7, 2011. Elsevier Inc.

YORK, T. P.; EAVES, L. J.; LICHTENSTEIN, P.; et al. Fetal and maternal genes' influence on gestational age in a quantitative genetic analysis of 244,000 swedish births. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 4, p. 543–550, 2013.

YORK, T. P.; EAVES, L. J.; NEALE, M. C.; STRAUSS, J. F. The contribution of genetic and environmental factors to the duration of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 210, n. May, p. 398–405, 2014.

YORK, T. P.; STRAUSS, J. F.; NEALE, M. C.; EAVES, L. J. Racial differences in genetic and environmental risk to preterm birth. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12391, 2010.

APÊNDICE – Formulários de coleta de dados socioeconômicos, demográficos e gestacionais.

Objetivo: Influência de polimorfismos funcionais nos genes *eNOS* e *ANGPT2* (ANGPT2) e *eNOS* sobre o parto prematuro espontâneo e morbidades neonatais associadas à prematuridade.

Grupos de estudo: mães que tiveram parto prematuro espontâneo e seus recém-nascidos, e o grupo de comparação composto por mães de recém-nascidos a termo e seus bebês.

Exclusões: mães que tiveram parto prematuro indicado em mães de neonatos gemelares, com má-formação ou infecções congênitas, como sífilis, HIV, HCV (hepatite C) e CMV (citomegalovirus).

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS DA PARTURIENTE E DO NEONATO

Setor: Obstetrícia/HC

Nome da mãe: _____

2 – Data da entrevista e coleta de sangue: ____/____/____

Endereço: _____

3- Nome da mãe: _____

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

4- Número do prontuário/obstetrícia: _____

5- Nome do RN: _____

6- Número do prontuário/neonatologia: _____

7- Endereço completo: _____

8- Fone da mãe: _____

\$ % & ' () * + , - . / : ; < = > ? @ [\] ^ _ { | } ~

9. Qual a sua idade?

10. Qual a sua altura (centímetros):

11. Qual o seu peso no final da gestação (Kg):

12. Ganho de peso na gestação (Kg): (quantos kilos você tinha antes da gestação?) _____

13. Você frequentou a escola? 1. Sim 0. Não

☐ ☐

14. Se frequentou, qual a última série que você completou? _____

00- Não frequentou a escola

15. Você sabe ler uma carta ou revista com facilidade?

0. Não () 1. Sim () 2. Com dificuldade ()

16. Você trabalhou durante a gestação?

0. Não trabalhou () 1. Sim, fora de casa ()

2. Apenas nos serviços do lar () 3. Fora de casa e no lar ()

17. Se trabalhou fora de casa, qual a sua ocupação? _____

00- Não trabalhou fora de casa.

18. Quantas pessoas moram na casa com você? (incluindo o bebê)

19. No mês passado, quanto ganhou cada pessoa que mora na sua casa e trabalha ou é aposentado / pensionista?

1ª pessoa: R\$ _____/mês

2ª pessoa: R\$ _____/mês

3ª pessoa: R\$ _____/mês

4ª pessoa: R\$ _____/mês

5ª pessoa: R\$ _____/mês

Total: R\$ _____/mês

20. Na sua opinião, sua cor ou raça é:

1. Branca () 2. Preta () 3. Amarela ()

4. Parda () 5. Indígena ()

21. Na minha opinião (entrevistador) a cor/raça dessa mãe é:

1. Branca () 2. Preta () 3. Amarela ()

4. Parda () 5. Indígena ()

22. Em que cidade nasceram seus pais? _____

23. Você e o pai desse bebê:

1. Vivem juntos como marido e mulher ()

0. Não vivem juntos como marido e mulher ()

24. Você se estressou durante a gravidez?

0. Não () 1. Sim () 2. Não sei ()

25. Se sim, quanto você diria que ficou estressada durante a gravidez?

1. Pouco 2. Muito 0. Não fiquei estressada

26. Se sim, quanto você acha que o estresse prejudicou sua gravidez?

1. Pouco 2. Muito 3. Não prejudicou
27. Você teve alguma doença durante a gestação?
0. Não 1. Sim 2. Não sei
28. Se sim, qual doença? _____
8. Não teve doença ()
29. Você usou remédios na gestação? 0. Não () 1. Sim ()
30. Se sim, qual remédio?
8. Não usou remédio ()
31. Você estava com quantos meses de gestação quando usou?
32. Por quanto tempo usou esse remédio?
33. Você já teve um parto prematuro antes? 1. Sim () 0. Não ()
34. Você já abortou alguma vez? 1. Sim 0. Não
35. Se Sim, quantos abortos você teve antes? _____
8. Nunca abortou ()
36. Quantos filhos você já pariu? _____
00- Este é o 1º. filho
37. Quantos meses se passaram da última gestação até essa?
(anotar número) _____ 00- Este é o 1º. filho
38. Você tem diabetes? 0. Não () 1. Sim () 2. Não sei ()
39. Se sim, quando começou a ter diabetes?
1. Antes dessa gestação () 2. Durante essa gestação ()
8. Não tem diabetes ()
40. Você tem pressão alta? 0. Não () 1. Sim () 2. Não sei ()
41. Caso sim, quando começou a ter pressão alta?
1. Antes dessa gestação () 2. Durante essa gestação ()
8. Não tem pressão alta ()
42. Você tem asma? 1. Sim () 2. Não () 3. Não sei ()
43. Se sim, teve alguma crise de asma durante a gravidez?
1. Sim () 2. Não () 8. Não tem asma ()
44. Se sim, em que período da gestação você teve crise asmática?
1. Só nos 03 primeiros meses () 2. Só no 2º trimestre ()
3. Só nos últimos meses () 4. Desde o início até o final ()
5. Da metade em diante () 8. Não tem asma ()

45. Você fumou durante a gestação? 1. Sim () 2. Não ()
46. Se sim, quando estava grávida, você fumava quantos cigarros por dia? _____ 88- Não fumou ()
47. Se sim, em que período da gestação você fumou? _____
 1. Só nos 03 primeiro meses () 2. Só no 2º trimestre ()
 3. Só nos últimos meses () 4. Desde o início ()
 5. Da metade em diante () 8. Não fumou ()
48. No total, faz quanto tempo que você fuma? (anotar número em meses) _____ 00- não fuma
49. Você consumiu bebida alcoólica durante a gestação?
 1. Sim () 0. Não ()
50. Se sim, de que tipo?
 Cerveja 1. Sim () 0. Não ()
 Vinho 1. Sim () 0. Não ()
 Rum 1. Sim () 0. Não ()
 Whisky 1. Sim () 0. Não ()
 Champanhe 1. Sim () 0. Não ()
 Martini 1. Sim () 0. Não ()
 Conhaque 1. Sim () 0. Não ()
 Cachaça/Pitu 1. Sim () 0. Não ()
 Outro: _____
51. Se sim, quantas vezes na semana você bebia? _____
 88. Não bebeu
52. Em que período da gestação você bebia?
 1. Só nos 03 primeiro meses () 2. Só no 2º trimestre ()
 3. Só nos últimos meses () 4. Desde o início ()
 5. Da metade em diante () 8. Não bebeu ()
53. Você usou drogas durante a gestação? 1. Sim () 2. Não ()
54. Se sim, de que tipo?
 Maconha 1. Sim () 2. Não ()
 Loló 1. Sim () 2. Não ()
 Cocaína 1. Sim () 2. Não ()
 Craque 1. Sim () 2. Não ()
 Heroína 1. Sim () 2. Não ()
 Cola 1. Sim () 2. Não ()
 Êxtase 1. Sim () 2. Não ()
 Outro: _____
55. Na gestação, você usava drogas quantas vezes por semana?
 0- Não usava drogas
56. Em que período da gestação você usou drogas?

1. Só nos 03 primeiro meses () 2. Só no 2º trimestre ()
 3. Só nos últimos meses () 4. Desde o início ()
 5. Da metade em diante () 8. Não usou ()

57. No total, faz quanto tempo que você usa drogas? (anotar número em meses) _____ 0- Não usa drogas

58. Você fez pré-natal? 1. Sim () 0. Não ()

59. Se sim, em que mês de gestação você começou a fazer o pré-natal? _____

60. Se sim, quantas vezes foi à consulta de pré-natal? _____
 (anotar número) 88 - Não fez pré-natal

61. O que achou da assistência recebida nas sessões de pré-natal?
 1. Ótima () 2. Boa () 3. Mais ou menos () 4. Ruim ()

62. Você nasceu de parto prematuro? 1. Sim () 0. Não ()

63. Há outros casos de parto prematuro na família?
 1. Sim () 0. Não ()

64. Caso sim, quais membros da sua família nasceram prematuramente?
 1. Mãe () 2. Pai () 3. Irmãos () 4. Outros filhos seus ()
 5. Primos () 6. Tios () 7. Avós ()

65. Você foi ao dentista durante essa gestação?
 1. Sim () 0. Não ()

66. Se sim, você foi por que motivo?
 0. Não foi ao dentista ()
 1. Frouxidão nos dentes / hiper mobilidade ()
 2. Dor () 3. Outro: _____

& □ □□□ □□□ □□□ '□□ □□ □(□□□□ □□□□□□

67. Evidência de infecção na gestação:

Febre: 1. Sim () 0. Não ()

Taquicardia: 1. Sim () 0. Não ()

Outras: _____

68. Evidência de infecção no parto:

Febre: 1. Sim () 0. Não ()

Taquicardia: 1. Sim () 0. Não ()

Histopatologia placentária: 1. Sim () 0. Não ()

Outras: _____

69. Ruptura prematura das membranas: 1. Sim () 0. Não ()

70. Duração da ruptura até o parto (em minutos): _____
71. História de diabetes na gestação: 1. Sim () 0. Não ()
72. História de diabetes anterior à gestação: 1. Sim () 0. Não ()
73. Hipertensão gestacional: 1. Sim () 0. Não ()
74. Pré-eclâmpsia: 1. Sim () 0. Não ()
75. Incompetência istmo cervical: 1. Sim () 0. Não ()
76. Presença de anomalia uterina: 1. Sim () 0. Não ()
77. História de doença autoimune: 1. Sim () 0. Não ()
78. Se sim, qual doença? _____
0. Não tem doença autoimune
79. Uso de medicamentos durante a gestação: 1. Sim () 0. Não ()
80. Se sim, qual (quais)? _____

0. Não usou medicamentos na gestação
81. Se sim, em qual período da gestação (meses)? _____
0. Não usou medicamentos na gestação
82. Se sim, durante quantos dias? _____
0. Não usou medicamentos na gestação
83. História de doença periodontal na gestação: 1. Sim () 0. Não ()
84. Fez tratamento para essa doença: 1. Sim () 0. Não ()
85. Uso de medicamentos com esta finalidade: 1. Sim () 0. Não ()
8. Não teve doença periodontal na gestação
86. Se sim, quais? _____
8. Não teve doença periodontal na gestação ()
87. Número de consultas pré-natais: _____ 0. Não fez pré-natal
-
88. Hipótese diagnóstica da parturiente:

89. Bolsa rota: 1. Sim () 0. Não ()
90. Duração da bolsa rota em minutos: _____

) 00 0 000 000 000 '00 00 000 0 0 00

91. Data de nascimento: ____/____/____

92. Idade gestacional (semanas): _____

93. Sexo do recém-nascido: 1. Masculino () 2. Feminino ()

94. Peso do neonato ao nascer (gramas): _____

95. Apgar: 1º minuto: ____ 5º minuto: ____ 10º minuto: ____

96. Morbidades desenvolvidas até a alta hospitalar:

1. Hemorragia intracraniana () 2. Leucomalácia Periventricular ()

3. Sepsis precoce () 4. Sepsis tardia ()

5. Desconforto respiratório () 6. Retinopatia da prematuridade ()

7. Outra: _____ 8. Sem morbididades ()

9. Hipóxia () 10. Icterícia ()

97. Medicamentos utilizados até a alta hospitalar:

98. Uso de oxigenoterapia: 1. Sim () 0. Não ()

99. Se sim, de que tipo?

100. Se sim, por quanto tempo (em dias)?

101. Tempo até a alta hospitalar (em dias): _____

102. Peso do neonato na alta hospitalar (em gramas): _____

103. Diagnóstico inicial (no momento da entrada da UTI neo/berçário):

0

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência de polimorfismos funcionais nos genes mannose-binding lectin 2 (MBL2) e endothelial nitric oxide synthase (eNOS) sobre o parto prematuro espontâneo e morbidades neonatais associadas.

Pesquisador: Lícia Vasconcelos Carvalho da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05719112.1.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 166.364

Data da Relatoria: 11/12/2012

Apresentação do Projeto:

Será realizado um estudo clínico observacional com grupo de comparação, com caráter analítico, cuja coleta dos dados ocorrerá no período de 12 meses na maternidade e UTI neonatal ou alojamento conjunto do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

A população do estudo será representada por parturientes da maternidade do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e seus respectivos recém-nascidos.

A amostra será composta por uma estimativa de 250 parturientes que tiveram partos prematuros e seus respectivos recém-nascidos (RN), representando, de acordo com dados do Sistema de Informação de Nascidos Vivos (SISNAC), a média anual de partos prematuros que ocorreram na maternidade do referido hospital no período de 2008 a 2010.

Para cada mãe de RN pré-termo será selecionada a próxima mãe de recém-nascido a termo e seu filho, pareado pelo sexo do bebê, para compor o grupo de comparação.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é investigar a influência dos polimorfismos funcionais dos genes mannose-binding lectin 2 (MBL2) e endothelial nitric oxide

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepocs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



synthase (eNOS) de parturientes e dos neonatos sobre o parto prematuro espontâneo e sobre as morbidades associadas à prematuridade

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios citados podem ser aceitos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Embora se admita uma etiologia multifatorial para a prematuridade, os eventos fisiopatogênicos que conduzem e elevam o risco do parto prematuro

estão pouco esclarecidos. Atualmente, a identificação de polimorfismos em genes envolvidos na modulação da resposta inflamatória de gestantes e

no controle do tônus vascular e do fluxo sanguíneo nos órgãos reprodutores femininos torna-se uma crescente linha de investigação de uma

possível susceptibilidade materna à prematuridade. Dessa forma, o principal objetivo deste estudo é investigar a influência de polimorfismos nos

genes mannose-binding lectin 2 (MBL2) e endothelial nitric oxide synthase (e-NOS) sobre o parto prematuro espontâneo e as morbidades que

acometem os recém-nascidos pré-termo. Para isso, será realizado um estudo clínico com grupo de comparação, cuja coleta de dados ocorrerá no

período de 12 meses no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-PE).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão de acordo e considerados adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



RECIFE, 09 de Dezembro de 2012

Assinador por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)