

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Curso de Biomedicina

Trabalho de Conclusão de Curso

**IMUNORREGULAÇÃO DA PRÉ-ECLÂMPSIA: PAPEL DA MOLÉCULA
HLA-G E FUNÇÕES CELULARES EFETORAS NA GESTAÇÃO**

Aluno de Graduação: Andressa Grazziotin Mondadori

Orientador: José Artur Bogo Chies, PhD

Co-orientador: Priscila Vianna, PhD

Julho de 2010
Porto Alegre, RS
Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM BIOMEDICINA

**IMUNORREGULAÇÃO DA PRÉ-ECLÂMPSIA: PAPEL DA MOLÉCULA
HLA-G E FUNÇÕES CELULARES EFETORAS NA GESTAÇÃO**

ANDRESSA GRAZZIOTIN MONDADORI

Orientador: JOSÉ ARTUR BOGO CHIES, PhD
Co-orientador: PRISCILA VIANNA, PhD

Julho de 2010
Porto Alegre, RS

Brasil

Agradecimentos

Ao Profº Zeca pela oportunidade e confiança;

À Pri, minha co-orientadora e agora amiga, por todo apoio, paciência, confiança, ajuda, ensinamentos, carinho, parceria e por ter tornado esses seis meses um período de muitas alegrias;

Ao pessoal imunogenético pela parceria, auxílio, e por ter tornado meus dias no lab mais alegres e divertidos;

Ao pessoal do laboratório de micologia médica da UFRGS pelos ensinamentos, companhia e carinho;

À Universidade por conceder todos os elementos necessários à minha formação;

À Nani e Káren, amigas mais que especiais, por todos os momentos compartilhados, pelo apoio, compreensão, confiança, carinho, ombro amigo e pela linda amizade construída nesses quatro anos;

À Mila pelo carinho e por ter me apresentado à Pri;

Aos queridíssimos Daniel, Susana, Carla, Cícero, Gabriel e Marina por terem me proporcionado momentos de muita alegria, amizade e companheirismo;

À grande e inesquecível 4ª turma da biomedicina por tornar esses quatro anos muito mais divertidos;

À Nessa e Carol, minhas melhores e mais antigas amigas, por tudo o que sempre fizeram por mim, pelas palavras de conforto, por me acompanharem nessa jornada e me incentivarem sempre a seguir em frente, pelo carinho e compreensão em todos os momentos da minha vida;

À Gabi, Carlos e Mailen pelo grande carinho e apoio;

Ao Martín, meu namorado e melhor amigo, que mesmo longe consegue se fazer presente, agradeço por tornar minha vida cada dia mais feliz, por estar sempre ao meu lado me ajudando a vencer os obstáculos, pela paciência e compreensão, pelo imenso carinho e amor;

E por último e mais importante, à minha querida família: mãe (Fátima), pai (Ronal), mano (Maurício) e mana (Giana) por me apoiarem e me incentivarem sempre, por estarem comigo em todos os momentos, por me auxiliarem a seguir em frente, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela dedicação de cada um de vocês, pelo exemplo de vida que cada um passa para mim, pelo amor incondicional.

Dedicatória

*Dedico este trabalho a todas as pessoas
que contribuíram para a minha formação,
em especial à minha família.*

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
IMUNORREGULAÇÃO DA GESTAÇÃO.....	8
MOLÉCULA HLA-G.....	10
<i>FUNÇÕES DA MOLÉCULA HLA-G.....</i>	<i>11</i>
<i>GENE HLA-G E POLIMORFISMOS.....</i>	<i>12</i>
PRÉ-ECLÂMPsia.....	16
CÉLULAS T REGULATÓRIAS CD4+CD25 ^{high+} Foxp3+	18
GLICOCORTICÓIDES E GESTAÇÃO.....	20
GESTAÇÃO E DESORDENS DE HUMOR.....	21
GLICOCORTICÓIDES E O DESENVOLVIMENTO DA PRÉ ECLÂMPsia.....	23
OBJETIVOS.....	25
TRABALHO EXPERIMENTAL.....	26
<i>RESUMO.....</i>	<i>27</i>
<i>INTRODUÇÃO.....</i>	<i>28</i>
METODOLOGIA.....	33
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
TABELAS E FIGURAS.....	58
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	67
BIBLIOGRAFIA ADICIONAL	70
ANEXOS.....	79
ANEXO 1.....	80
<i>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</i>	
ANEXO 2.....	82
<i>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</i>	
ANEXO 3.....	84
<i>NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DA REVISTA “AMERICAN JOURNAL OF REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY”</i>	

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula apresentadora de antígenos
pb – pares de bases
CD – “cluster of differentiation”
Cy – Cychrome
DNA – “Deoxyribonucleic acid”
HLA-A – Antígeno Leucocitário Humano do tipo A
HLA-B – Antígeno Leucocitário Humano do tipo B
HLA-C – Antígeno Leucocitário Humano do tipo C
HLA-E – Antígeno Leucocitário Humano do tipo E
HLA-G - Antígeno Leucocitário Humano do tipo G
IFN- γ - Interferon gama
IL-10 – Interleucina dez
IL-12 – Interleucina doze
IL-4 – Interleucina quatro
IL-5 – Interleucina cinco
IL-6 – Interleucina seis
ILT – “Immunoglobulin like transcript”
KIR2DL4 – ‘killer cell immunoglobulin-like receptor DL4’
LIF- Fator inibitório de leucemia
LT – Linfócito T
MEM-G9 – anticorpo usado para detecção de HLA-G de superfície
MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA – RNA mensageiro
miRNA – microRNA
NK – Célula “natural killer”
PE – Pre-eclampsia
Pha - Fitohemaglutinina
PBS – Tampão fosfato salina
RNA – Ácido ribonucléico
TGF- β - Fator de crescimento tumoral beta
TH1 – Células T auxiliares do tipo 1
TH2 – Células T auxiliares do tipo 2
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
Treg – Células T regulatórias
uNK – Célula “Natural Killer” uterina

RESUMO

A evolução da gestação, o nascimento do concepto e a produção de leite para alimentá-lo constituem uma sequência natural e bem planejada para acolher um novo ser. O sistema imune materno está em íntimo contato com o feto, que pode ser comparado a um aloenxerto, pois possui 50% de material genético paterno. Em 1953, o cientista e prêmio Nobel Peter Medawar foi o primeiro a formular o conceito de que o embrião/feto representa um transplante para o sistema imune materno, estando vulnerável à rejeição ou tolerância imunológica. Portanto, como o feto não é rejeitado pela mãe? A interação imunológica que ocorre ao longo da gestação é mantida até o período de amamentação. Neste trabalho, avaliamos alguns componentes do sistema imune que variam durante a gestação, nos focando nos mecanismos que regulam o desenvolvimento da pré-eclâmpsia (PE). Investigamos o papel da expressão protéica e de polimorfismos nos genes da molécula imunomodulatória HLA-G em gestantes, assim como o balanço no perfil de ativação celular na gestação de sucesso ou complicada por PE. Ainda, discutimos o papel imunossupressor da subpopulação de células T regulatórias, bem como a frequência de células “natural killer” (NK) na imunorregulação da gestação e desenvolvimento da PE. Analisamos também como o perfil de proliferação celular e resistência a glicocorticóides varia em gestantes com ou sem PE. Observamos que as variantes alélicas de HLA-G avaliadas neste estudo, não estão relacionadas ao desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Porém, gestantes com PE apresentam perfil de resistência a ação de glicocorticóides e frequências de expressão de superfície de HLA-G reduzidas, além de um perfil de proliferação basal elevado em relação a gestantes sem complicações gestacionais.

INTRODUÇÃO

O sistema imunológico desempenha um importante papel protetor ao nosso organismo. É por meio dele que distinguimos o próprio e o não-próprio e nos defendemos de inúmeros patógenos. Dependendo da síntese de citocinas disparada fisiologicamente ou pelo desafio antigênico, o perfil de citocinas produzido pelas células TCD4+ auxiliares encontradas no organismo pode ser principalmente do tipo T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2). Em princípio, a população de linfócitos Th1 estimula tanto a resposta celular quanto a humoral, devido às citocinas liberadas por esse tipo de célula, como IFN- γ e IL-2, que agem favorecendo as funções celulares como a proliferação celular, fagocitose e citotoxicidade. Ainda, as células Th1 regulam a resposta Th2. Os linfócitos Th2, por sua vez, estão mais envolvidos na ativação de resposta humoral, já que sua população celular secreta citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, além de regular a resposta Th1 (Abbas e Lichtman, 2005). Dois outros tipos celulares estão ativamente envolvidos na regulação das respostas imunes: as células Th17 e células T regulatórias (Treg). A subpopulação Th17 secreta citocinas como IL-17, IL-22 e TNF- α com ação pró-inflamatória, agindo na defesa do hospedeiro contra bactérias extracelulares, no recrutamento de neutrófilos e desempenhando papel fundamental na patogênese das doenças autoimunes (Lafdil, Miller *et al.*, 2010). Já as células Treg agem na produção de citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e o TGF- β (Sakaguchi, Wing, Miyara, 2007). As células T regulatórias são hoje consideradas como os principais mediadores da tolerância periférica (Vignali, Collison, Workman, 2008). Em humanos, IL-10 é uma citocina chave na desativação das funções efetoras de macrófagos e sua produção não é restrita aos tipos celulares Th2 ou Th1, exercendo uma atividade imunorregulatória juntamente com TGF- β . (Sornasse, Larenas *et al.*, 1996; Aoki, Borchers *et al.*, 2005). As subpopulações Th1 e Th2 se regulam mutuamente, sendo que a produção de IL-10 inibe o desenvolvimento e atividade das células Th1, enquanto estas são capazes de inibir o desenvolvimento de subpopulações Th2 a partir da produção de IFN- γ (Gajewski e Fitch, 1988; Morel e Oriss, 1998). Este controle mútuo é de importância crucial para o estabelecimento, manutenção e regulação das respostas imunes. O balanço do perfil Th1/Th2 está relacionado com inúmeros processos patológicos e naturais, como as doenças autoimunes (Liblau,

Singer *et al.*, 1995; Sospedra e Martin, 2005) e a gestação (Piccinni, Beloni *et al.*, 1998; Wilczyn'ski, 2005).

IMUNORREGULAÇÃO DA GESTAÇÃO

Durante o período gestacional, o corpo da mulher sofre inúmeras alterações físicas, endócrinas, psicológicas, além de imunológicas, focando o processo de aceitação e desenvolvimento do feto semi-alogênico. Isso porque o material genético fetal é oriundo 50% do pai e 50% da mãe, o que confere ao embrião/feto propriedades alogênicas semelhantes a de um enxerto. Como o nosso sistema imune é capaz de reconhecer o não-próprio induzindo uma resposta contra esse imunógeno no intuito de eliminá-lo, para que o organismo da mãe não rejeite o feto, a presença de um ambiente imunologicamente tolerante é um fator imprescindível. O primeiro estudo a propor a possibilidade de um ambiente fetal imunologicamente tolerante data de 1953, quando Peter Medawar – prêmio Nobel de fisiologia/medicina em 1960 – formulou uma teoria a partir de três observações: (1) a separação física existente entre tecidos maternos e fetais; (2) a imaturidade antigênica do sistema imune fetal e (3) a “preguiça” imunológica do sistema imune materno (Medawar, 1953). Adicionalmente a essa condição semi-alogênica fetal, no início da gravidez há a ocorrência de uma intensa proliferação celular – desenvolvimento do concepto e placentação –, assemelhando-se a uma situação tumoral. Contudo, o organismo materno normalmente não desencadeia uma resposta imune a fim de bloquear essa proliferação, como seria verificado em situações patológicas (tumoriais). Assim, uma vez que mãe e embrião/feto são dois seres geneticamente diferentes – cada um possuindo seu próprio sistema de defesa e material genético particular – e que estão em íntimo contato, muitos mecanismos materno-fetais são necessários para a realização desta imunomodulação. Dentre esses fatores estão a influência hormonal sobre o sistema imune da mãe (Piccinni, Giudizi *et al.*, 1995; Probhala e Wira, 1995; Szekeres-Bartho, Faust *et al.*, 1996; Szekeres-Bartho, Halasz, Palkovics, 2009), a mudança no perfil de produção de citocinas para o tipo Th2 (Lin, Mosmann *et al.*, 1993; Marzi, Vigano *et al.*, 1996; Wilczyn'ski, 2005), o papel das células dendríticas sobre a remodelação da decídua (Pollard, 2008), a importante presença de células T regulatórias (Aluvihare, Kallikourdis, Betz, 2004; Saito, Sasaki, Sakai, 2005), a depleção local de triptofano inibindo a proliferação de células T (Munn, Zhou *et al.*, 1998), a expressão do fator inibitório de leucemia (“Leukemia Inhibitory Factor” -

LIF) (Piccinni, Beloni *et al.*, 1998), além da determinante ação imunossupressora da molécula HLA-G (Hunt, Petroff *et al.*, 2005; Hviid, 2006). Qualquer alteração nos fatores necessários para a imunomodulação na gestação (citados anteriormente) pode levar a um desequilíbrio na homeostase imunológica, acarretando, muitas vezes, o insucesso gestacional através da rejeição do concepto.

O aborto espontâneo – perda de uma gravidez sem intervenção externa antes da 20ª semana – afeta de 15 a 20% das gestações reconhecidas (Griebel, Halvorsen *et al.*, 2005), ocorrendo, em sua maioria (50 a 60%), no primeiro mês gestacional (Bulletti, Flamigni, Giacomucci, 1996). Wilcox e colaboradores verificaram que a taxa de perda espontânea do feto aumenta para 31% quando se analisa as concentrações urinárias de gonadotrofina coriônica humana (“human Chorionic Gonadotropin” - hCG), a partir de um estudo acompanhando mulheres que tinham a intenção de engravidar (Wilcox, Weinberg *et al.*, 1988). Então, mesmo que o aborto espontâneo esteja presente reconhecidamente em 15-31% das gestações, a taxa, na realidade, pode ser elevada chegando a 60-78%, quando se considera os abortos que ocorrem no primeiro mês de concepção, já que, muitas vezes, há falta de conhecimento da gestação em mulheres nesse período (Bulletti, Flamigni, Giacomucci, 1996). Uma das principais causas de perda fetal durante a gestação é a malformação congênita - defeito na formação/estrutura de algum órgão ou de um conjunto de órgãos do feto levando a uma anomalia morfológica estrutural de um órgão ou de todo o organismo, causada por fatores genéticos, ambientais ou mistos (Opas, 1984). Aproximadamente 60-70% da ocorrência de abortos espontâneos é devida a anomalias cromossômicas (Philipp T, Philipp K *et al.*, 2003). Outras importantes causas de abortos além das malformações congênitas são as infecções (ex: toxoplasmose), doenças autoimunes, doenças gestacionais – pré-eclâmpsia, diabetes gestacional – e doenças cardíacas congênitas (Trogstad, Magnus *et al.*, 2008; Gill, O'brien *et al.*, 2009; Rahangdale, 2009; Sperber, Hom *et al.*, 2009). Por mais que existam muitas disfunções que levam a perda do embrião/feto, ainda cerca de 30-50% dos abortos decorrem de causa desconhecida (Bulletti, Flamigni, Giacomucci *et al.*, 1996). A pré-eclâmpsia, patologia gestacional que afeta somente humanos, é uma das disfunções gestacionais mais frequentes (acometendo 3-5% das gestações) e que pode levar ao óbito tanto da mãe quanto do filho. É uma doença multisistêmica, caracterizada clinicamente por alta pressão arterial e proteinúria durante a gravidez (manifestações maternas) e/ou restrição do

crescimento fetal, redução do líquido amniótico e oxigenação anormal (síndrome fetal). Porém, ainda não se conhece claramente todos os fatores que podem levar a essa disfunção (Robillard, 2002; Dekker e Robillard, 2007). Devido a esses motivos, é uma doença que tem atraído interesse dos pesquisadores da área de reprodução há muito tempo.

Têm-se visto na literatura, muitos estudos abordando os aspectos imunológicos envolvidos na gestação, a fim de se buscar uma melhor compreensão dos processos que levam a uma gestação bem-sucedida ou ao aparecimento de disfunções da gravidez – como a pré-eclâmpsia – relacionadas ao sistema imune (Aagaard-Tillery, Silver, Dalton, 2006; Trowsdale e Betz, 2006; Guleria e Sayegh, 2007; Moffett e Hiby, 2007; Sarafana, Coelho *et al.*, 2007). Nesses processos imunológicos que ocorrem durante o período gestacional, muitas são as células, moléculas e mecanismos imunomoduladores envolvidos na formação de uma extensa e complexa rede de interações imunológicas.

MOLÉCULA HLA-G

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G, do inglês “Human leukocyte antigen G”) é uma molécula HLA de classe I não clássica, que foi descoberta há 20 anos, quando verificou-se sua presença na placenta. A partir daí, inúmeros estudos começaram a ser realizados para entender o seu papel e conhecer melhor sua distribuição tecidual, seu gene e suas funções. Como é expressa principalmente na interface física materno-fetal, viu-se que a molécula HLA-G pode desempenhar um papel imunomodulador para a manutenção de um ambiente de tolerância imunológica na região de contato entre mãe e feto. Apesar de haver um número crescente de publicações, ainda não há consenso sobre muitos aspectos dessa molécula, incluindo a sua distribuição nos tecidos e ligação aos receptores. O gene de HLA-G faz parte do complexo de histocompatibilidade principal, sendo um MHC de classe Ib não clássico, constituído por 3 domínios associados não-covalentemente a uma cadeia de microglobulina $\beta 2$. Diferentemente das MHC-I clássicas, HLA-G apresenta baixo polimorfismo, distribuição tecidual restrita e apenas 7 isoformas protéicas (Apps, Gardner, Moffett, 2008). Esta molécula é expressa em altos níveis na região materno-fetal, porém apresenta uma expressão protéica tecido-restrita tanto em tecidos embrionários, quanto em adultos. Nos tecidos embrionários, está presente no ovo fertilizado, no citotrofoblasto (Kovats, Main *et al.*, 1990) e, durante o

primeiro trimestre de gestação, na membrana amniótica e nas células endoteliais dos vasos do córion. Já nos adultos, sua expressão é encontrada na córnea (Le Discorde, Moreau *et al.*, 2003), nos eritroblastos, nos monócitos do sangue periférico (Alegre Díaz-Lagares *et al.*, 2007), nas células epiteliais tímicas (Crisa, McMaster *et al.*, 1997) e nos linfócitos T CD4+ e CD8+ (Le Rond, Le Maoult *et al.*, 2004; Feger, Tolosa *et al.*, 2007). A molécula HLA-G também pode ser encontrada na superfície de algumas células NK ativadas e de algumas células T efetoras, caracterizando uma nova via de imunossupressão da molécula HLA-G. Segundo essa nova via, linfócitos T e células NK ativados adquirem HLA-G por um mecanismo de transferência de membrana denominado “trogocitose”, tornando-se células com características imunossupressoras (Caumartin, Favier *et al.*, 2007; LeMaoult, Caumartin *et al.*, 2007). As sete proteínas variantes dessa molécula constituem as isoformas de membrana G1, G2, G3 e G4, e as isoformas solúveis G5, G6 e G7, todas geradas por processamento alternativo do transcrito HLA-G (**figura 1**). Diferentemente dos outros HLAs, essa molécula possui a capacidade de formar multímeros. Dependendo do tipo celular e da condição fisiológica, diferentes variantes protéicas são produzidas, sendo a HLA-G1 de membrana e a HLA-G5 solúvel as mais estudadas

Funções da molécula HLA-G

A molécula HLA-G, ao contrário das outras moléculas de HLA classe I, parece não desempenhar funções imunes estimulatórias significantes. Além disso, respostas contra HLA-G alogênico não são encontradas na literatura. Sua função primordial é de imunossupressão (**tabela 1**), influenciando as ações de diversas células do sistema imune (Carosella, HoWangYin *et al.*, 2008). Por sua interação com receptores expressos na superfície de células NK (do inglês “*natural killer*”), células T, linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APC), como os receptores de inibição ILT-2 (CD85j/LILR B1), ILT-4 (CD85d/LILRB2) e KIR2DL4 (CD158d) (Carosella, Moreau *et al.*, 2003), durante a gestação, o HLA-G pode, por exemplo, ativar a produção de citocinas importantes para o remodelamento vascular da interface materno-fetal, necessário para suprimento de oxigênio adequado para o feto (Loke e King, 2000; Moffett-King, 2002; Parham, 2004). Esta molécula pode, também, inibir as células NK, impedindo sua ação lítica contra as células trofoblásticas, já que o trofoblasto, por não expressar os MHC-I clássico,

HLA-A e HLA-B, seria um potente alvo dessas células efectoras (Ponte, Cantoni *et al.*, 1999).

Uma vez que se conhece o papel imunomodulador da molécula HLA-G, sua expressão tem sido associada a patologias como câncer, por conferir à célula cancerosa um mecanismo de “escape” da vigilância do sistema imune (Rouas-Freiss, Bruel *et al.*, 2005) –, doenças inflamatórias, como artrite reumatóide e esclerose múltipla (Veit, Vianna, Chies, 2010), bem como a distúrbios gestacionais, como a pré-eclâmpsia, na qual a expressão placentária de HLA-G e os níveis séricos dessa molécula estão diminuídos (Colbern, Chiang, Main, 1994; Hara, Fujii *et al.*, 1996; Lim, Zhou *et al.*, 1997; Yie, Li LH *et al.*, 2004; Hackmon, Koifman *et al.*, 2007).

Gene HLA-G e polimorfismos

O gene HLA-G está situado na região do complexo principal de histocompatibilidade, a qual é composta por um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossomo 6 – região 6p21.3 (**figura 2**). É composto por 8 éxons, 7 íntrons e uma região 3' não traduzida (3'UTR) (Van der Ven, Pfeiffer, Skrablin, 2000). Existem apenas 46 alelos descritos para o HLA-G, codificando 15 proteínas diferentes, um número extremamente baixo quando comparado aos 1001, 1605 e 690 alelos descritos para os HLAs clássicos A, B e C, respectivamente (Nolan, 2010). Este perfil polimórfico limitado da molécula HLA-G se distribui entre os três domínios alfa, contrariamente ao verificado nas moléculas de HLA clássicas, em que eles concentram-se no sítio de ligação ao peptídeo. Todas as 7 isoformas protéicas dessa molécula apresentam, pelo menos, o domínio alfa-1, sendo HLA-G1 a variante protéica mais completa. Para a formação das isoformas solúveis G5-G7, durante o processamento alternativo do RNA mensageiro (mRNA) do HLA-G, o íntron 4 não é eliminado, introduzindo um “stop codon” (códon de parada), não sendo traduzidos, desta forma, os domínios citoplasmáticos e de membrana (**figura 1**) (Hviid, 2006). A região 3' não traduzida (3'UTR – Untranslated Region), parece desenvolver um importante papel na expressão da HLA-G, principalmente através de mecanismos regulatórios pós-transcricionais. Dentre esses mecanismos destacam-se os microRNAs, uma vez que neste local há uma região de 20 nucleotídeos que parece ser um sítio de ligação de microRNA, principalmente para os miR-148a, miR-148b e miR-152. Na 3'UTR, já foram identificados alguns polimorfismos na posição +3142 (rs1063320) como a substituição de nucleotídeos C/G, que parece influenciar a

expressão do mRNA de HLA-G (Veit e Chies, 2009). Testes *in vitro* e *in silico* foram realizados por Tan e colaboradores, mostrando que o alelo G desse polimorfismo facilita a ligação de microRNA, favorecendo a repressão da expressão do HLA-G (Tan, Randall *et al.*, 2007). Ainda na região 3' não traduzida, no éxon 8 do transcrito HLA-G, um polimorfismo envolvendo a deleção/inserção de 14 pares de bases (bp) na posição +2960 tem despertado interesse de inúmeros pesquisadores (**figura 3**). Este polimorfismo parece influenciar a expressão de HLA-G, através de sua aparente correlação com a manutenção da estabilidade do mRNA dessa molécula (Veit, Vianna, Chies, 2010). A deleção dos 14bp está associada a baixos níveis de mRNA de HLA-G e, conseqüentemente, a baixos níveis protéicos de HLA-G (Rebmann, van der Ven K *et al.*, 2001; Hviid, Hylenius *et al.*, 2003). A relação desse polimorfismo com a manutenção da gestação, com a implantação embrionária, bem como com a pré-eclâmpsia está intensamente descrita na literatura (Hviid, Hylenius *et al.*, 2002; Hviid, Hylenius *et al.*, 2004; Hylenius, Andersen *et al.*, 2004; Tripathi, Abbas *et al.*, 2004; Vianna, Dalmáz *et al.*, 2007).

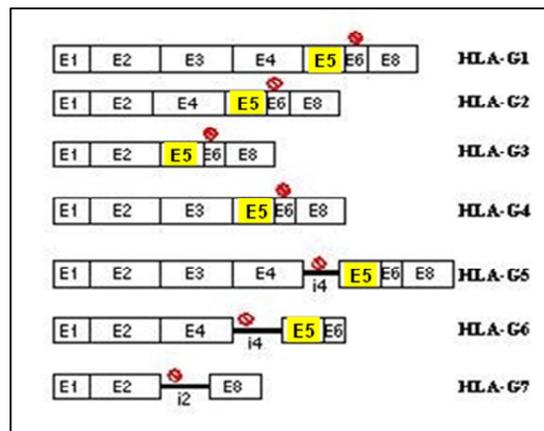


Figura 1 - Isoformas de HLA-G formadas a partir do processamento alternativo do mRNA: dependendo do processamento alternativo do mRNA de HLA-G, o códon de parada (em vermelho, “stop códon”) pode ser transcrito ou não, permitindo a tradução de um domínio citoplasmático que está presente nas isoformas de membrana (HLA-G1-G4) da molécula HLA-G.

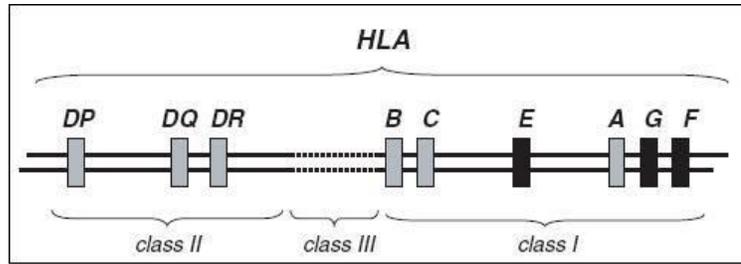


Figura 2 - Os genes do antígeno leucocitário humano (HLA) estão localizados na mesma região, no braço curto do cromossomo 6. (Hviid, 2006).

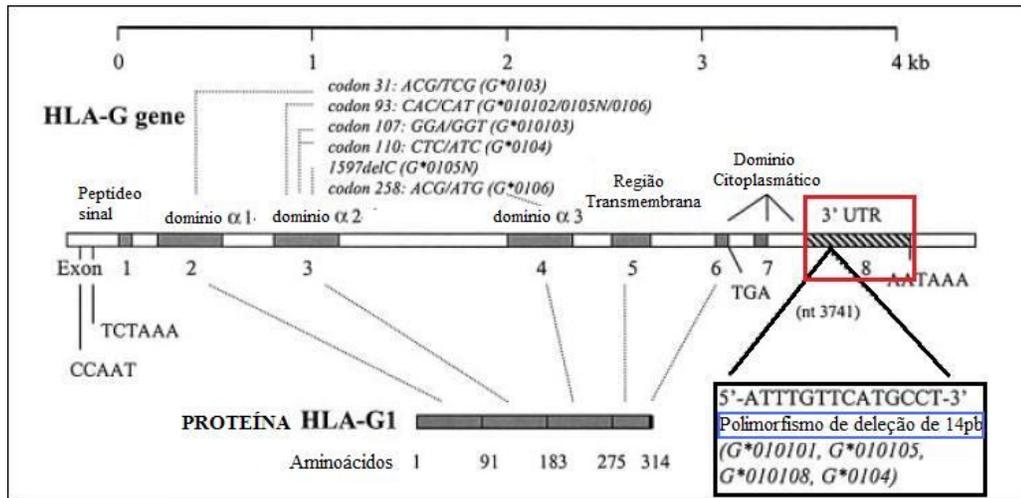


Figura 3 - Organização do gene HLA-G. Éxons indicados pelas caixas cinzas e os íntrons pelas brancas. Em vermelho, região do 3' não traduzida (3'UTR) e éxon 8. Em azul, polimorfismo de deleção de 14pb do HLA-G. (figura adaptada de Hylenius, Andersen *et al.*, 2004).

Tabela 1: Funções da molécula HLA-G em relação às moléculas efetoras do sistema imune.

Células efetoras	Função da HLA-G	Receptores envolvidos
Células NK	Inibição da função citotóxica	ILT2, KIR2DL4
	Inibição indireta da função citotóxica, por estabilizar as HLA-E de superfície	CD94/NKG2A (interage com HLA-E)
	Inibição da proliferação	ILT2
	Regulação positiva da expressão de receptores de inibição	
	Apoptose	CD8
	Aumento da proliferação celular e produção de IFN - γ	KIR2DL4
	Aumento da secreção de fatores pró-angiogênicos	KIR2DL4 internalizado
	Inibição da migração transendotelial	ILT2
Linfócitos T CD8+	Inibição da função citotóxica	
	Inibição da proliferação	ILT2
	Formação de células T regulatórias CD8 ^{low} +	
	Apoptose	CD8
Linfócitos T CD4+	Inibição da alorreatividade	ILT2, ILT4
	Inibição da proliferação	ILT2
	Regulação positiva da expressão de receptores de inibição	
	Formação de células T regulatórias, as quais incluem as T CD4 ^{low} +	
APCs	Inibição da maturação das células dendríticas, da apresentação de antígeno e de sua “mobilidade”	ILT4
	Indução das células T regulatórias	
	Regulação positiva da expressão de receptores de inibição	
CMSPs	Secreção de citocinas Th2	
Células endoteliais	Apoptose	CD160

Tabela adaptada de Carosella, HoWangYin, *et al.*, 2008.

NK= natural killer; **APCs**= células apresentadoras de antígenos; **CMSPs** = células mononucleares de sangue periférico.

PRÉ-ECLÂMPسيا

A pré-eclâmpسيا é a principal patologia da reprodução humana, estando presente em 3-5% das gestações (Dekker e Robillard, 2007) e sendo responsável pela maioria das mortes perinatais, nascimentos prematuros e restrição do crescimento intrauterino (Sibai, Dekker, Kupferminc, 2005). Apresenta alta taxa de mortalidade materna, principalmente em países em desenvolvimento, alcançando índices de até 14%, uma vez que a assistência pré-natal e os cuidados terciários nessas regiões são limitados. Por essas razões, é de grande importância o conhecimento de sua etiologia e de sua patofisiologia. O diagnóstico é geralmente realizado pela presença de hipertensão associada a proteinúria na mãe, contudo, em cerca de 10% a 15% dos casos não há ou não são detectadas essas características. É uma disfunção que pode se manifestar tanto na mãe, quanto no feto ou até mesmo em ambos. Na síndrome materna, as principais complicações são elevação da pressão arterial, proteinúria e edema podendo evoluir para eclâmpسيا, com o aparecimento de convulsões (Karumanchi e Lindheimer, 2008). Já no feto, pode levar a restrição do crescimento fetal, redução do líquido amniótico e oxigenação anormal. Sabe-se que a pré-eclâmpسيا resulta do desequilíbrio entre os fatores produzidos pela placenta e a adaptação materna a eles. Sua patofisiologia envolve ativação inadequada de células endoteliais, resposta inflamatória exacerbada (Sibai Dekker, Kupferminc, 2005) e invasão endovascular superficial do citotrofoblasto nas artérias em espiral (**figura 4**). Esta última – que ocorre na segunda invasão citotrofoblástica, por volta da 14^a e 16^a semana de gestação – acarreta um pobre intercâmbio vascular e, portanto um déficit nutricional e de oxigenação entre a mãe e a placenta, levando, provavelmente, ao mecanismo compensatório de aumento da pressão arterial materna, a fim de aumentar esse intercâmbio e proteger o feto dessa nutrição e oxigenação diminuída (Pijnenborg, 1996; Zhou, Damsky, Fisher, 1997). Ainda se desconhece se isto é uma adaptação materna dirigida ou uma resposta aos sinais de sofrimento fetal (Robillard, 2002).

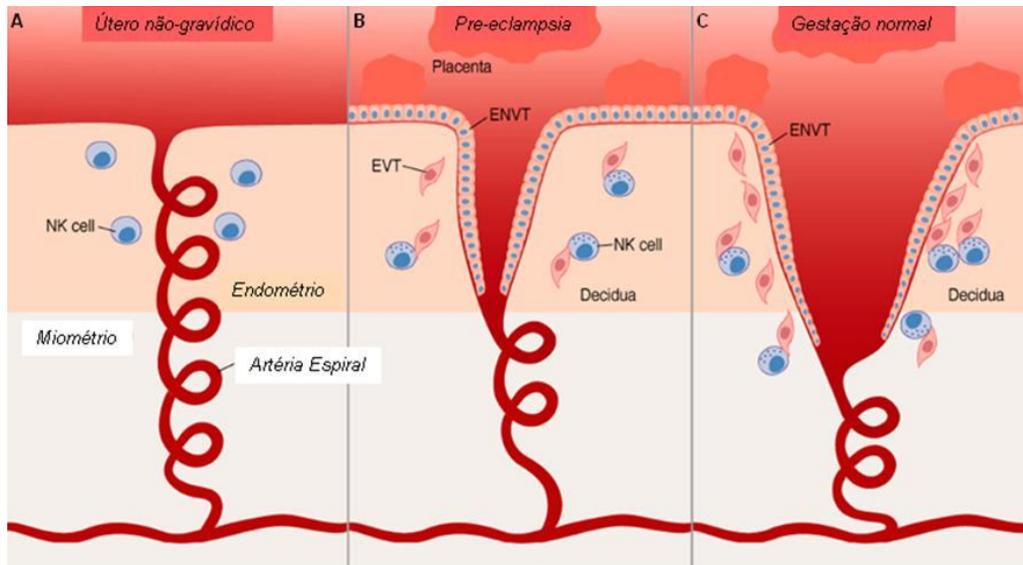


Figura 4 - Invasão endovascular do citotrofoblasto nas artérias em espiral: a gestação complicada pela pré-eclâmpsia (**B**) apresenta uma vascularização superficial e incorreta, impedindo desta forma o suprimento de nutrientes e oxigênio adequados ao feto. Já o útero gravídico normal (**C**), apresenta correta invasão vascular da decidua e miométrio. O útero não-gravídico (**A**) não apresenta a invasão do citotrofoblasto.

EVT: Células do trofoblasto extraviloso. **ENVT:** Células do trofoblasto endovascular. (figura adaptada de Parham, 2004)

Apesar dos inúmeros estudos realizados para o entendimento de sua etiologia e fisiopatologia, o completo conhecimento dos mecanismos que levam ao estado de pré-eclâmpsia ainda permanece desconhecido. O que se sabe é que sua causa envolve uma combinação de fatores genéticos materno-fetais e fatores ambientais (Roberts, Taylor *et al.*, 1989). Muitos trabalhos abordam a pré-eclâmpsia como uma disfunção da “má adaptação imunológica materno-fetal”, propondo que não há uma adaptação adequada do sistema imune materno em relação ao embrião semi-alogênico (Vinatier e Monnier, 1995; Dekker e Sibai, 1998; Moffett e Hiby, 2007; Saito, Sakai *et al.*, 2007), uma vez que esse distúrbio tem maior incidência entre as mulheres nulíparas, que concebem com técnicas de reprodução assistida ou que apresentam doenças auto-imunes (Sargent, Borzychowski, Redman, 2006; Saito, Sakai *et al.*, 2007). Além disso, uma mudança de parceiro parece restaurar o risco de pré-eclâmpsia mesmo em mulheres múltíparas. Essa característica sugere que a exposição ao esperma paterno, ao plasma seminal ou a ambos torna a mãe tolerante a aloantígenos feto-paternais (imunidade específica), aumentando o risco de pré-eclâmpsia quando do fracasso desta imunorregulação (Redman e Sargent, 2010). Além disso, a

exposição materna ao espermatozóide paterno pode ser capaz de modular o sistema imune fetal agindo no desenvolvimento de atopias (Vianna e Chies, 2008).

De fato, muitos aspectos relacionados ao sistema imune estão presentes na pré-eclâmpsia, como o número diminuído de células T regulatórias (Mahmoud *et al.*, 2003; Sasaki, Darmochwal-Kolarz *et al.*, 2007). Adicionalmente, fatores de crescimento e citocinas têm sido caracterizados no útero e placenta de gestantes normais e com pré-eclâmpsia (Wilczyński, Tchórzewski *et al.*, 2002; Taylor, Grimwood *et al.*, 2003; El-Baradie, Mahmoud, Makhoulouf, 2009), acreditando-se serem responsáveis por algumas manifestações clínicas dessa disfunção, influenciando e modificando funções trofoblásticas (Greer, Lyall *et al.*, 1994; Hayashi, Ohkura, Inaba, 2003; Chen Q, Chen L *et al.*, 2010). Com relação à etiologia imunogenética dessa patologia, tem-se buscado associação dos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês “Major Histocompatibility Complex”) no braço curto do cromossomo 6 – o HLA. Uma vez que o trofoblasto não expressa moléculas HLA I clássicas (exceto a HLA-C), expressando somente as HLA de classe I não clássicas HLA-E, – F e em maior quantidade a HLA-G (Parham, 1996), estudos têm investigado os loci do HLA I não clássicos e seus produtos. Em um estudo populacional, nosso grupo demonstrou que variantes no gene da molécula HLA-G podem influenciar o desenvolvimento de patologias gestacionais, como a pré-eclâmpsia (Vianna *et al.*, 2007). Desta forma, uma rede de aspectos imunológicos está relacionada com o desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

CÉLULAS T REGULATÓRIAS CD4+CD25^{high}+Foxp3+

Durante a seleção tímica, com o intuito de manter a irresponsividade imunológica a auto-constituintes, linfócitos auto-reativos potencialmente prejudiciais são eliminados no organismo (Van Parijs e Abbas, 1998). Algumas células T auto-reativas, no entanto, escapam da deleção clonal do timo podendo causar autoimunidades, porém, na maioria das vezes, estas células são ativamente suprimidas na periferia através da ação de mecanismos imunorregulatórios como a presença dos linfócitos T CD4+ regulatórios (Treg). As células Treg são, pelo menos em parte, produzidas pelo timo como uma subpopulação de linfócitos T funcionalmente maduros, a maioria dos quais expressando constitutivamente CD25 (T CD4+CD25+), um receptor da cadeia alfa da interleucina 2 (IL-2) (Hori, Nomura, Sakaguchi, 2003). Os linfócitos T CD4+CD25+ representam cerca de 5 -

10% das células T CD4 + periféricas dos seres humanos, mas apenas os T CD4+CD25^{high+} (que expressam em grandes quantidades a molécula CD25) são realmente regulatórios, constituindo 2-3% dos linfócitos T CD4 + (Mottet e Golshayan, 2007). O fator de transcrição Foxp3 é considerado o marcador mais confiável para as células Treg, sendo muito importante para a manutenção das Treg e para a característica imunossupressora dessas células. Estudos que avaliaram mutações no gene de Foxp3 verificaram o surgimento de doenças autoimunes severas comprometendo diversos órgãos em humanos, como a XLAAD (disfunção autoimune ligada ao X) e IPEX (síndrome de imunodesregulação, poliadenopatia e enteropatia ligada ao X) (Fontenot, Gavin, Rudensky, 2003; Hori, Nomura, Sakaguchi, 2003; Corthay, 2009). Os linfócitos T regulatórios CD4+CD25^{high}Foxp3+ suprimem a ativação das células T convencionais. Eles realizam essa ação através do contato célula-célula ou ainda pela produção de citocinas imunossupressoras, como a IL-10 e o TGF- β (Sakaguchi, Wing, Miyara, 2007). As células T regulatórias são hoje consideradas como os principais mediadores da tolerância periférica (Vignali, Collison, Workman, 2008). Elas têm sido relacionadas a processos patológicos ou fisiológicos que envolvem imunomodulação, como doenças autoimunes, rejeição/aceitação de enxertos e gestação (La Cava, 2008; Boros e Bromberg, 2009; Guerin, Prins, Robertson, 2009).

Na gestação humana, as células T CD4+CD25^{high} localizam-se preferencialmente na decídua, ou seja, na região de íntimo contato materno-fetal (constituindo 22% dos linfócitos T deciduais), em comparação ao sangue periférico (6,5% das células T periféricas) (Petroff, 2005), demonstrando sua importância na criação de um ambiente imunotolerante para o feto semi-alógeno. Essa população celular apresenta níveis séricos elevados em gestações bem-sucedidas (Somerset, Zheng *et al.*, 2004), assim como baixos níveis deciduais em abortos espontâneos (Sasaki, Sakai *et al.*, 2004), sendo necessária para a correta manutenção da gestação. Dada sua importância na gestação, vários trabalhos visam relacionar distúrbios nas células Treg e sua relação com o desenvolvimento da pré-eclâmpsia, porém, na literatura ainda não se verificou um consenso. Estudos recentes têm mostrado uma menor concentração sérica de linfócitos T CD4+CD25+Foxp3+ em gestantes pré-eclâmpicas em comparação a mulheres com gravidez saudável (Toldi, Svec *et al.*, 2008; Prins, Boelens *et al.*, 2009). No entanto, em um trabalho realizado por Paeschke e colaboradores não houve diferença significativa entre as concentrações

séricas de células Treg em gestações apresentando pré-eclâmpsia em relação às saudáveis (Paeschke, Chen *et al.*, 2005). Desta forma, as células regulatórias CD4+CD25^{high}Foxp3+ desenvolvem funções essenciais para a manutenção de um ambiente placentário imunotolerante, além de suprimir respostas autoimunes em situações fisiológicas normais. Porém, mais estudos são necessários para esclarecer seu papel regulatório e sua relação com a pré-eclâmpsia.

GLICOCORTICÓIDES E GESTAÇÃO

Durante a gestação, os hormônios corticosteróides regulam muitos dos processos necessários para a implantação bem-sucedida do embrião, bem como para o crescimento e posterior desenvolvimento do feto e da placenta. No entanto, alguns de seus efeitos também podem ser maléficos para o início da gestação (**figura 5**). No útero, o embrião, a placenta e o endométrio estão amplamente expostos ao glicocorticóide fisiológico, cortisol, derivado tanto das glândulas adrenais maternas quanto fetais (Michael e Papageorghiou, 2008). A diminuição do número de células NK uterinas pela administração de prednisona, um glicocorticóide sintético, (Quenby, Kalumbi *et al.*, 2005; Quenby e Farquharson, 2006) e ativação *in vitro* da secreção de hCG pelo trofoblasto promovida por glicocorticóides sintéticos (Ringler, Kallen, Strauss, 1989) são algumas ações benéficas que podem ser mediadas por glicocorticóides para uma gestação inicial bem-sucedida – o hormônio hCG auxilia, por ação local, na implantação do embrião e na diferenciação trofoblástica (Islami, Mock, Bischof, 2001; Srisuparp, Strakova, Fazleabas, 2001; Handschuh, Guibourdenche *et al.*, 2007), além de ser fundamental na manutenção da secreção de progesterona pelo corpo lúteo até que ocorra a mudança lúteo-placentária, por volta da 8ª semana de gestação, na síntese de progesterona (Hanson, Powell, Stevens, 1971; Michael e Papageorghiou, 2008). Já a possível influência dos glicocorticóides no aumento da apoptose decidual e placentária e na diminuição da síntese e sinalização de citocinas pró-inflamatórias são algumas ações que impedem o sucesso gestacional no início da gravidez (Michael e Papageorghiou, 2008).

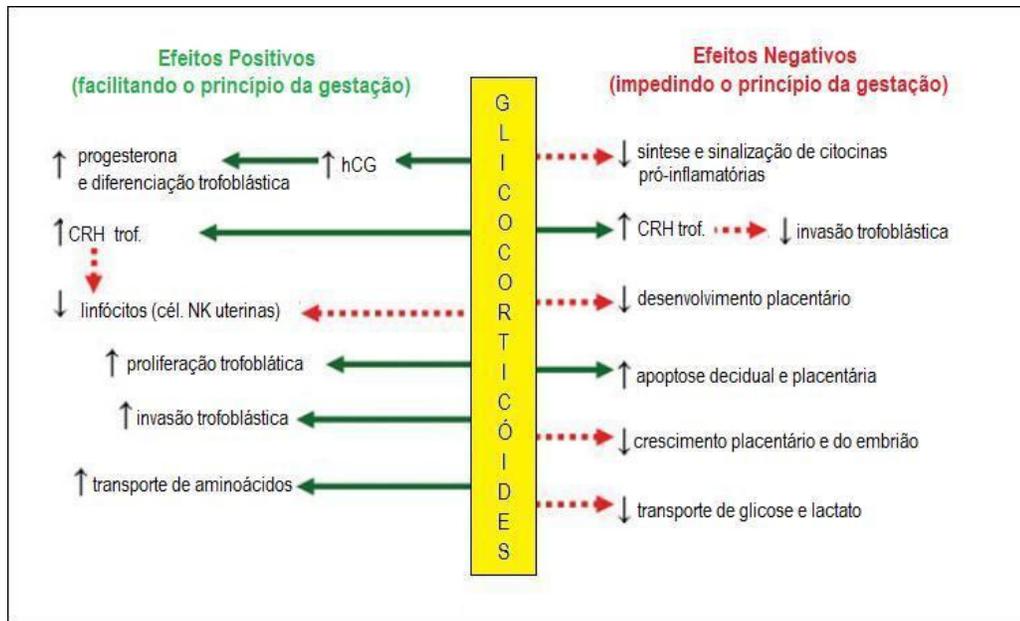


Figura 5 - Resumo dos possíveis efeitos positivos e negativos do glicocorticoide fisiológico, cortisol, no início da gravidez. Efeitos positivos sobre a atividade da enzima e/ou expressão da proteína são indicados por setas verdes, enquanto os efeitos negativos são indicados por setas com linhas vermelhas descontinuas. (figura adaptada de Michael e Papageorghiou, 2008).

hCG, gonadotrofina coriônica humana; **NK**, “natural killer”; **CRH**, hormônio liberador de corticotrofina; **Trof.**: trofoblástico.

Gestação e desordens de humor

A gestação compreende um período de muitas mudanças hormonais, podendo, muitas vezes, estar associadas a ansiedade e a desordens de humor. Estes distúrbios emocionais influenciam a qualidade de vida das gestantes, além de causar grande morbi/mortalidade e de serem abordados em alguns trabalhos como fatores de risco para abortos, nascimentos prematuros e bebês com baixo peso ao nascer (Hoffman e Hatch, 2000; Orr, James, Blackmore Prince, 2002; Marcus e Heringhausen, 2009). O aparecimento de sintomas depressivos é mais comumente observado em pessoas de 20-40 anos de idade, período em que muitas mulheres engravidam. Ademais, tem se encontrado na literatura uma taxa de 10 a 16% das gestantes apresentando transtorno depressivo (Marcus e Heringhausen, 2009). De acordo com estudos na área da Psiconeuroimunologia (PNI), a exposição crônica de um indivíduo ao estresse, ansiedade e a outros fatores emocionais, como a depressão, pode alterar a modulação do sistema imunológico. Fisiologicamente, através do estresse ocorre a ativação da glândula hipófise, a qual libera o hormônio ACTH

(*Adrenocorticotrophic hormone*), este por sua vez ativa as supra-renais que secretam o cortisol e adrenalina – hormônios responsáveis pelos efeitos imunorreguladores (Bizzarri, Pagliei *et al.*, 2001; Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2002) (**figura 6**).

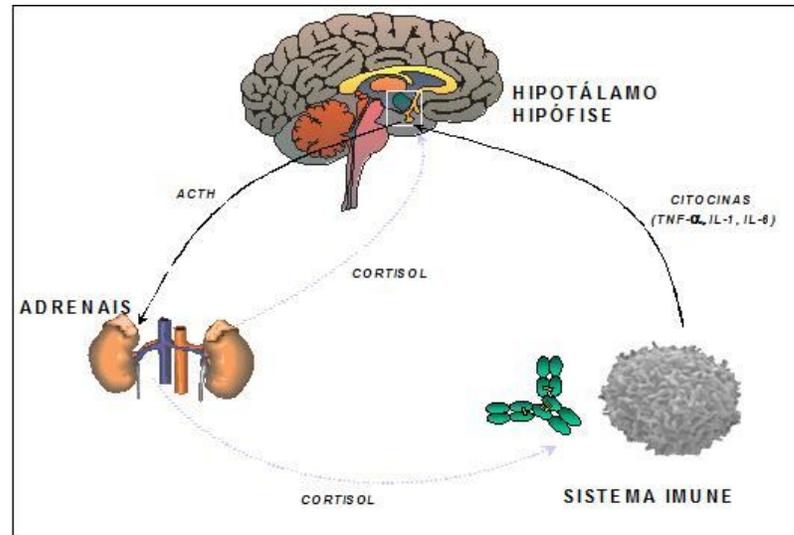


Figura 6 - Ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O estresse ativa o eixo HPA que desencadeia a secreção do hormônio ACTH pela hipófise anterior que, por sua vez, induz secreção do cortisol pelo córtex adrenal. O cortisol é o principal hormônio que regula o sistema imunológico. As citocinas pró-inflamatórias podem igualmente ativar o eixo HPA durante infecções.

O estresse crônico suprime a resposta imunológica global do organismo, uma vez que algumas de suas ações levam a uma diminuição da atividade das células NK (Bauer, Gauer *et al.*, 1995), diminuição na proliferação de células T e produção de IL-2 (Bauer, Vedhara *et al.*, 2000), além de induzir alteração no tráfego celular – causando linfopenia (Dhabhar, Miller *et al.*, 1995; Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2002) - e de reduzir a expansão clonal linfocitária mediada por mitógenos (Con A e Pha). Alguns estudos têm relatado ainda que linfócitos expostos cronicamente aos glicocorticóides, como ocorre durante o estresse crônico, podem tornar-se resistentes *in vitro* aos efeitos imunossupressores dos esteróides (Pedersen, Folds, Evans, 1989; Rupprecht, Wodarz *et al.*, 1991; Wodarz, Rupprecht *et al.*, 1991; Bauer, Vedhara *et al.*, 2000). Ademais, muitos efeitos pré-natais e pós-natais no feto estão relacionados a exposição crônica a glicocorticóides e estresse. O estresse crônico pré-natal está associado à imunossupressão (Kay, Tarcic *et al.*, 1998) e reprogramação do eixo HPA da prole (Reul, Stec *et al.*, 1994), induzindo alterações neuroimunes pós-natais

marcantes que incluem uma pré-disposição a doenças alérgicas (Bellinger, Lubahn, Lorton, 2008; Persinger e Falter, 1992), além do aumento de citocinas pró-inflamatórias e depressão (**Figura 7**).

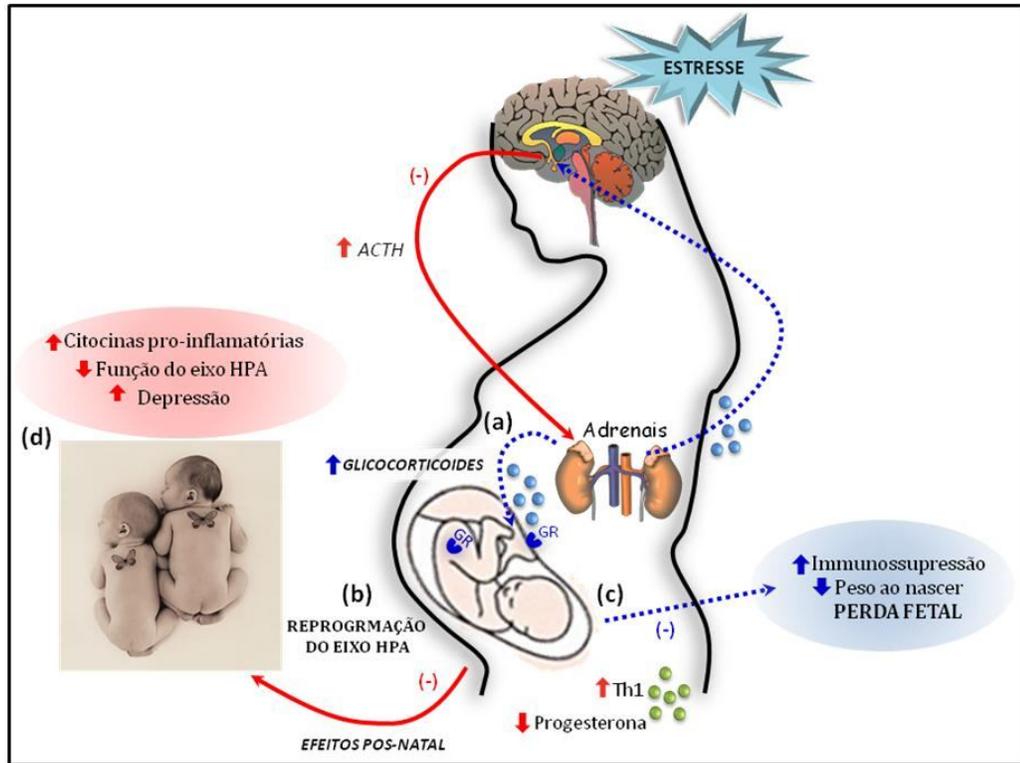


Figura 7 – Interações neuroimunes durante o estresse pré-natal. (a) o estresse é associado a ativação do eixo HPA materno (hipotálamo-pituitária-adrenal) e a liberação de glicocorticóides pelas adrenais. Os glicocorticóides maternos agem diretamente influenciando o sistema imune do feto, se ligando aos receptores de glicocorticóides (GR) expressos na placenta e tecidos fetais. (b) os glicocorticóides maternos podem ainda induzir a reprogramação do eixo HPA fetal durante estresse no período pré-natal, influenciando as células do sistema imune. (c) O estresse pré-natal é relacionado a disfunções como baixo peso ao nascer e aumento da imunossupressão podendo levar a perda fetal. (d) os estímulos estressores recebidos durante a gestação podem programar o sistema imune da prole nas condições pós-natais, aumentando a carga de depressão, citocinas pró-inflamatórias e prejudicando as funções do eixo HPA.

Glicocorticóides e o Desenvolvimento da Pré-eclâmpsia

Uma vez que os corticosteróides atuam nos fatores que levam a uma gestação bem sucedida, e que a modulação desses hormônios é afetada por distúrbios de humor, patologias gestacionais - como a pré-eclâmpsia - podem estar relacionadas com disfunções emocionais. Entretanto, não são encontrados na literatura muitos

estudos que investigam concomitantemente o desenvolvimento da pré-eclâmpsia e a presença de distúrbios afetivos durante a gestação. Os poucos que foram realizados não apresentam consenso. Por exemplo, Kurki e colaboradores em 2000 e Qiu e colaboradores em 2007 verificaram que depressão e ansiedade no período de início da gestação são fatores de risco para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, aumentando em até 2 vezes a chance de se desenvolver esta patologia (Kurki, Hiilesmaa *et al.*, 2000; Qiu, Sanchez *et al.*, 2007). Vollebregt e colaboradores, por sua vez, não observaram associação entre estresse na primeira metade da gestação e pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional em mulheres nulíparas (Vollebregt, van der Wal *et al.*, 2008). Em um trabalho recente, Shamsi e colaboradores relataram haver associação entre desenvolvimento de pré-eclâmpsia e estresse mental durante a gravidez (Shamsi, Hatcher *et al.*, 2010). Desta forma, devido aos escassos estudos nessa área e aos resultados contraditórios, torna-se importante a realização de trabalhos avaliando simultaneamente os efeitos dos glicocorticóides durante a gestação e o desenvolvimento de patologias severas como a pré-eclâmpsia.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

- O presente trabalho visa o acompanhamento de parâmetros imunológicos de gestantes com ou sem pré-eclâmpsia e gestantes sem complicações gestacionais, através da análise e caracterização das células do sistema imunológico.

Objetivos específicos:

- Examinar a correlação entre RNA mensageiro e expressão protéica de HLA-G em células mononucleares do sangue periférico de gestantes com ou sem pré-eclâmpsia e gestantes sem complicações gestacionais, controlando pelos polimorfismos de ausência/presença de 14bp (exon 8 - 3'UTR) e sítio de ligação de microRNAs (+3142 - 3'UTR), ambos no gene HLA-G além de seus haplótipos.
- Estabelecer a média de frequência de expressão de HLA-G na superfície de células do sistema imunológico (linfócitos e monócitos) e de seu receptor ILT-2 (nos monócitos) em gestantes com ou sem pré-eclâmpsia e em gestantes sem complicações gestacionais;
- Caracterizar as subpopulações de células T regulatórias (CD4+CD25+FoxP3+), células NK (CD56+CD3-), marcador de ativação (CD69) e suas médias de expressão na superfície de células de sangue periférico de gestantes com ou sem pré-eclâmpsia e em gestantes sem complicações gestacionais;
- Analisar e comparar a capacidade proliferativa de células T do sangue periférico e sua sensibilidade a glicocorticóides (dexametasona) em mulheres com ou sem pré-eclâmpsia e em gestantes sem complicações gestacionais.

TRABALHO EXPERIMENTAL

ARTIGO FORMATO: American Journal of Reproductive Immunology

**IMMUNOGENETICS NETWORKS AND IMMUNE CELL FUNCTIONS IN
PRE-ECLAMPSIA: ROLE OF HLA-G MOLECULE**

Andressa Grazziotin Mondadori^a, Priscila Vianna^a, Dinara Dornfeld^b and *José Artur
Bogo Chies^a

^a Immunogenetics Lab, Dept. Genetics (UFRGS), Porto Alegre, RS,

^b Neo-Natal Unit – Nossa Senhora Conceição Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil;

* **Corresponding author:** Dr. José Artur Bogo Chies. Rio Grande do Sul Federal
University, Biosciences Institute, Department of Genetics, Immunogenetic lab.
Bento Gonçalves av – 9500, Campus do Vale. Cep 91501970, postcode: 15053.

Fone: +55 51 3308 6740; Fax: +55 51 3308 7311. - PORTO ALEGRE, RS – Brazil.

Email address: jabchies@terra.com.br (Chies. J.A.B)

Mailing addresses: andressagmondadori@gmail.com, privianna@gmail.com and
jabchies@terra.com.br

running head: Immunoregulation of pregnancy and pre-eclampsia

RESUMO

Problema: Durante a gestação, o corpo feminino sofre diversas alterações endócrinas, físicas e também em seu perfil imunológico para se adaptar à presença do feto. Uma molécula de grande importância na regulação da gestação é a molécula HLA-G que desempenha um papel fundamental na manutenção de um ambiente imunossupressor visando à aceitação fetal.

Métodos: Amostras de DNA e células periféricas de 26 gestantes com pré-eclâmpsia, 25 gestantes controle e 6 gestantes controle sem complicações gestacionais foram analisadas em seu perfil imunogenético.

Resultados: Não foi observada diferença significativa entre a distribuição das frequências alélicas ou genótípicas dos polimorfismos avaliados no gene de HLA-G entre os grupos aqui estudados. Porém, em relação à imunidade celular, gestantes com PE apresentaram baixa frequência de monócitos expressando HLA-G (40%) quando comparadas às gestantes sem complicações (78%) ($p=0,002$). Além disso, as gestantes com PE demonstraram um perfil de resistência à ação inibitória de glicocorticóides durante a proliferação celular quando comparadas às gestantes controle ($p=0,03$). Ainda, gestantes com PE apresentaram alta média de intensidade de fluorescência de células Treg quando comparadas às gestantes controle (Gmean 174 *versus* 100, respectivamente $p=0,02$).

Conclusão: Nossos resultados sugerem que a regulação dos componentes imunológicos e genéticos pode ser importante na modulação de funções celulares efetoras durante o desenvolvimento da pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: imunorregulação da gestação, HLA-G e proliferação celular.

INTRODUÇÃO

A evolução da gestação, o nascimento do concepto e a produção de leite para alimentá-lo constituem uma seqüência natural e bem planejada para acolher um novo ser. Durante a gestação, o organismo feminino sofre diversas alterações endócrinas, físicas e também em seu perfil imunológico para se adaptar à presença do feto. O sistema imune materno está em íntimo contato com o feto, que pode ser comparado a um aloenxerto, pois possui 50% de material genético paterno, o que o caracteriza como estranho ao organismo materno. Em 1953, Peter Medawar formulou o conceito de que o embrião/feto se comporta no organismo materno como um transplante estando, portanto, vulnerável à rejeição ou tolerância imunológica ¹. A interação imunológica entre mãe e feto que ocorre ao longo da gestação é mantida até após o período de amamentação. Dentre os diversos fatores imunológicos que atuam na manutenção da homeostase durante a gestação, podemos citar o perfil de produção de citocinas do tipo Th2, a presença de células T regulatórias, o papel das células dendríticas, o balanço entre a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) e inibitórias (TGF- β), assim como a importante ação imunossupressora da molécula HLA-G.

O feto recebe nutrientes e também células maternas que atravessam a interface materno-fetal através da placenta. Recentemente, Jeff Mold e colaboradores descreveram o desenvolvimento de um ambiente imune regulador fetal gerado a partir da presença das células maternas ². Neste ambiente, o sistema imune do feto exerce uma função muito importante ao evitar o “ataque” pelas células maternas que atravessam a placenta, através da ação de células T reguladoras fetais que podem permanecer em circulação (após o nascimento) por até 17 anos como memória imunológica, sendo capazes de reconhecer as células maternas. Desta forma, mãe e

feto estão sob um contato muito mais íntimo do que imaginado anteriormente, e o sistema imune fetal está, apesar de não completamente formado, bastante ativo mesmo antes do nascimento.

Uma molécula de grande importância na regulação da gestação é a molécula HLA-G que desempenha um papel fundamental na manutenção de um ambiente imunossupressor visando à aceitação fetal. Esta molécula está expressa em altos níveis na região materno-fetal, apresentando uma expressão proteica tecido-restrita em tecidos embrionários e adultos: no ovo fertilizado, no citotrofoblasto, na membrana amniótica e nas células endoteliais dos vasos do córion durante o primeiro trimestre de gestação, na córnea, células epiteliais tímicas, nos eritroblastos e nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ³⁻⁸. O desenvolvimento da gestação somente ocorre quando moléculas solúveis de HLA-G (sHLA-G) são detectadas ^{9,10}. Altos níveis séricos de HLA-G solúvel já foram descritos em mulheres que apresentam gestações de sucesso, sendo estes níveis superiores aos encontrados em mulheres que apresentaram aborto ou outras complicações ^{7, 11-13}. Esta molécula participa na indução de uma resposta imune do tipo supressora, induzindo a produção de IL-10, inibindo a proliferação de células NK e células T, induzindo a formação de células T supressoras, a secreção de fatores pró-angiogênicos e apoptose de células T via CD8, além de impedir a maturação de células dendríticas ¹⁴. O papel imunomodulador de HLA-G e sua expressão têm sido associados a patologias bem como a distúrbios gestacionais, como a pré-eclâmpsia, na qual a expressão placentária de HLA-G e os níveis séricos dessa molécula estão diminuídos, além de estarem relacionados com a presença de polimorfismos ^{13,15-19}. A região 3' não traduzida (3'UTR – “Untranslated Region”), do gene de HLA-G parece desenvolver um importante papel na expressão desta molécula, através de mecanismos regulatórios pós-transcricionais como os

microRNAs e através de sítios polimórficos envolvendo a deleção/inserção de 14 pares de bases (bp) no éxon 8, sendo correlacionados com a manutenção da estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) deste gene^{20,21}. Neste *loci* há uma região de 20 nucleotídeos que parece ser um sítio de ligação de microRNA, sendo identificados alguns polimorfismos, como a substituição de nucleotídeos C/G, na posição +3142 (rs1063320). Em um estudo populacional, nosso grupo demonstrou que variantes no gene da molécula HLA-G podem influenciar o desenvolvimento de desordens gestacionais como a pré-eclâmpsia¹⁵.

Dentre diversas disfunções gestacionais, a pré-eclâmpsia é uma complicação grave da gravidez. Esta patologia, responsável por até 14% de mortalidade materno-fetal, é de grande importância para uma correta compreensão dos fenômenos imunológicos que regulam o processo da gestação. A etiologia e patogênese desta doença envolvem uma combinação de fatores de predisposição materno-fetal e fatores ambientais²². A pré-eclâmpsia é caracterizada por elevada pressão sanguínea, proteinúria e edema associados a danos em órgãos e prematuridade. Uma das hipóteses da patogênese da pré-eclâmpsia é a teoria da “maladaptação imunológica”, que propõe que o sistema imune materno não se adapta adequadamente ao feto semi-alógeno²³. Sendo assim, fatores imunológicos como o papel imunossupressor da molécula HLA-G durante a gestação, relacionam-se com o desenvolvimento desta patologia.

Juntamente com a pré-eclâmpsia, desordens de humor e ansiedade são também muito comuns durante a gestação. Estas desordens diminuem bastante a qualidade de vida das pacientes além de serem responsáveis por grande morbi/mortalidade, já que o período pré-natal é marcado por intensas flutuações dos hormônios gonadais^{24,25}. Qiu e colaboradores, em um estudo de coorte com

gestantes peruanas, relataram uma associação positiva entre depressão materna e ansiedade no desenvolvimento de pré-eclâmpsia ²⁶. Kurki e colaboradores abordaram o risco do desenvolvimento de pré-eclâmpsia em gestações iniciais de grávidas ansiosas ou deprimidas ²⁷. Estudos na área da Psiconeuroimunologia (PNI) demonstram que um organismo que se encontra exposto ao estresse, ansiedade e a fatores emocionais cronicados pode apresentar a regulação do sistema imunológico alterada. Fisiologicamente, o estresse ativa a glândula hipófise que, por sua vez, através da liberação do hormônio ACTH (*Adrenocorticotropic hormone*), ativa a adrenal que secreta o cortisol e adrenalina, hormônios responsáveis pelos efeitos imunorreguladores ^{28,29}. O estresse crônico reduz vários componentes da resposta imune celular, aumentando a morbidade e mortalidade das populações estressadas ²⁹⁻³¹. O resultado é uma diminuição global da resposta imune celular do organismo. Nas desordens afetivas, como ansiedade e depressão, a desregulação do eixo-HPA (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical-axis*) é um fenômeno frequentemente observado. O cortisol exerce seu efeito no equilíbrio deste eixo, através do receptor de glicocorticóide (GR). O aumento de cortisol induzido pelo estresse pode induzir várias alterações imunológicas. Essas alterações imunológicas são mediadas pela ação direta dos glicocorticóides sobre os linfócitos. Desta forma, a avaliação dos efeitos diretos dos glicocorticóides sobre a proliferação celular na gestação complicada ou não por pré-eclâmpsia torna-se de extrema importância. Além disso, o eixo-HPA exerce efeitos inibitórios sobre o sistema reprodutivo feminino. Os glicocorticóides inibem os hormônios luteinizantes, estrógeno, hormônio esteróide do ovário e progesterona. Alterações endócrinas nos níveis de progesterona podem influenciar o tipo de resposta imune gerada por uma mulher durante a gestação ^{32,33}.

Apesar de grande progresso na elucidação dos mecanismos envolvidos na manutenção de uma gestação de sucesso, ainda há mais questões do que respostas em se tratando da hierarquia das vias de sinalização e interação entre os distintos mediadores da sobrevivência fetal. Neste trabalho, visamos correlacionar o desenvolvimento de pré-eclâmpsia com a imunorregulação da gestação, avaliando os componentes da imunidade celular, assim como o perfil de expressão da molécula HLA-G e suas variantes polimórficas, além do perfil de proliferação celular na presença de glicocorticóides.

METODOLOGIA

• Critérios de inclusão e exclusão das pacientes

Gestantes que consultaram no Hospital Nossa Senhora Conceição - GHC Serviço de Saúde Comunitária e Serviço de Obstetrícia - (Porto Alegre), no período de Janeiro a Maio de 2010, foram convidadas a participar deste estudo após prévia observação e concordância com o termo de consentimento anexado a este (**Anexo I**). Identificamos 26 gestantes apresentando pré-eclâmpsia, 25 gestantes controle e 6 gestantes controle sem complicações gestacionais. O critério de inclusão para selecionar o grupo controle excluía as seguintes características: presença de hipertensão arterial crônica, doença renal, doenças do colágeno, câncer ou trombose. O critério de inclusão das gestantes controle sem complicações gestacionais excluía além dos critérios de exclusão do grupo controle, as seguintes características: tabagismo, diabetes gestacional, trabalho de parto prematuro, sangramentos, disfunção placentária, hipertensão, dilatação, pneumonia, toxoplasmose, infecção urinária e doenças autoimunes. A pré-eclâmpsia foi definida como a presença de hipertensão e proteinúria. Hipertensão é caracterizada por pressão arterial de, no mínimo, 140 mm Hg (sistólica), ou pelo menos 90 mm Hg (diastólica), pelo menos em duas ocasiões e 4-6 h distante após a 20ª semana de gestação em mulheres sabidamente normotensas previamente. A proteinúria é definida como uma excreção de 300 mg ou mais de proteína a cada 24 h. Foram excluídas do grupo de estudo as mulheres que se recusaram a participar do projeto por quaisquer motivos. Inicialmente, preencheu-se a Ficha de Dados Sociodemográficos de cada paciente, logo após, as participantes do estudo passaram à coleta sanguínea.

- ***Coleta sanguínea e obtenção de células mononucleares do sangue periférico de gestantes***

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) obtidas das gestantes alocadas para o estudo (aproximadamente 10mL de sangue heparinizado) foram coletadas e centrifugadas em Ficoll-hypaque (Pharmacia), 1200 rpm, 25°C, 40 minutos. O anel de CMSP, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado 2 vezes em PBS 1X (1200 rpm, 4°C, 10 min). O precipitado de células, em seguida, foi suspenso em 1mL de RPMI. Após contagem das células em câmara hemacitométrica de Neubauer, estas foram novamente centrifugadas e suspensas em RPMI suplementado com 10% de soro humano (SIGMA) inativado, L-glutamina, e coquetel antibiótico/antimicótico (RPMI completo), na concentração de 1×10^7 células/mL. As CMSP foram então cultivadas em placas “fundo U” de 96 poços, na concentração de 200.000 células/poço e ativadas com 1% de Fitohemaglutinina (Pha) (GIBCO) durante 18 horas em estufa de 5% CO₂ a 37 °C.

- ***Citometria de fluxo***

Após 18 horas de cultura sob estímulo com Pha 1%, as populações celulares circulantes do sangue periférico (CMSP) obtidas das gestantes participantes foram analisadas por citometria de fluxo (citômetro FACScalibur, BD no Laboratório de Imunogenética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), com base em seu tamanho *versus* granulosidade avaliando a intensidade e frequência de expressão de marcadores de superfície: CD4, CD3 e CD14, marcadores de ativação celular: CD25 e CD69, receptor de HLA-G: ILT-2, molécula HLA-G: MEMG/9, células T regulatórias CD4+CD25^{HIGH}Foxp3+ e células NK (CD3-CD56+). Os dados coletados pelo citômetro foram analisados através do programa WinMDI 2.9

(Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) e FlowJo 7.5.5 (Flow Cytometry Analysis Software).

- ***Determinação da capacidade de proliferação celular por MTT e resistência a glicocorticóides***

A estimulação mitogênica provocada pela fitohemaglutinina (Pha) imita o processo natural de defesa quando linfócitos reconhecem antígenos estranhos ao organismo e são induzidos a proliferar³⁴. Ensaios colorimétricos foram padronizados para investigar a proliferação de linfócitos T humanos, bem como a sensibilidade a glicocorticóides *in vitro*³⁵. O teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-brometo de 2,5-dimetiltetrazólio) descrito por Mosmann (1983) foi utilizado para determinação da capacidade proliferativa de linfócitos obtidos do sangue periférico das pacientes³⁶. Este teste indica o número de células viáveis a partir da clivagem do sal tetrazólio em um cristal denominado formazan, clivagem esta realizada pela enzima *succinato-tetrazólio redutase* que pertence à cadeia respiratória da mitocôndria. Este teste foi aplicado sobre cultura de CMSP (2×10^5 células por poço) de pacientes estimuladas ou não com o mitógeno fitohemaglutinina (Pha) na presença ou ausência do glicocorticóide dexametasona nas concentrações 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} (DEX, SigmaAldrich). Altas concentrações do glicocorticóide DEX agem mimetizando o efeito de uma condição de estresse crônico. Após cultura de 96 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°, na presença de MTT, estas células estimuladas com Pha (1%) foram processadas, o sobrenadante coletado e realizada leitura de absorbância a 470 nM, em leitor de ELISA Spectra Max 340, (Molecular Devices); as leituras foram analisadas através do programa Soft Max Pro (1.2.0).

- ***Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação do gene HLA-G***

O DNA utilizado para as técnicas de caracterização das variantes moleculares do gene HLA-G foi obtido a partir de amostras de CMSP, isoladas a partir de sangue heparinizado, previamente congeladas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). O protocolo de extração de DNA foi adaptado a partir da técnica de “salting out” descrita por Lahiri e Nurnberger, 1991³⁷, seguida de extração por fenol-clorórmio^{38, 39}, visando a obtenção de uma maior pureza e concentração de DNA. O polimorfismo de 14 bp no éxon 8 do gene HLA-G foi detectado através da análise de PCR na qual: 200 ng de DNA genômico foram adicionados a um volume final de 25µL contendo 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50mM KCl, 0,08% (v/v), NonidetP40, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTPs; 10pmol de cada iniciador (“primer”) e 0,75 unidades de Taq polimerase. As condições de ciclagem foram: 35 ciclos de 94°C por 30 s, 64°C por 60s e 72°C por 60s, sendo precedidas por um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por uma etapa de extensão final a 72°C por 10min. As amostras foram genotipadas por PCR utilizando “primers” específicos (5'GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3' e 5'GGAAGGAATGCAGTT CAGCATGA-3'), segundo descrito anteriormente¹⁵. O polimorfismo de sítio de ligação de microRNA encontrado na região 3'UTR (não traduzida) do gene HLA-G também foi avaliado por PCR onde: 200 ng de DNA genômico foram adicionados a um volume final de 25µL contendo tampão PCR 1X; MgCl₂ 2,0 mM; 0,2 mM de cada dNTPs; 10pmol de cada iniciador “primer” e 1 unidade de Taq polimerase. As condições de ciclagem foram: 32 ciclos de 94°C por 30 s, 65,5°C por 30s e 72°C por 60s, sendo precedidas por um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido por uma etapa de extensão final a 72°C por 5min. As amostras foram genotipadas por PCR utilizando “primers” específicos (GMIRNAF-5'CATGCTGAACTGCATT CCTTCC-3' e GMIRNAR-5'

CTGGTGGGACAAGG TTCTACTG-3'). Os produtos de PCR foram clivados utilizando 3 unidades (u) da enzima BaeG I (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), de acordo com as instruções do fabricante, a 37°C por 3h, segundo descrito anteriormente ⁴⁰.

- ***Genotipagem do polimorfismo de deleção/inserção 14bp no éxon 8 (região 3'-não traduzida) do gene HLA-G:***

Os produtos de PCR do éxon 8 que abrangem o polimorfismo de 14bp foram analisados em géis de poliacrilamida 6% contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos de amplificação para o polimorfismo de 14 bp foram de 224 bp para o alelo com inserção de 14 bp e 210 bp para o alelo com deleção de 14bp.

- ***Genotipagem do polimorfismo de substituição de nucleotídeos C/G, na posição +3142 (rs1063320) nos sítios de ligação de microRNAs no éxon 8 (região 3'-não traduzida) do gene HLA-G***

Os produtos da clivagem do amplicon da região 3'UT que abrangem o polimorfismo 3'UTR miRNA C/G (+3142) foram analisados em géis de agarose 1,5% contendo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. A clivagem do alelo C produziu um fragmento intacto de 406 bp, enquanto a clivagem do alelo G produziu fragmentos de 316 e 90 bp.

- ***Montagem dos haplótipos de HLA-G***

Os polimorfismos de 14bp e sítio de ligação de microRNA no gene de HLA-G encontram-se em desequilíbrio de ligação, alterando a expressão de HLA-G. Desta forma, a análise dos haplótipos representadas por eles torna-se de grande importância na avaliação da relação com a presença de PE. Os genótipos referentes ao polimorfismo de 14bp e microRNA foram analisados conjuntamente através do

programa MLocus e WinPEPI, originando os possíveis haplótipos de cada grupo experimental (ins/G, ins/C, del/G e del/C) e suas respectivas frequências.

- ***Análises estatísticas***

Todas as variáveis quantitativas foram testadas para normalidade de distribuição através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As análises de marcadores de superfície em células sanguíneas (CMSP) provenientes das gestantes com ou sem pré-eclâmpsia e de gestantes em complicações gestacionais foram avaliadas por testes ANOVA ou Kruskal-Wallis H. Os níveis de proliferação linfocitária na presença de DEX foram analisados por análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas que incluiu uma variável de agrupamento (pré-eclâmplicas *versus* controle ou *versus* sem complicações) e uma variável das medidas analisadas (as três concentrações de hormônio DEX). Já nas análises relacionadas aos polimorfismos no gene de HLA-G, as frequências alélicas das variantes polimórficas foram determinadas através da contagem direta dos alelos. As frequências alélicas e genotípicas dos pacientes foram então comparadas com as frequências observadas nas amostras controle usando-se o Teste Qui-Quadrado (χ^2) ou o Teste Exato de Fisher. Os resultados são apresentados na forma de frequências, com nível de significância estabelecido em $\alpha < 0,05$. Todos os dados foram analisados no programa SPSS 15.0.

- ***Aspectos éticos e legais***

O presente projeto foi submetido a avaliação pelo comitê de Ética em Pesquisa do GHC (Grupo Hospitalar Conceição – Porto Alegre) (**Anexo 2**), sendo o mesmo iniciado apenas após aprovação pelo comitê.

RESULTADOS

Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos de 14bp em HLA-G

Quarenta e oito gestantes foram genotipadas para o polimorfismo HLA-G 3'UTR +14pb, sendo comparados o genótipo deleção/inserção de 14pb e a frequência alélica em gestantes com PE (n=21), controle (n=21) e gestantes sem complicações (n=6). A distribuição genotípica para o polimorfismo de deleção de 14 pb do HLA-G materno nos três grupos analisados estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (**tabela I**). A distribuição geral dos genótipos e das frequências alélicas e genóticas nos grupos estudados são mostradas na **tabela II**. Os resultados analisados não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação às frequências alélicas e genóticas nos três grupos avaliados.

Haplótipos de HLA-G 3'UTR 14bp e 3'UTR miRNA

Os polimorfismos 3'UTR 14 pb (+2960) e 3'UTR miRNA C/G (+3142) estão em desequilíbrio de ligação. Desta forma, a frequência dos haplótipos del/C, del/G, ins/C e ins/G nos grupos de gestantes com PE, controle e sem complicações foi comparada. A distribuição dos haplótipos e a frequência haplotípica dos grupos são mostradas na **tabela III**. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos haplótipos dos três grupos analisados. O haplótipo ins/G apresentou maior frequência tanto no grupo de gestantes com pré-eclâmpsia (0,40) quanto no grupo controle (0,45) e sem complicações (0,58).

Perfil de ativação celular

O perfil de ativação celular dos linfócitos TCD4+ das gestantes com PE, controle e sem complicações foi determinado através da medida da frequência de

expressão do marcador de ativação celular CD69 nessas células. Analisando os resultados obtidos, nosso estudo revelou uma alta frequência de expressão de células T CD4+CD69+ nas gestantes com PE ($p=0,04$; média $36,6\% \pm 10,8$) quando comparadas às sem complicações (média $25,2\% \pm 8,5$) (**figura 1A**). Em relação às gestantes controle, não houve diferença estatística significativa na frequência de expressão de células TCD4+CD69+ ($p=0,197$; média de expressão nas gestantes controle $30,9\% \pm 10,5$) (**tabela IV**).

Células NK periféricas

Analisou-se a frequência de células NK periféricas (CD56+CD3-) em gestantes com pré-eclâmpsia (média $9,0\% \pm 0,3$), controle (média $8,3\% \pm 0,4$) e sem complicações (média $10,4\% \pm 0,08$). Comparando as frequências de células NK periféricas nos três grupos, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada (**tabela IV**).

Expressão de HLA-G em monócitos e linfócitos na pré-eclâmpsia e expressão do receptor ILT-2 em monócitos

A molécula HLA-G de membrana pode ser expressa em altos níveis na superfície de células monocíticas durante a gestação. Nos linfócitos, no entanto, a expressão de HLA-G é baixa. Ambas as células podem expressar, além da molécula HLA-G, receptores para essa molécula, como o ILT-2. Sendo assim, as células mononucleares do sangue periférico das gestantes com PE, controle e sem complicações foram imunofenotipadas para CD14+HLA-G+ (expressão de HLA-G em monócitos), CD14+ILT2+ (expressão do receptor ILT-2 em monócitos) e CD3+HLA-G+ (expressão de HLA-G em linfócitos). Nossos resultados revelaram

uma baixa frequência de expressão de HLA-G nos monócitos de gestantes com PE ($p=0,01$; $40,2\% \pm 22,6$) quando comparadas às gestantes controle (média $59,1\% \pm 19,8$) e às gestantes sem complicações (média $78,2\% \pm 9,5$) (**figura 2**). Nossos achados ainda revelaram uma diminuição na frequência de expressão de HLA-G em linfócitos de gestantes com PE ($p=0,005$; média $1,6\% \pm 2,0$) em relação a frequência encontrada nos linfócitos de gestantes sem complicações (média $5,2\% \pm 2,0$) (**figura 1B**). Cabe ressaltar que o grupo de gestantes sem complicações apresentou uma frequência de expressão de HLA-G bem elevada tanto em monócitos como nos linfócitos (média $78,2\% \pm 9,5$ e $5,2\% \pm 2,0$, respectivamente), quando comparadas aos outros grupos de estudo. Quanto à expressão do receptor ILT-2 em monócitos, não houve variação de expressão entre os três grupos ($p=0,5$) (**tabela IV**).

Células Treg x pré-eclâmpsia

A população de células T regulatórias presente nas gestantes com PE, controle ou sem complicações, foi determinada pela expressão intracelular de Foxp3, expressão de superfície de CD4 e pela alta frequência de expressão do marcador de ativação celular CD25^{high+} nas células mononucleares do sangue periférico. Nossas análises revelaram que as gestantes pré-eclâmpticas apresentaram uma média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês “Mean Fluorescence Intensity”) de Foxp3 elevada, quando comparadas a das grávidas do grupo controle ($p=0,02$; mfi: $174,4 \pm 70,2$ PE *versus* mfi: 100 ± 75 controle) (**figura 3**). Porém, avaliando a frequência destas células (CD4+CD25^{high+}Foxp3+), não houve diferença estatística na população de linfócitos do sangue periférico entre os grupos analisados (**Tabela IV**).

Proliferação linfocítica induzida por mitógeno e proliferação basal x pré-eclâmpsia

A análise da proliferação linfocítica induzida pelo mitógeno (Pha) não apresentou variação significativa entre os grupos: gestantes com PE ($p=0,55$; média $\Delta OD 0,251 \pm 0,136$), controle (média $\Delta OD 0,282 \pm 0,138$) e sem complicações (média $\Delta OD 0,314 \pm 0,078$). Contudo, quando se considerou somente a proliferação linfocítica basal - sem a estimulação com Pha -, os resultados mostraram uma média de proliferação basal elevada em gestantes com PE quando comparadas às gestantes sem complicações ($p=0,03$; média OD $0,374 \pm 0,096$ PE *versus* OD $0,269 \pm 0,054$ sem complicações) (**figura 4**).

Resistência a supressão da proliferação celular na presença de dexametasona e sua relação com a pré-eclâmpsia

A inibição da proliferação celular linfocítica é uma das ações mediadas por corticosteróides. O estresse crônico é marcado por inibição da proliferação celular e a exposição repetitiva a altos níveis de glicocorticóides como nas condições estressantes pode induzir resistência a ação supressora destes hormônios. Desta forma, analisamos se há uma diferença de sensibilidade ao estímulo de inibição da proliferação celular induzido pela presença de dexametasona (um glicocorticoide sintético) em gestantes com PE, controle e sem complicações. Nossos resultados revelaram que os linfócitos de mulheres com PE apresentaram níveis de proliferação celular elevados na presença de dexametasona (10^{-6}) quando comparadas as gestantes controle ($p=0,03$; média OD $0,255 \pm 0,1$ PE *versus* OD $0,141 \pm 0,09$ controle) (**figura 5**). Desta forma, mulheres com PE parecem ser resistentes à ação inibitória da

proliferação celular induzida por glicocorticóides nas concentrações de dexametasona testadas.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos parte da complexa rede de interações imunológicas durante o processo de gestação, visando um melhor entendimento dos mecanismos de aceitação e tolerância materna ao feto em condições normais ou patológicas, como na pré-eclâmpsia.

No presente estudo, não observamos diferenças estatísticas entre as frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos de HLA-G 3' UTR (inserção/deleção de 14bp e polimorfismo no sítio e ligação de microRNA) entre gestantes com PE, controle e sem complicações. Estes resultados estão de acordo com análises prévias, nas quais não se verifica associação significativa entre o genótipo HLA-G materno e pré-eclâmpsia ^{15, 41-43}. No entanto, nosso grupo já demonstrou que esse polimorfismo parece afetar o desenvolvimento da PE em mulheres primíparas ¹⁵. Estudos mostram que o alelo contendo os 14pb está associado a baixos níveis de mRNA de HLA-G em quase todas as isoformas de amostras heterozigotas de trofoblastos do primeiro trimestre gestacional ⁴⁴⁻⁴⁶. Ainda, analisando a associação entre o genótipo fetal para HLA-G 14pb e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia materno, a literatura é contraditória. Alguns trabalhos não verificaram associação entre esse polimorfismo no feto e a pré-eclâmpsia ^{41, 42, 47}, porém outros relataram uma associação positiva entre o genótipo fetal +14pb/+14pb e o desenvolvimento materno de pré-eclâmpsia ^{48,49}. Analisamos, então, se haveria variação na frequência haplotípica (haplótipos del/C, del/G, ins/C e ins/G) dos polimorfismos HLA-G 3' UTR 14pb e C/G (posição +3142) nos grupos

de gestantes com PE , controle e sem complicações. Nossos resultados não mostraram associação entre os haplótipos avaliados e a pré-eclâmpsia. Ainda não está descrita na literatura a interação entre esses haplótipos e essa patologia, somente a relação do haplótipo del/G com baixos níveis de mRNA da molécula HLA-G ⁵⁰. Em relação a expressão da proteína HLA-G na membrana celular, os dados aqui analisados revelaram que tanto em linfócitos quanto em monócitos, esses níveis estavam diminuídos em mulheres com PE. Além disso, em gestantes que não apresentavam complicações gestacionais, a expressão de HLA-G tanto em monócitos quanto em linfócitos, estava bem elevada (média de expressão em monócitos 78,2 % \pm 9,5; média de expressão em linfócitos 5,2 % \pm 2,0). Alegre e colaboradores ⁷ em um estudo longitudinal com mulheres que desenvolveram uma gravidez normal verificaram um pico de expressão de HLA-G em monócitos estimulados com IFN- γ de 75%. Na literatura, baixos níveis séricos e trofoblásticos de HLA-G são encontrados em gestantes com PE e em mulheres que apresentam outras complicações gestacionais, como aborto recorrente e descolamento prematuro da placenta ^{12, 13, 16-19, 51}. A baixa expressão de HLA-G de membrana em monócitos e linfócitos demonstrados corroboram com a teoria da “maladaptação imunológica” como uma das causas da pré-eclâmpsia, visto que, a molécula HLA-G é responsável por diversos processos de tolerância imunológica necessários para uma gestação bem-sucedida ^{14, 52,53}.

A ativação linfocitária ocorre concomitantemente com um aumento da expressão de CD25 e CD69 de superfície nessas células e aumento da proliferação celular ⁵⁴. A estimulação mitogênica provocada pela Pha, utilizada neste estudo, mimetiza o processo natural de defesa do nosso organismo, quando linfócitos reconhecem antígenos não-próprios e são induzidos a proliferar ³⁴. Nossos resultados

demonstraram uma média de frequência de células TCD4+CD69+ elevada em gestantes com PE (36,6%) em relação às grávidas sem complicações gestacionais (25,2%). Prado-Drayer e colaboradores⁵⁵ também verificaram uma média de células T CD4+C69+ diminuída em mulheres que apresentavam uma gestação normal em comparação com gestantes que apresentavam complicações, como abortos recorrentes. Ainda, nosso estudo sugere uma relação entre o aumento dos níveis de proliferação celular basal (sem o estímulo de Pha) e a ocorrência de PE, pois as gestantes com PE apresentaram uma proliferação celular basal elevada quando comparadas a proliferação basal de gestantes sem complicações. Essa proliferação aumentada concorda com os resultados de um perfil de ativação maior em gestantes com PE. Além disso, nas grávidas com PE pode estar ocorrendo maior proliferação celular devido a maior ativação celular em resposta a presença do feto semialogênico enfatizando a teoria da “maladaptação imunológica” materna.

As células NK constituem de 60% a 70% dos linfócitos maternos isolados da interface materno-fetal⁵⁶. Sua citotoxicidade deve ser regulada por citocinas e moléculas reguladoras como HLA-G. Nosso estudo não revelou diferença significativa entre as frequências de células NK periféricas circulantes em gestantes com PE, controle ou sem complicações. Entretanto, Prado-Drayer e colaboradores⁵⁵ verificaram baixos níveis de células NK em gestantes saudáveis, porém, estes dados foram revelados em comparação com os níveis encontrados em gestantes com abortos recorrentes.

As células T regulatórias (Treg) possuem um papel importantíssimo na imunorregulação da gestação, e são caracterizadas pela expressão de CD4+CD25^{high}⁵⁷. O fator de transcrição Foxp3 é considerado o marcador mais confiável para esse tipo celular, sendo sua expressão muito importante para a

característica supressora dessas células. As Treg são hoje ditas como os principais mediadores da tolerância periférica ⁵⁸. Nossas análises revelaram uma média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês “Mean Fluorescence Intensity”) de Foxp3 aumentada nas gestantes com PE, quando comparada às gestantes do grupo controle. Entretanto, não houve variação na frequência de células Treg CD4+CD25^{high}Foxp3+ periféricas entre os grupos estudados. Desta forma, mesmo não havendo diferença na frequência de Treg entre as gestantes com PE, controle e sem complicações, as células Treg das mulheres com pré-eclâmpsia apresentam uma maior expressão de Foxp3 (intensidade de fluorescência). Esse aumento de intensidade de expressão de Foxp3 pode ser uma tentativa de controlar a resposta inflamatória deletéria ou exacerbada que pode estar presente na pré-eclâmpsia. Desta forma, as gestantes com PE estariam desenvolvendo mecanismos imunorregulatórios a fim de controlar a exacerbção da doença na tentativa de manter uma gestação de sucesso. Estes resultados estão de acordo com os revelados por Paeschke e colaboradores ⁵⁹, uma vez que eles não verificaram diferença significativa entre as concentrações séricas de células Treg em gestações apresentando pré-eclâmpsia quando comparadas às saudáveis. Contudo, estudos recentes têm mostrado uma menor concentração sérica de linfócitos T CD4+CD25+Foxp3+ em gestantes que desenvolveram PE em comparação a mulheres com gravidez saudável ^{60, 61}. Sasaki e colaboradores ⁶² identificaram que essa concentração de Treg nas gestantes com PE é inferior ainda a concentração em mulheres não grávidas.

Uma vez que os glicocorticóides atuam nos fatores que levam a uma gestação bem sucedida ⁶³, e que a modulação desses hormônios é afetada por distúrbios de humor ^{28,29}, patologias gestacionais - como a pré-eclâmpsia - podem estar relacionadas a disfunções emocionais. Ainda, alguns estudos têm descrito que

linfócitos expostos cronicamente aos glicocorticóides, como ocorre durante o estresse crônico, podem tornar-se resistentes *in vitro* aos efeitos imunossupressores destes esteróides^{30, 64-66}. Portanto, avaliamos a resistência à imunossupressão da proliferação celular das CMSP na presença de dexametasona nas gestantes com PE, controle ou sem complicações. Nossas análises revelaram que mulheres com PE são resistentes *in vitro* à inibição da proliferação celular induzida pelo glicocorticóide sintético dexametasona na concentração 10^{-6} , tendendo a ser resistentes também nas outras concentrações deste corticosteróide. Estes dados podem sugerir que as mulheres que apresentam PE estejam mais estressadas ou deprimidas. Porém, características psicológicas e quantitativas dos parâmetros do estresse devem ser avaliadas. Em dois estudos anteriores, um em 2000²⁷ e o outro em 2007²⁶, a depressão e ansiedade no início da gestação foram relatadas como fatores de risco para o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, aumentando em até 2 vezes a chance do desenvolvimento desta patologia. Ambos distúrbios de humor levam a um estado de estresse. Uma vez que o estresse crônico pode causar resistência *in vitro* aos efeitos imunossupressores dos glicocorticóides na proliferação celular e que essa resistência foi observada no nosso estudo em mulheres pré-eclâmplicas, podemos sugerir uma relação entre estresse e a pré-eclâmpsia. Mulheres com PE tendem a ser mais estressadas e isso pode contribuir para o aumento na resistência a ação de glicocorticóides observada. Contudo, os mecanismos que levam a essa relação devem ser profundamente avaliados. Poucos estudos são descritos na literatura abordando este tema. Em um estudo de 2008⁶⁷, não foi observada associação entre estresse na primeira metade da gestação e pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional em mulheres nulíparas. Entretanto, em um trabalho mais recente, Shamsi e

colaboradores ⁶⁸ relataram haver associação entre o desenvolvimento de pré-eclâmpsia e estresse mental durante a gravidez.

Tomados em conjunto, nossos dados sugerem que a regulação dos componentes imunológicos no sangue periférico pode ser importante na modulação de funções efetoras de células envolvidas na manutenção de uma gravidez saudável. Alterações nos níveis protéicos de moléculas do sistema imune, bem como a presença de distúrbios emocionais parecem estar relacionadas com desenvolvimento de complicações gestacionais, como a pré-eclâmpsia. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares e os eventos periféricos específicos na rede imunológica envolvidos na manutenção da gravidez de sucesso ou no desenvolvimento fisiopatológico de complicações gestacionais, como a pré-eclâmpsia.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelas agências de fomento “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq, Brasil) #401423/2004-2 e “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES, Brasil).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medawar PB: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates: revention of allogeneic fetal rejection by tryptoPhan catabolism. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1953;7: 320–338.
2. Mold JE *et al*: Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science.* 2008;322(5907):1562-5
3. Kovats S *et al*: A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990;248(4952):220-3.
4. Crisa L *et al*: Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med.* 1997;186(2):289-98.
5. Le Discorde M *et al*: Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. *Hum Immunol.* 2003;64(11):1039-44.
6. Le Rond S *et al*: Alloreactive CD4+ and CD8+ T cells express the immunotolerant HLA-G molecule in mixed lymphocyte reactions: in vivo implications in transplanted patients. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):649-60.
7. Alegre E *et al*: Maternal antigen presenting cells are a source of plasmatic HLA-G during pregnancy: longitudinal study during pregnancy. *Hum Immunol.* 2007;68(8):661-7.
8. Feger U *et al*: HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood.* 2007;110(2):568-77.

9. Van der Ven K, Pfeiffer K, Skrabin S: HLA-G polymorphisms and molecule function--questions and more questions--a review. *Placenta*. 2000;21 Suppl A:S86-92.
10. Fuzzi B *et al*: HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol*. 2002;32(2):311-5.
11. Pfeiffer KA *et al*: Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Hum Immunol*. 2000;61(6):559-64.
12. Steinborn A *et al*: Placental abruption is associated with decreased maternal plasma levels of soluble HLA-G. *J Clin Immunol*. 2003;23(4):307-14.
13. Yie SM *et al*: HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(2):525-9.
14. Carosella ED *et al*: HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. *Hum Immunol*. 2008;69(11):700-7.
15. Vianna P *et al*: Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol*. 2007;68(8):668-74.
16. Colbern GT, Chiang MH, Main EK: Expression of the nonclassical histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;170(5 Pt 1):1244-50.
17. Hara N *et al*: Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol*. 1996;36(6):349-58.

18. Lim KH *et al*: Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol.* 1997;151(6):1809-18.
19. Hackmon R *et al*: Reduced third-trimester levels of soluble human leukocyte antigen G protein in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2007;197(3):255.e1-5.
20. Rousseau P *et al*: The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol.* 2003;64(11):1005-10.
21. Veit TD, Chies JA: Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *Transpl Immunol.* 2009;20(4):229-31.
22. Roberts JM *et al*: Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(5):1200-4.
23. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M: Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005;365(9461):785-99.
24. Marcus, SM: Depression during pregnancy: rates, risks and consequences-- Motherisk Update 2008. *Can J Clin Pharmacol.* 2009;16(1):e15-22.
25. Marcus SM, Heringhausen, JE: Depression in childbearing women: when depression complicates pregnancy. *Prim Care.* 2009;6(1):151-65, ix.
26. Qiu C *et al*: Associations of depression and depressive symptoms with preeclampsia: results from a Peruvian case-control study. *BMC Womens Health.* 2007;7:15.
27. Kurki T *et al*: Depression and anxiety in early pregnancy and risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000;95(4):487-90.

28. Bizzarri C *et al*: Selective inhibition of interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis by ketoprofen isomers. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(11):1429-37.
29. Bauer ME *et al*: Dexamethasone-induced effects on lymphocyte distribution and expression of adhesion molecules in treatment-resistant depression. *Psychiatry Res.* 2002;113(1-2):1-15.
30. Bauer ME *et al*: Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *J Neuroimmunol.* 2000;103(1):84-92.
31. Dhabhar FS *et al*: Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol.* 1995;154(10):5511-27.
32. Piccinni MP *et al*: Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol.* 1995;155(1):128-33.
33. Tibbetts TA, Conneely OM, O'Malley BW: Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 1999;60(5):1158-65.
34. Bauer M, Collaziol D, Preissler T: Avaliação da proliferação linfocitária e sensibilidade a glicocorticóides por ensaios colorimétricos. *R Med PUCRS* 2002;12:226-231.
35. Collaziol D *et al*: Padronização de ensaios colorimétricos para avaliação da proliferação linfocitária e sensibilidade à glicocorticóides in vitro. *Anais do II Salão de Iniciação Científica da PUCRS* 2001.

36. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983;65(1-2):55-63.
37. Lahiri DK, Nurnberger JI Jr.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
38. Phenol-Chloroform Extraction. Laboratório Herman Lab, Universidade do Estado de Kansas, Estados Unidos. Disponível em : <<http://www.k-state.edu/hermanlab/protocols/phenolppt.html>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2010.
39. Protocolo para Extração de DNA de Sangue – Fenol – Rodrigo. Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Disponível em : <<http://www.icb.ufmg.br/lbem/protocolos/extracaoDNAfenol.html>>. Acesso em: 02 de Fevereiro de 2010.
40. Cordero EA *et al*: HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens*. 2009;74(4):308-13.
41. Humphrey KE *et al*: HLA-G deletion polymorphism and pre-eclampsia/eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;102(9):707-10.
42. Lin A *et al*: Maternal human leukocyte antigen-G polymorphism is not associated with pre-eclampsia in a Chinese Han population. *Tissue Antigens*. 2006;68(4):311-6.
43. Iversen AC *et al*: The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidual HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies. *J Reprod Immunol*. 2008;78(2):158-65.

44. Fujii T, Ishitani A, Geraghty DE: A soluble form of the HLA-G antigen is encoded by a messenger ribonucleic acid containing intron 4. *J Immunol.* 1994;153(12):5516-24.
45. Hiby SE *et al*: Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens.* 1999;53(1):1-13.
46. Hviid TV *et al*: HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics.* 2003; 55(2):63-79.
47. Bermingham J *et al*: Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans.* 2000 Feb;28(2):215-9.
48. Hylenius S *et al*: Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(4):237-46.
49. O'Brien M *et al*: Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(12-13):1943-9.
50. Castelli EC *et al*: The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun.* 2010;11(2):134-41.
51. Yie SM, Taylor RN, Librach C. Low plasma HLA-G protein concentrations in early gestation indicate the development of preeclampsia later in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(1):204-8.
52. Le Bouteiller P, Mallet V: HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod.* 1997;2(1):7-13.

53. Hunt JS *et al*: HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *FASEB J*. 2005;19(7):681-93.
54. Natarajan K *et al*: Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry*. 2000;39(48):14779-86.
55. Prado-Drayer A, Teppa J, Sánchez P, Camejo MI: Immunophenotype of peripheral T lymphocytes, NK cells and expression of CD69 activation marker in patients with recurrent spontaneous abortions, during the mid-luteal Phase. *Am J Reprod Immunol*. 2008;60(1):66-74.
56. Ashkar AA, Croy BA: Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. *Semin Immunol*. 2001;13(4):235-41.
57. Mottet C, Golshayan D: CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly*. 2007;137(45-46):625-34.
58. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ: How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(7):523-32.
59. Paeschke S *et al*: Pre-eclampsia is not associated with changes in the levels of regulatory T cells in peripheral blood. *Am J Reprod Immunol*. 2005;54(6):384-9.
60. Toldi G *et al*: Decreased number of FoxP3+ regulatory T cells in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(11):1229-33.
61. Prins JR *et al*: Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertens Pregnancy*. 2009;28(3):300-11.

62. Sasaki Y *et al*: Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol*. 2007;149(1):139-45.
63. Michael AE, Papageorghiou AT: Potential significance of physiological and Pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2008;14(5):497-517.
64. Pedersen CA, Folds JD, Evans DL: Dexamethasone effects on numbers of cells in lymphocyte subpopulations: changes associated with major depression and DST nonsuppression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1989;13(6):895-906.
65. Rupprecht R *et al*: In vivo and in vitro effects of glucocorticoids on lymphocyte proliferation in depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1991;241(1):35-40.
66. Wodarz N *et al*: Normal lymphocyte responsiveness to lectins but impaired sensitivity to in vitro glucocorticoids in major depression. *J Affect Disord*. 1991;22(4):241-8.
67. Vollebregt KC *et al*: Is psychosocial stress in first ongoing pregnancies associated with pre-eclampsia and gestational hypertension?. *BJOG*. 2008;115(5):607-15.
68. Shamsi U *et al*: A multicentre matched case control study of risk factors for Preeclampsia in healthy women in Pakistan. *BMC Womens Health*. 2010;10(1):14.

TABELAS E FIGURAS

Tabela I - Equilíbrio de Hardy-Weinberg para genótipo HLA-G 3' UTR 14pb entre mulheres com pré-eclâmpsia, controle e sem complicações gestacionais.

Genótipo HLA-G (polimorfismo 3'UTR)	Gestantes com pré- eclâmpsia (n = 21) [(freq)]		Gestantes controle (n = 21) [(freq)]		Gestantes sem complicações (n = 6) [(freq)]	
		χ^2		χ^2		χ^2
-14 pb/+14 pb						
Número observado	14 (0,66)	1,71	14 (0,66)	1,71	4 (0,7)	0,63
Número esperado	9,89		9,89		2,69	
+14 pb/+14 pb						
Número observado	6 (0,29)	0,53	6 (0,29)	0,53	2 (0,3)	0,16
Número esperado	8,07		8,07		2,65	
-14 pb/-14 pb						
Número observado	1 (0,05)	1,36	1 (0,05)	1,36	0 (0,0)	0,65
Número esperado	3,03		3,03		0,65	
Total		3,6		3,6		1,44

χ^2 tabelado ($\alpha = 0,05$; gl = 1) = 3,84 ($p > 0,05$).

gl = grau de liberdade; freq = frequência

Tabela II - Distribuição geral dos genótipos e das frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo HLA-G 3' UTR 14pb em gestantes com pré-eclâmpsia, controle e sem complicações gestacionais.

	Gestantes com pré-eclâmpsia (n = 21) [(freq)]	Gestantes controle (n = 21) [(freq)]	Gestantes sem complicações (n = 6) [(freq)]
Genótipo HLA-G			
(polimorfismo 3'UTR)			
-14 pb/+14 pb	14 (0,66) ^{a,c}	14 (0,66) ^a	4 (0,7) ^c
+14 pb/+14 pb	6 (0,29) ^{a,c}	6 (0,29) ^a	2 (0,3) ^c
-14 pb/-14 pb	1 (0,05) ^{a,c}	1 (0,05) ^a	0 (0,0) ^c
Alelo HLA-G			
(polimorfismo 3'UTR)			
deleção de 14 pb	16 (0,38) ^{b,d}	16 (0,38) ^b	4 (0,33) ^d
inserção de 14 pb	26 (0,62) ^{b,d}	26 (0,62) ^b	8 (0,67) ^d

^a $\chi^2 = 0,00$, gl = 2, $p = 1,00$; ^b $\chi^2 = 0,00$, gl = 1, $p = 1,00$;
^c $\chi^2 = 0,351$, gl = 1, $p = 0,554$; ^d $\chi^2 = 0,321$, gl = 2, $p = 0,852$.

gl = grau de liberdade; freq = frequência

Tabela III – Distribuição dos haplótipos del/C, del/G, ins/C e ins/G e frequências haplotípicas nos grupos de gestantes controle, com pré-eclâmpsia e sem complicações gestacionais.

Haplótipos	Gestantes controle	Gestantes com pré-eclâmpsia	Gestantes sem complicações
	(n = 21)	(n = 21)	(n = 6)
	Nº de haplótipos (freq)	Nº de haplótipos (freq)	Nº de haplótipos (freq)
del/C	9 (0,21)	13 (0,3)	4 (0,33)
del/G	7 (0,17)	9 (0,22)	1 (0,08)
ins/C	7 (0,17)	3 (0,08)	0 (0,00)
ins/G	19 (0,45)	17 (0,40)	7 (0,58)

$p > 0,05$.

gl = grau de liberdade; freq = frequência

del/C = deleção de 14pb/C; del/G; deleção de 14pb/G; ins/C = inserção de 14pb/C; ins/G = inserção de 14pb/G

Tabela IV – Frequências de expressão das populações celulares analisadas nas células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de gestantes com pré-eclâmpsia, controle ou sem complicações.

	PE (n= 26)		Controle (n=25)		valor- <i>p</i>	Sem complicações (n=6)		
	ME	DP	ME	DP		ME	DP	valor- <i>p</i>
CD4+ / CD69+	36,6%	10,8	30,9%	10,5	0,040	25,2%	8,5	0,053
Células NK	9,0%	0,3	8,3%	0,4	0,423	10,4%	0,08	0,423
HLA-G em linfócitos	1,6%	2,0	2,7%	2,4	0,006	5,2%	2,0	0,005
HLA-G em monócitos	40,2%	22,6	59,1%	19,8	0,001	78,2%	9,5	0,002
ILT-2 em monócitos	50,0%	26,7	55,1%	28,1	0,512	65,1%	26,6	0,512
Treg freq	6,9%	3,7	6,1%	2,54	0,194	4,3%	1,0	0,194
Treg mfi	174,4	70,2	100,0	75,0	0,022	124,2	33,8	0,274

Valores em **negrito**: $p < 0,05$.

PE = grupo de gestantes com pré-eclâmpsia; ME = média de expressão; DP = desvio padrão; Treg freq = frequência de células T regulatórias; Treg mfi = média de intensidade de fluorescência das células T regulatórias.

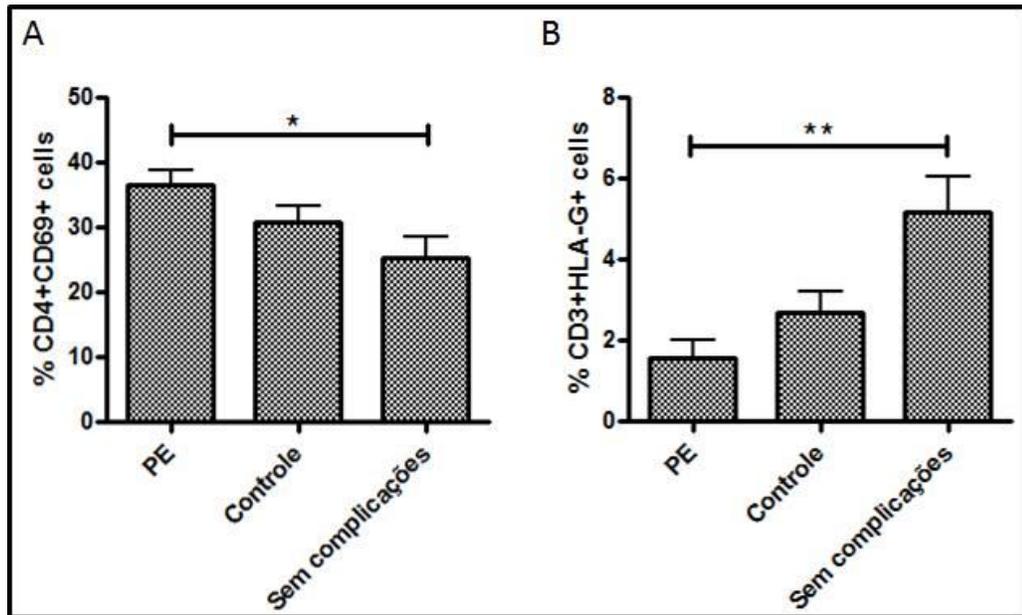


Figura 1 - Expressão de marcadores de superfície celular em CMSPs de gestantes com pré-eclâmpsia, controle e sem complicações. O fenótipo de linfócitos periféricos foi determinado através da utilização de anticorpos específicos, após a estimulação antigênica com Pha. Nós encontramos alta expressão de células TCD4+CD69+ em gestantes com pré-eclâmpsia em relação às sem complicações ($p=0,04$) (A). Em relação a frequência de expressão de células TCD3+HLA-G+, os resultados mostraram reduzida expressão linfocítica de HLA-G em gestantes com PE em relação ao grupo sem complicações ($p=0,005$) (B).

PE = grupo de gestantes com pré-eclâmpsia, **CMSPs** = Células mononucleares de sangue periférico; **Pha** = fitohemaglutinina.

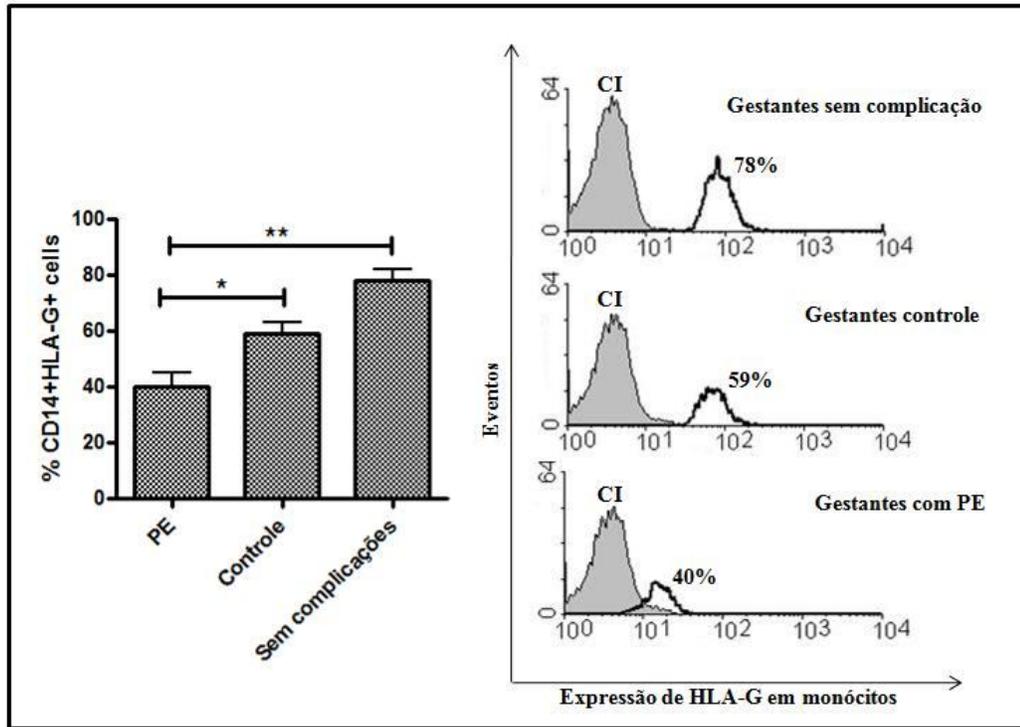


Figura 2 – Expressão de HLA-G na superfície de monócitos das gestantes com PE, controle e sem complicações. Após o tratamento com Pha, as células mononucleares do sangue periférico das gestantes foram fenotipadas, utilizando anticorpos específicos para HLA-G e CD14. Os resultados mostram uma expressão de HLA-G diminuída nos monócitos (CD14+HLA-G+) de gestantes com PE em relação a expressão encontrada para o grupo controle e para o grupo sem complicações ($p=0,012$ e $p=0,002$, respectivamente), sendo as médias de expressão de cada grupo mostradas nos histogramas (78% nas gestantes sem complicação, 59% nas gestantes controle e 40% nas gestantes com PE).

PE = grupo de gestantes com pré-eclâmpsia; **CI** = controle de isotipo; **Pha** = fitohemaglutinina.

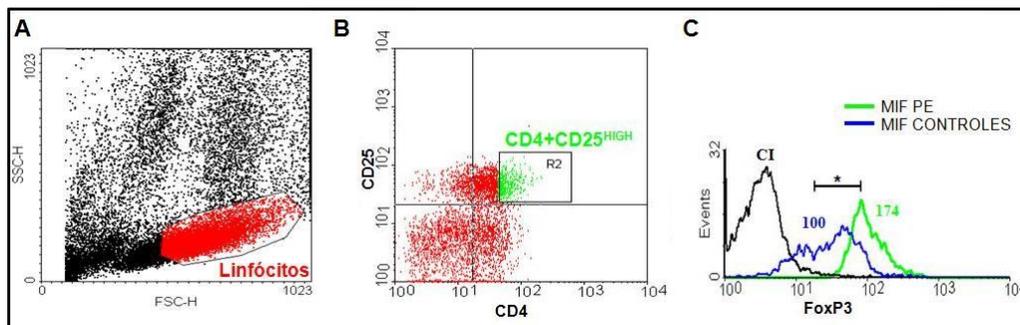


Figura 3 – Análise da expressão de *FoxP3* nas células T regulatórias das gestantes com PE e das gestantes controle. Após o tratamento com Pha, as células mononucleares do sangue periférico foram fenotipadas, utilizando anticorpos específicos para CD25, Foxp3 e CD4. Para a análise de expressão de FoxP3 nas células Treg, primeiramente a população de linfócitos era delimitada (A), em seguida as células Treg CD4+CD25^{high+} da população de linfócitos eram identificadas (B), criando-se, após, um histograma da área na qual as células Treg CD4+CD25^{high+} encontravam-se dispostas para determinar, então, a intensidade de expressão de FoxP3 (C). Os resultados encontrados no nosso estudo revelaram uma MIF da expressão de FoxP3 elevada nas Treg das gestantes com PE em relação as gestantes controle ($p=0,02$) (C).

Histograma azul: mfi do grupo controle; **Histograma verde:** mfi do grupo de gestantes com PE. **CI** = controle de isotipo; **MIF** = média de intensidade de fluorescência; **PE** = pré-eclâmpsia; **MIF PE** = média de intensidade de fluorescência das gestantes do grupo das gestantes com pré-eclâmpsia; **MIF CONTROLES** = média de intensidade de fluorescência das gestantes do grupo controle; **Treg** = células T regulatórias.

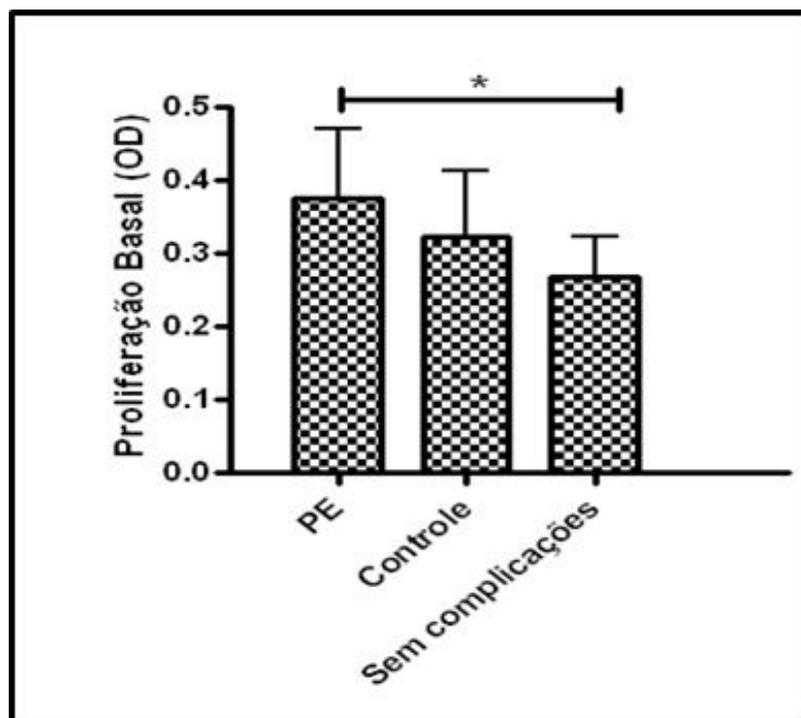


Figura 4 – Ensaio de proliferação celular basal por MTT. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram cultivadas por 96 horas em meio completo sem Pha para a determinação de sua proliferação basal. Os resultados revelam uma maior média de proliferação celular basal em mulheres com pré-eclâmpsia (OD 0,374 ± 0,096) quando comparada às mulheres sem complicações gestacionais (OD 0,269 ± 0,054) ($p=0,03$). As gestantes do grupo controle apresentaram uma média de proliferação celular basal de OD 0,323 ± 0,09.

PE = grupo de gestantes com PE; **Controle** = grupo de gestantes controle; **Sem complicações** = grupo de gestantes sem complicações; **MTT** = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-brometo de 2,5-dimetiltetrazólio; **Pha** = fitohemaglutinina.

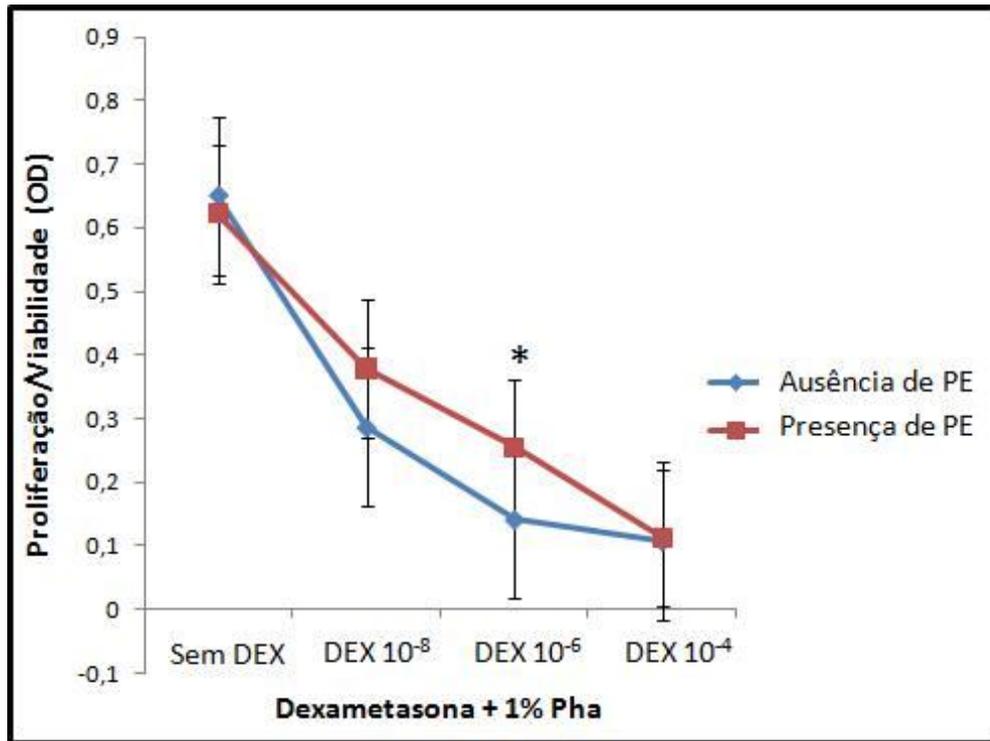


Figura 5 – Ensaio de proliferação celular na presença ou ausência do glicocorticóide dexametasona. As células mononucleares do sangue periférico das gestantes com PE, controle e sem complicações foram cultivadas por 96h em meio completo com 1% de Pha, contendo dexametasona nas concentrações 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} (molar) ou não contendo esse glicocorticóide. O gráfico mostra a média de proliferação celular das gestantes com PE e controle em cada concentração de dexametasona analisada, bem como na ausência desse corticosteróide. Os nossos resultados revelaram uma maior média de proliferação celular nas gestantes com PE em relação as controle na presença de uma concentração de 10^{-6} de dexametasona ($p < 0.03$).

Linha azul = gestantes controle; **linha vermelha** = gestantes com PE. **PE** = pré-eclâmpsia; **DEX** = dexametasona; **Pha** = fitohemaglutinina.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho abordou alguns mecanismos imunorreguladores presentes durante o desenvolvimento de uma gestação complicada ou não por pré-eclâmpsia e de gestação sem complicação. A pré-eclâmpsia é uma patologia que apresenta uma etiologia imunológica baseada na maladaptação imunológica do sistema materno em relação à presença do feto semi-alogênico. Desta forma, a abordagem dos mecanismos efetores imunológicos que medeiam a gestação é fundamental para o correto entendimento do mecanismo de ação e desenvolvimento desta patologia. Esperamos poder ter contribuído para a elucidação de parte deste mecanismo de regulação imunológica da pré-eclâmpsia. Ao longo deste trabalho, observamos que as células NK periféricas encontram-se em frequências iguais tanto na gestação não complicada, quanto na complicada por PE ou seu grupo controle. Porém, descrevemos que gestantes sem complicações gestacionais apresentam uma maior frequência de expressão de HLA-G em linfócitos e monócitos em relação a gestantes com PE ou o grupo controle destas. Desta forma, salientamos a importância da expressão e regulação da molécula HLA-G na manutenção de uma gestação saudável, como uma molécula imunossupressora, capaz de controlar possíveis mecanismos inflamatórios excessivos. Alterações tanto nos níveis protéicos expressos na superfície celular quanto nas frequências de polimorfismos no gene desta molécula foram avaliados neste trabalho. Sendo assim, propusemo-nos a estudar também alguns aspectos imunogenéticos que pudessem contribuir para a elucidação da patogênese da pré-eclâmpsia e sua relação com HLA-G. Avaliamos a frequência de variantes polimórficas no gene HLA-G e sua relação com o desenvolvimento de PE, porém não encontramos diferenças significativas entre as frequências destas variantes alélicas e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia. Contudo, quando avaliamos a expressão do receptor de HLA-G (ILT-2) na superfície de monócitos, não encontramos diferenças marcantes nas frequências de expressão celular deste receptor em gestantes com PE, controle ou sem complicações gestacionais. Em relação ao perfil de ativação celular, observamos que as gestantes com PE apresentam altas frequências de linfócitos T CD4 recém ativados (CD69+) quando comparadas às gestantes sem complicações gestacionais. Esta característica

de ativação pode ser responsável pelo ambiente inflamatório desregulado na patofisiologia da PE.

Observamos ainda que, gestantes com pré-eclâmpsia apresentam uma maior resistência à ação antiinflamatória dos glicocorticóides (no caso dexametasona) em ensaios de proliferação celular, o que pode indicar um aumento do nível de estresse nestas pacientes, acarretando resistência a ação destes hormônios. Vimos também que as células Treg apresentam média de intensidade de fluorescência de Foxp3 elevada em gestantes com pré-eclâmpsia e isso acarreta conseqüências imunológicas para a homeostase da gestação. Como estas células desempenham funções regulatórias supressoras importantes, o aumento desta expressão pode significar uma tentativa de controlar um ambiente inflamatório exacerbado durante a pré-eclâmpsia. Por outro lado, a diminuição da frequência de células Treg pode levar a um ambiente imunológico menos regulado, mais inflamatório e conseqüentemente mais agressivo ao feto.

Apesar de avaliar inúmeros marcadores imunológicos de interesse que influenciam o perfil de uma gestação de sucesso ou não, este trabalho apresenta limitações que devem ser consideradas: (1) o tamanho amostral reduzido pode ser um fator contribuinte para a ausência de significância estatística nas análises genéticas de HLA-G como representante de uma amostra populacional. Porém, a avaliação em conjunto da relação entre os níveis protéicos de HLA-G e seu perfil gênico nas mesmas pacientes, torna-se um ponto forte deste trabalho. Ainda, (2) a dosagem dos níveis séricos da molécula HLA-G solúvel através de técnicas como ELISA seria um fator contribuinte para os dados aqui apresentados. De outra forma, (3) amostras de placenta ou cordão umbilical poderiam ser obtidas visando comparar os componentes imunológicos avaliados neste trabalho em sangue periférico, com os expressos diretamente na interface materno-fetal. Ainda, (4) a dosagem de cortisol em cada gestante poderia complementar as análises de resistência a ação de glicocorticóides durante a proliferação celular, visto que este hormônio atua como medidor dos níveis de estresse. Porém, cabe ressaltar o fato de que as análises nos níveis de cortisol estão em andamento em nosso laboratório a partir de amostras salivares coletadas das gestantes aqui avaliadas.

Neste trabalho avaliamos as alterações imunológicas durante a gestação focando o envolvimento das alterações imunogenéticas e efetoras no desenvolvimento de complicações como a pré-eclâmpsia. Torna-se relevante o

potencial imunorregulador da molécula HLA-G, contribuindo para um melhor entendimento do processo da patogênese da pré-eclâmpsia. Os dados aqui apresentados reforçam o fato de que componentes imunológicos desempenham papel fundamental no controle da aceitação materna ao feto e agem em conjunto, numa delicada rede de interações. Porém, mais estudos são necessários para se entender completamente a rede de imunorregulação de uma gestação bem sucedida.

BIBLIOGRAFIA ADICIONAL

Aagaard-Tillery MK, Silver R, Dalton J. Immunology of normal pregnancy. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 2006;11:279-295.

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular.* Rio de Janeiro, Elsevier, 5ª ed., 2005.

Alegre E, Díaz-Lagares A et al. Referência correspondente a referência 7 do artigo científico.

Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004;5(3):266-71.

Aoki CA, Borchers AT et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2005;4(7):450-9.

Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol.* 2008;29(7):313-21.

Bauer ME, Gauer GJ et al. Evaluation of immune parameters in depressed patients. *Life Sci.* 1995;57(7):665-74.

Bauer ME, Papadopoulos A et al. Referência correspondente a referência 29 do artigo científico.

Bauer ME, Vedhara K et al. Referência correspondente a referência 30 do artigo científico.

Bellinger DL, Lubahn C, Lorton D. Maternal and early life stress effects on immune function: relevance to immunotoxicology. *J Immunotoxicol.* 2008;5(4):419-44.

Bizzarri C, Pagliei S et al. Referência correspondente a referência 28 do artigo científico.

Boros P, Bromberg JS. Human FOXP3+ regulatory T cells in transplantation. *Am J Transplant.* 2009;9(8):1719-24.

Bulletti C, Flamigni C, Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update.* 1996;2(2):118-36.

Carosella E D, Moreau P et al. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;81:199-252.

Carosella ED, HoWangYin KY et al. Referência correspondente a referência 14 do artigo científico.

Caumartin J, Favier B et al. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 2007;26(5):1423-33.

Chen Q, Chen L et al. The role of autocrine TGF- β 1 in endothelial cell activation induced by Phagocytosis of necrotic trophoblasts: a possible role in the pathogenesis of pre-eclampsia. *J Pathol.* 2010;221(1):87-95.

Colbern GT, Chiang MH, Main EK. Referência correspondente a referência 16 do artigo científico.

Corthay A. How do regulatory T cells work?. *Scand J Immunol.* 2009;70(4):326-36.

Crisa L, McMaster MT et al. Referência correspondente a referência 4 do artigo científico.

Dekker G, Robillard PY. Pre-eclampsia: Is the immune maladaptation hypothesis still standing? An epidemiological update. *J Reprod Immunol.* 2007;7 6(1-2):8-16.

Dekker GA, Sibai BM. Referência correspondente a referência 41 do artigo científico.

Dhabhar FS, Miller AH et al. Referência correspondente a referência 31 do artigo científico.

El-Baradie SM, Mahmoud M, Makhoulouf HH. Elevated serum levels of interleukin-15, interleukin-16, and human chorionic gonadotropin in women with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can.* 2009;31(2):142-8.

Feger U, Tolosa E et al. Referência correspondente a referência 8 do artigo científico.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.

Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol.* 1988;140(12):4245-52.

Gill, SK, O'brien L et al. The safety of proton pump inhibitors (PPIs) in pregnancy: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(6):541-5.

Greer IA, Lyall F et al. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction?. *Obstet Gynecol.* 1994;84(6):937-40.

Griebel CP, Halvorsen J et al. Management of spontaneous abortion. *Am Fam Physician.* 2005;72(7):1243-50.

Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?. Hum Reprod Update. 2009;15(5):517-35.

Guleria I, Sayegh MH. Maternal Acceptance of the Fetus: True Human Tolerance. J. Immunol. 2007;178:3345-3351.

Hackmon R, Koifman A et al. Referência correspondente a referência 19 do artigo científico.

Handsuh K, Guibourdenche J et al. Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast But Not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and Is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . Endocrinology. 2007;148(10):5011–5019.

Hanson FW, Powell JE, Stevens VC. Effects of HCG and human pituitary LH on steroid secretion and functional life of the human corpus luteum. J Clin Endocrinol Metab. 1971;32(2):211-5.

Hara N, Fujii T et al. Referência correspondente a referência 17 do artigo científico.

Hayashi M, Ohkura T, Inaba N. Elevation of serum macroPhage colony-stimulating factor before the clinical manifestations of preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 2003;189(5):1356-60.

Hoffman S, Hatch MC. Depressive symptomatology during pregnancy: evidence for an association with decreased fetal growth in pregnancies of lower social class women. Health Psychol. 2000;19(6):535-43.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003;299(5609):1057-61.

Hunt JS, Petroff MG et al. Referência correspondente a referência 54 do artigo científico.

Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen O B. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. Tissue Antigens. 2004;64(1):66-9.

Hviid TV, Hylenius S, Rørbye C, Nielsen LG. Referência correspondente a referência 47 do artigo científico.

Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. Tissue Antigens. 2002; 60(2):122-32.

Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. Hum Reprod Update. 2006;12(3):209-32.

Hylenius S, Andersen AM et al. Referência correspondente a referência 49 do artigo científico.

Islami D, Mock P, Bischof P. Effects of human chorionic gonadotropin on trophoblast invasion. *Semin Reprod Med.* 2001;19(1):49-53.

Karumanchi SA, Lindheimer MD. Advances in the understanding of eclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2008;10(4):305-12.

Kay G, Tarcic N et al. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav.* 1998;63(3):397-402.

Kovats S, Main E K et al. Referência correspondente a referência 3 do artigo científico.

Kurki T, Hiilesmaa V et al. Referência correspondente a referência 27 do artigo científico.

La Cava A. Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008;8(1):83-7.

Lafdil F, Miller AM et al. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cellular and Molecular Immunology*, 2010, 22 Mar. [Epub ahead of print]

Le Discorde M, Moreau P et al. Referência correspondente a referência 5 do artigo científico.

Le Rond S, Le Maoult J et al. Referência correspondente a referência 6 do artigo científico.

LeMaoult J, Caumartin J et al. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood.* 2007;109(5):2040-8.

Liblau RS, Singer SM et al. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1995;16:34–38.

Lim K H, Zhou Y et al. Referência correspondente a referência 18 do artigo científico.

Lin H, Mosmann TR, et al. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol.* 1993;151(9):4562-73.

Loke YW, King A. Decidual natural-killer-cell interaction with trophoblast: cytolysis or cytokine production?. *Biochem Soc Trans.* 2000;28(2):196-8.

Mahmoud F, Omu A et al. Lymphocyte subpopulations in pregnancy complicated by hypertension. *J Obstet Gynaecol.* 2003;23(1):20-6.

Marcus SM, Heringhausen JE. Referência correspondente a referência 25 do artigo científico.

Marzi M, Vigano A et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. Clin Exp Immunol. 1996; 106(1):127-33.

Medawar PB. Referência correspondente a referência 1 do artigo científico.

Michael AE, Papageorghiou AT. Referência correspondente a referência 64 do artigo científico.

Moffett A, Hiby SE. How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia?. Placenta. 2007;28 Suppl A:S51-6.

Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. Nat Rev Immunol. 2002;2(9):656-63.

Morel PA, Oriss TB. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. Crit Rev Immunol. 1998;18(4):275-303.

Mottet C, Golshayan D. Referência correspondente a referência 58 do artigo científico.

Munn D H, Zhou M et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptoPhan catabolism. Science. 1998;281(5380):1191-3.

Nolan. Anthony Nolan Research Institute. 2010. Acessado em: 16 de junho de 2010.

Opas. Organização Pan-Americana da Saúde - Opas, Organização Mundial da Saúde. Grupo de consulta da: Prevenção e controle das enfermidades genéticas e dos defeitos congênitos. 1984.

Orr ST, James SA, Blackmore Prince C. Maternal prenatal depressive symptoms and spontaneous preterm births among African-American women in Baltimore, Maryland. Am J Epidemiol. 2002;156(9):797-802.

Paeschke S, Chen F et al. Referência correspondente a referência 60 do artigo científico.

Parham P. Immunology: keeping mother at bay. Curr Biol. 1996;6(6):638-41.

Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. J Exp Med. 2004;200(8):951-5.

Pedersen CA, Folds JD, Evans DL. Referência correspondente a referência 65 do artigo científico.

Persinger MA, Falter H. Infantile stimulation produces mild enhancement in a primary humoral response of adult albino rats. Psychol Rep. 1992;70(3 Pt 1):976-8.

Petroff MG. Immune interactions at the maternal-fetal interface. *J Reprod Immunol*. 2005;68(1-2):1-13.

Philipp T, Philipp K et al. Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. *Hum Reprod*. 2003;18(8):1724-32.

Piccinni MP, Beloni L et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat. Med*. 1998;4: 1020–1024.

Piccinni MP, Giudizi MG. Referência correspondente a referência 32 do artigo científico.

Pijnenborg R. The placental bed. *Hypertens. Pregnancy*. 1996;15(1):7–23.

Pollard JW. Uterine DCs are essential for pregnancy. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3832-5.

Ponte M, Cantoni C et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5674-9.

Prins JR, Boelens HM et al. Referência correspondente a referência 62 do artigo científico.

Probhala RH, Wira CR. Sex hormones and IL-6-regulation of antigen presentation in the female reproductive tract mucosal tissues. *J Immunol*. 1995;155: 5566-5573.

Qiu C, Sanchez SE et al. Referência correspondente a referência 26 do artigo científico.

Quenby S, Farquharson R. Uterine natural killer cells, implantation failure and recurrent miscarriage. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(1):24-8.

Quenby S, Kalumbi C et al. Prednisolone reduces preconceptual endometrial natural killer cells in women with recurrent miscarriage. *Fertil Steril*. 2005;84(4):980-4.

Rahangdale, L. Infectious complications of pregnancy termination. *Clin Obstet Gynecol*. 2009;52(2):198-204.

Rebmann V, van der Ven K et al. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens*. 2001;57(1):15-21.

Redman CW, Sargent IL. Immunology of Pre-Eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):534–543.

Reul JM, Stec I et al. Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2600-7.

Ringler GE, Kallen CB, Strauss JF3º. Regulation of human trophoblast function by glucocorticoids: dexamethasone promotes increased secretion of chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 1989;124(4):1625-31.

Roberts JM, Taylor RN et al. Referência correspondente a referência 22 do artigo científico.

Robillard PY. Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. *J Reprod Immunol.* 2002;53(1-2):279-87.

Rouas-Freiss N, Bruel S et al. Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. *Int J Cancer.* 2005;117(1):114-22.

Rupprecht R, Wodarz N et al. Referência correspondente a referência 66 do artigo científico.

Saito S, Sakai M et al. Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia . *J Reprod Immunol.* 2007;76(1-2):30-9.

Saito S, Sasaki Y, Sakai M. CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2005;65(2):111-20.

Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S116-23.

Sarafana S, Coelho R et al. Gestational immunology. *Acta Med Port.* 2007;20(4):355-8.

Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(5):680-6.

Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D et al. Referência correspondente a referência 63 do artigo científico.

Sasaki Y, Sakai M et al. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(5):347-53.

Shamsi U, Hatcher J et al. Referência correspondente a referência 69 do artigo científico.

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Referência correspondente a referência 23 do artigo científico.

Somerset DA, Zheng Y et al. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*. 2004;112(1): 38–43.

Sornasse T, Larenas PV et al. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med*. 1996;184(2):473-83.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683–747.

Sperber K, Hom C et al. Systematic review of hydroxychloroquine use in pregnant patients with autoimmune diseases . *Pediatr Rheumatol Online J*. 2009;7:9.

Srisuparp S, Strakova Z, Fazleabas AT. The role of chorionic gonadotropin (CG) in blastocyst implantation. *Arch Med Res*. 2001;32(6):627-34.

Szekeres-Bartho J, Faust Z et al. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. *Am J Reprod Immunol*. 1996;35(4):348-51.

Szekeres-Bartho J, Halasz M, Palkovics T. Progesterone in pregnancy; receptor-ligand interaction and signaling pathways. *J Reprod Immunol*. 2009; (1-2):60-4.

Tan Z, Randall G et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet*. 2007;81(4):829-34.

Taylor RN, Grimwood J et al. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(1):177-82.

Toldi G, Svec P et al. Referência correspondente a referência 61 do artigo científico.

Tripathi P, Abbas A et al. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens*. 2004;64(6):706-10.

Trogstad L, Magnus P et al. Previous abortions and risk of pre-eclampsia. *International Journal of Epidemiology*. 2008;37(6):1333-1340

Trowsdale, J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol*. 2006;7(3):241-6.

Van der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S. Referência correspondente a referência 9 do artigo científico.

Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*. 1998;280(5361):243-8.

Veit TD, Chies JA. Referência correspondente a referência 21 do artigo científico.

Veit TD, Vianna P, Chies JA. HLA-G - From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases. *Current Immunology Reviews*.2010;6(1):1-15.

Vianna P, Chies JA. Maternal exposure to paternal antigens can modulate the foetus immune system and is associated with reduced atopy in the childhood. *Bioscience Hypotheses*. 2008;1(5):248-250

Vianna P, Dalmáz CA et al. Referência correspondente a referência 15 do artigo científico.

Signalí DA, Collison LW, Workman CJ. Referência correspondente a referência 59 do artigo científico.

Vinatier D, Monnier JC. Pre-eclampsia: physiology and immunological aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995;61(2):85-97.

Vollebregt KC, van der Wal MF et al. Referência correspondente a referência 68 do artigo científico.

Wilcox AJ, Weinberg CR et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med*. 1988; 319:189-94.

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

Wilczyński JR, Tchórzewski H et al. Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. *Mediators Inflamm*. 2002;11(2):105-11.

Wodarz N, Rupperecht R et al. Referência correspondente a referência 67 do artigo científico.

Yie SM, Li LH et al. Referência correspondente a referência 13 do artigo científico.

Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of the human trophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. *J. Clin. Invest*. 1997;99(9):2152–2164.

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Cara senhora,

A chance de uma mulher ganhar um bebê com saúde e levá-lo para casa depende, entre outras coisas, do meio ambiente (comida, poluição, etc.) e das características genéticas dos pais. Algumas mulheres não conseguem ter esses bebês, pois abortam. Os motivos que levam ao aborto ainda não estão muito claros. Acredita-se que mãe não consiga “segurar” a gravidez por problemas imunes e genéticos (rejeição feita pelo sistema de defesa do corpo humano).

Estamos convidando a senhora a nos ajudar a compreender esses problemas imunogenéticos, através de um estudo que estamos realizando. Para tanto, estamos solicitando a sua permissão para realizarmos colheita do seu sangue e saliva para estudar e avaliar substâncias (partículas ligadas às células do sangue) que estão relacionadas com a chance de ter um bebê. Nós iremos realizar **1 (uma) coleta de sangue**. O sangue será processado imediatamente após coleta para ser analisado e descartado logo após análise, não sendo armazenado para manipulações posteriores. Com ele, iremos fazer estudos das células do sistema de defesa da gestante. Iremos comparar os mecanismos de defesa em gestantes durante diferentes períodos da gestação. O risco associado com essa coleta de sangue é mínimo (hematoma no local onde foi inserida a agulha).

Se houver necessidade de ficar sabendo qual o é resultado do seu exame, a senhora poderá saber, quando o mesmo estiver disponível, sem penalidades ou prejuízo ao seu cuidado. O material obtido não será utilizado para fins comerciais. Fica garantido o sigilo e a privacidade das pacientes quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Os dados gerados serão armazenados por 5 anos e estarão à inteira disposição da senhora para acompanhá-los. A doadora tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo, quando achar necessário, sem que isso traga prejuízos ao seu cuidado. Não há formas de ressarcimento ou de indenização decorrentes da participação na pesquisa.

O professor José Artur Bogo Chies e a aluna de doutorado Priscila Vianna são os biólogos responsáveis pela análise do material cedido pela paciente. **Caso haja a necessidade de maiores explicações, a senhora poderá nos conectar através do número (51) 3308-6740** (com Professor José Artur Bogo Chies), através do endereço: UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale, prédio 43.323 – sala 221 ou ainda pelos emails: priscila.vianna@ufrgs.br e jabchies@terra.com.br. “Qualquer questão ética poderei entrar em contato com a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone (51) 3357-2407”.

Este documento se encontra em duas vias de igual conteúdo e valor.

Eu, _____, abaixo assinada, ciente dos termos acima descritos, permito a colheita de meu sangue para a pesquisa das células CD4+CD25+ e do balanço Th1/Th2 para o estudo do sucesso da minha gravidez.

(Assinatura da doadora)

(Assinatura do pesquisador)

(Assinatura Testemunha)

Porto Alegre, ____ de _____ de 2010

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL NOSSA SENHORA DA
CONCEIÇÃO
GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO
CEPHNSC – GHC**

Porto Alegre, 13 de maio de 2009

O comitê de ética em pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição em 13 de maio de 2009, avaliou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao seguinte projeto de pesquisa:

No CEP / GHC: 143/07

Título do Projeto: Avaliação de alterações no sistema Imunológico em gestantes: análise do envolvimento de células TCD4+CD25+ regulatórias, pré-eclâmpsia e balanço Th1/Th2.

Pesquisador (a): Priscila Vianna

Orientador (a): José Artur Bogo Chies

PARECER:

Documentação: Aprovados

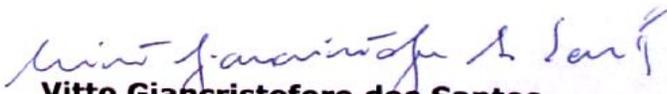
Aspectos metodológicos: Aprovados

Aspectos éticos: Aprovado

Parecer Final: O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por estar de acordo com as diretrizes e normas internacionais e nacionais especialmente as resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de **APROVADO**, neste CEP.

Grupo e área do conhecimento: Projeto pertencente ao grupo III. Área do conhecimento: Ciências da Saúde – Medicina – 4.01.

Considerações finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicados imediatamente ao CEP/GHC. Somente poderão ser utilizados os documentos onde consta a aprovação do CEP/GHC. Após a conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar o relatório final ao Centro de Resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de ética em pesquisa.


Vitto Giancristoforo dos Santos
Coordenador-Geral do CEP - GHC

*ANEXO 3 – Normas para publicação de artigo na revista “American Journal of
Reproductive Immunology”*

American Journal of Reproductive Immunology

Published on behalf of the American Society for Reproductive Immunology and in collaboration with The International Society for the Immunology of Reproduction, The Japanese Society for Immunology of Reproduction and The Israeli Society for Reproductive Immunology

Edited by:

Gil Mor

Print ISSN: 1046-7408

Online ISSN: 1600-0897

Frequency: Monthly

Current Volume: 63 / 2010

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2009: Immunology: 89 / 128;

Reproductive Biology: 14 / 26

Impact Factor: 2.172

Author Guidelines

Please read carefully. Failure to conform to standards outlined here may delay processing.

- 1. Online Submission** - <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri> to submit your manuscript
- 2.** The journal publishes information covering the area of reproductive immunology.
- 3.** The journal is now operating an electronic editorial office. It is therefore recommended that manuscripts are submitted online via <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri>. Detailed instructions and advice are available on the ScholarOne Manuscripts website. The manuscript must include a structured abstract, references, figures, legends, and tables. Please use the assigned reference number in correspondence. Submission of a manuscript will automatically represent that the authors have appropriate authorization from laboratory directors, department chairs, and/or grantees if such authorization is required. Submission is representation that the manuscript has not been published previously and is not currently under consideration for publication elsewhere. All submitted manuscripts must be accompanied by a completed Copyright Transfer Agreement (licensing copyright to Wiley-Blackwell Publishing). The Copyright Transfer Agreement can be downloaded at <http://www.wiley.com/go/ctaaglobal>

Return address for CTAs is as follows:

American Journal of Reproductive Immunology
Editorial Office Editorial Manager

LSOG 305a Department of Obstetrics Gynecology and Reproductive Science
Yale University School of Medicine, 333 Cedar St, New Haven, CT 06510, USA
Email: editor.ajri@yale.edu; Fax: 203-7854883

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article.

With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://www3.interscience.wiley.com/authorresources/onlineopen.html#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://secure.interscience.wiley.com/funded_access.html

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassette or in electronic databases or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher. A covering letter should clearly identify the person (with address, fax, telephone numbers, and e-mail address) responsible for correspondence. Author(s) must also suggest three possible reviewers and mention any person(s) who may have a conflict of interest if requested to review the paper. If no conflict of interest exists, please explicitly state this in the covering letter. Failure to suggest three reviewers will delay processing.

4. Order the elements comprising the manuscript as follows: title page, abstract, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, conclusions, appendix, acknowledgments, references, tables and figure-captions list.

5. Categories of publication: The following types of articles will be considered for publication. Authors are advised that submissions exceeding the length guidelines provided below will be returned unreviewed:

(1) Research Articles: reports of original, basic, clinical, translational studies relating to Reproductive Immunology. The reports should be well documented, novel, and significant. Research articles are published an average of 40 days after their final acceptance. The length restrictions for this category of publication are as follows: Text limit of 5000 words excluding references.

(2) Short Communications: Short, definitive reports of highly significant and timely findings. Priority Reports receive an accelerated review. Papers submitted as Priority Reports should contain Materials and Methods and Results and Discussions sections. The length of the whole manuscript is 2500 words.

(3) Reviews: Articles that review a timely subject important to reproductive immunologist researchers. Reviews must be written as concisely as possible. All Review Articles, whether or invited or not, will be subject to peer review. Text limit of 3000 words.

(4) Public Issues: Brief articles (2000 words or less) on topics of interest to scientist involved in the areas of reproduction and immunology and the general public. These topics include articles on funding projects in Reproductive Immunology from the government, foundations; clinical application or directions of the progress in the field of immunology and reproduction; relations, training in the field, public or science education.

(5) Letters to the Editor and Opinion: The Editors invite the submission of correspondence that presents considered opinions in response to articles published in the journal or meeting presentations. Letters to the Editor will be peer reviewed and, if found to meet the requisite publication criteria the Letter may be sent to the author(s) of the originally published article and possibly to other interested parties for a response to be published in the same issue of the journal as the Letter.

(6) Meeting Reports: Brief reports of the Annual meetings of the Societies for Reproductive Immunology or special symposiums. (2000 words)

6. Title page - This should include the title of the article, authors' names (with degrees) and affiliations, complete mailing addresses, fax and telephone numbers of one author who will review the proofs, and suggested running head. The running head should be less than 45 characters (including spaces) and should indicate either diagnosis or major features of the case.

7. Abstract - This should be page two of the manuscript (2). It should be structured and consist of no more than 150 words, organized into four paragraphs, labeled Problem, Method of Study, Results and Conclusions.

8. Key words - A list of 3-6 key words is to be provided directly below the abstract. Key words should express the precise content of the manuscript and consist of words or phrases not in the title, as they are used for indexing purposes, both internal and external. They should each be arranged in alphabetical order and separated by a comma (,).

9. Acknowledgments - All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one separate paragraph that directly precedes the reference section. The inclusion of individuals and/or of institutions in the acknowledgment section in a manuscript requires a signed approval from each individual mentioned in the acknowledgment and/or of an authorized individual representing the institution(s) that clearly states that the individual(s) and/or institution(s) agree to be named in an acknowledgment section of the paper. Illustrations from other publications must be acknowledged. Include the following when applicable: author(s), title of journal or book, volume number, page(s), month and year.

10. References - References are identified in the text by superscript figures. All references cited in the text should be typed double-spaced in a separate section at the end of the paper and numbered consecutively in the order in which they are cited in the text. Once a reference is cited, all subsequent citations should be to the original number. Abbreviations should conform to those in *Index Medicus*. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Journal Article:

1. Glass RH, Ericsson RJ: Intrauterine insemination of isolated motile sperm. *Fertil Steril* 1978;29:535-539.

Book:

2. Leigh H, Reiser MF: *The Patient*. New York, Plenum Medical, 1980.

Contribution to a book:

3. Shapiro BM: Awakening of the invertebrate egg at fertilization. *In Fertilization and Embryonic Development in Vitro*, L Mastroianni Jr., JD Biggers (eds). New York, Plenum Press, 1981, pp 233-255.

11. Tables - Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self explanatory and include a brief descriptive title. Tables can be submitted as Excel or MS Word files.

12. Illustrations/Figures - Three sets of unmounted and untrimmed photographs, drawings, diagrams and/or charts are to be submitted, each in a separate labeled envelope. Illustrations should preferably be in the proportion of 12.5 x 18 cm (5 x 7 inch). Write the title of the paper, the name of the first author and set number (Set 1 of 3, etc.) on each of the envelopes.

Each figure is to be numbered in the consecutive series of Arabic numerals in the order in which it is cited in the text. Write the title of your paper, the name of the first author and the figure number on an adhesive label, which should be pasted on the back of each figure. On the label also indicate clearly the top margin of each figure.

Illustrations in full color are accepted for publication if the editors believe that color will add significantly to the published manuscript. Digital artwork for reproduction should preferably be submitted as EPS, TIFF or high-resolution JPEG files and meet our standards, but we may also be able to use other formats so please include these (see http://authorservices.wiley.com/submit_illust.asp)

13. Legends: Legends should be double-spaced, beginning on a separate sheet of paper. They should be numbered with Arabic numerals and referred to in the text. Maximum length should be limited to 100 words.

14. The journal requires that investigations performed in the United States on human subjects have the prior approval of the appropriate institutional committee on human experimentation.

15. Rapid Publication - Concise manuscripts (4 or fewer journal pages) representing studies of outstanding scientific significance may be submitted for Rapid Publication. These manuscripts must be completely documented by reference to the literature and by a thorough description of the experimental procedures. If authors desire Rapid Publication, they must state so explicitly in their covering letter. For more information regarding guidelines for Rapid Publication, please contact the Central Editorial Office.

16. Short Communications - Short Communications are concise manuscripts of two or less journal pages which represent not more than 10 double-spaced manuscript pages inclusive of figures, tables, and references. Authors must state explicitly in the covering letter that the paper is a Short Communication.

17. All measurements must be given in metric units. English units may also be given parenthetically if the measurements were originally done in English units. These guidelines are in accordance with the 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals'.

18. Proofs: The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available