ISABELA KARINE RODRIGUES AGRA

**Expressão de células *natural killer* e suas citocinas
em gestações gemelares complicadas com pré-
eclâmpsia**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes
Brizot

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Agra, Isabela Karine Rodrigues

Expressão de células natural killer e suas
citocinas em gestações gemelares complicadas com pré-
eclâmpsia / Isabela Karine Rodrigues Agra. -- São
Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Maria de Lourdes Brizot.

Descritores: 1.Gestação gemelar 2.Pré-eclâmpsia
3.Sistema imunológico 4.Células matadoras naturais
5.Interleucinas 6.Proteínas angiogênicas

USP/FM/DBD-088/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Aos meus pais, **Margarete e Rommel**, que me ensinaram, todos os dias, que nada é mais valioso que o bem imaterial da educação. Se o melhor ensino é o exemplo, essa tese começou dentro de casa. O amor de vocês é a bússola imprecisa que, ao corrigir os descaminhos de quem voa sozinho, “nordesteia” esta trilha que se faz, talvez, mais com o coração do que com os próprios pés.

E a **Wancler** – companheiro, amor e amigo – que magnifica essa bússola, me orientando de volta ao cheiro de sal e maresia que me faz essência. Porque se é verdade que “quem esquece de onde veio, não sabe pra onde vai”, eu nunca teria chegado até aqui sem ter âncoras bem afincadas no solo seguro que me traz a paz.

Eu amo muito vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto**, que, durante meus anos de graduação em Medicina, despertou em mim o gosto pela pesquisa e o amor pela bancada. A semente que foi plantada naquele terreno árido ganhou dimensões que eu não poderia imaginar, mas com as quais eu sempre me arrisquei a sonhar.

Ao **Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao**, que participou diretamente da construção dessa tese, enquanto meu orientador durante os três anos de monografia da Residência Médica em Obstetrícia e Ginecologia. Obrigada por acreditar na menina assustada que bateu à sua porta, vindo de longe, com a cara e quase nenhuma coragem, pedindo por uma oportunidade. Encontrei a inspiração que precisava para, de fato, acreditar que São Paulo é coração do mundo. Agradeço pela enorme gentileza e pelo carinho que só quem tem tanto a compartilhar pode oferecer. Sigo em busca da sua simplicidade, na vida e na arte do *obstare*.

E, finalmente, à **Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot**, que permitiu a conclusão deste ciclo. Seu trabalho de orientação envolve uma arte, quase artesanal, de lapidar seres humanos, por meio do rigor, do capricho e da técnica. Sua dedicação à ciência é inspiradora. Seu fôlego e dinamismo são invejáveis! Sou grata, a Deus, por ter me permitido cruzar o seu caminho e aprender tanto todos os dias.

Estes foram, sem dúvida, meu tripé e serão, para sempre, meus maiores exemplos de profissionalismo e de caráter.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Os dias – que rapidamente se tornaram meses, e anos – morando longe de casa foram repletos de saudade. Sem a crença em um **Deus** justo e misericordioso, e a certeza do aconchego no colo de **Nossa Senhora**, não teria conseguido chegar até aqui. Das vezes em que fraquejei até os dias de enorme alegria, senti a presença e o suporte seguros da fé, e, por isso, continuei.

Agradeço à minha **família** – meus pais, meu irmão, meus avós, meus tios e meus primos – que, talvez, não saiba o quanto me fortaleceu por meio de visitas, ligações e mensagens. E, de forma especial, à **Jeovana**, minha prima baiana que enfrentou comigo essa garoa e me ensinou a enxergar colorido o cinza que existe nesta cidade. À **família de coração** que me acolheu como filha – meus sogros, meus cunhados e minhas concunhadas – agradeço pela torcida e pelo amor.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, Professor Titular de Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, agradeço pela oportunidade de fazer parte, como filha adotiva, desta Casa de Arnaldo. Tenho muito orgulho da formação que recebi na mais conceituada Clínica Obstétrica deste país.

À **Profa. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco**, coordenadora da Pós-Graduação do Departamento de Obstetrícia, pelo espírito combativo e de liderança, e por proporcionar o apoio necessário à realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Mara Sandra Hoshida**, pela valiosa colaboração na parte laboratorial desta tese. A relação de amor e ódio com a bancada reside, sobretudo, na persistência que se precisa ter para não se perder o otimismo. Obrigada por ter sido o contrapeso de paciência e serenidade, fundamentais para manter meu equilíbrio.

À **Profa. Dra. Regina Schultz** e ao **Dr. Marcello Pecoraro Toscano**, membros do Departamento de Patologia, agradeço pela enorme contribuição neste trabalho. E, principalmente, por terem dedicado muito do seu tempo para sanar as dificuldades inerentes à imprevisibilidade de se trabalhar com uma especialidade como a Obstetrícia.

Aos **médicos assistentes do Departamento de Obstetrícia**, por formarem juntos o “*dream team*” da assistência obstétrica de alto risco. Agradeço, especialmente, às **Dras. Maria Rita de Figueiredo Lemos Bortolotto** e **Eliane Aparecida Alves**, pelos ensinamentos durante os anos de residência, pelo exemplo diário de dinamismo e praticidade, e pela assistência prestada às gestantes portadoras de pré-eclâmpsia deste trabalho.

Aos **médicos assistentes do Setor de Medicina Fetal**, por terem contribuído com a minha formação técnica e profissional, e, de forma especial, ao **Dr. Antonio Gomes de Amorim Filho**, por colorir de leveza e bom humor as adversidades do dia a dia e nos ensinar, com gestos e atitudes, que “gentileza gera gentileza”; e, ao **Dr. Lawrence Hsu Lin**, que, com enorme senso crítico, me deu dicas valiosas para a tese e para a vida.

Aos **médicos assistentes do Setor de Gestação Múltipla**, pelo convívio diário, pelas discussões acaloradas embasadas em fundamentação científica atualizada e por dividirem a experiência pessoal que construíram por meio do seguimento de casos raros e graves, típicos de um centro terciário de excelência como este. À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot**, ao **Prof. Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**, ao **Dr. Wagner Rodrigues Hernandez** e à **Dra. Ursula Trovato Gomez**, meus sinceros agradecimentos.

Eu tive sorte de construir amizades verdadeiras nestes anos na garoa. E elas renovaram em mim a garra e a persistência, me impulsionando a não desistir. Obrigada por terem dividido comigo o peso da rotina, transpondo os muros do hospital e estendendo nossas conversas para aquele café com sorvete, escape fundamental para aliviar a saudade e o estresse.

Agradeço às amigas **Sckarlet Biancolin, Mariana Miyadahira e Veridiana Franco**, por terem sido minhas preceptoras e mães adotivas – não pela idade, mas pelo amor e pela dedicação com que cuidaram dessa nordestina tão aperreada e imediatista. A busca de vocês pela perfeição dos cortes ultrassonográficos e das condutas clínicas é, puramente, reflexo de um caráter ilibado, e de um coração enorme e gentil, que me inspira sempre a ser melhor. Aos amigos e companheiros de estágio/residência, que, ao dividirem a dor e as delícias da rotina suada, também contribuíram enormemente para que eu chegasse até aqui – **Milena Carvalho, Gabriela Bezerra, Carolina Branco, Clarissa Nunes, Laura Muzzi, Rafaela Cardoso, Isabel Botelho, Felipe Morales e Luciana de Stefani**.

Agradeço, ainda, de forma muito especial, à **Walkyria Andrade**, minha amiga que nasceu baiana, tornou-se paulista – especializando-se em ser cidadã do mundo na cidade mais cosmopolita deste país –, e hoje vive em Londres, matando de saudades os habitantes da nossa Sala de Estudos. Obrigada por ter dividido tantos momentos de angústia e por ser a voz incisiva e sincera sempre que precisei. Morro de saudades!

Às enfermeiras **Ana Maria da Silva Sousa e Silvana Andrade**, pela incansável disposição em ajudar. Às sras. **Evangelina, Maristela, Cida e Iranildes**, funcionárias do ambulatório de Obstetrícia, agradeço por terem facilitado enormemente a minha rotina, com o carinho e a presteza de sempre. À **Renata Pereira, Soraia Cristina, Raquel Costa, Marina Martins, Célia Nunes, Alan Garcia e Inês Jazra**, funcionários administrativos da Clínica Obstétrica, obrigada por desvendarem a burocracia que nos emperra tantas vezes.

De forma especial, agradeço à **Sra. Lucinda Cristina Pereira**, secretária da Pós-Graduação, pelo carinho sincero que devota a cada um de nós, e pela alegria genuína que sente pelas nossas conquistas. E à **Srta. Agatha Rodrigues**, pela enorme contribuição na análise estatística desta tese.

Aos amigos que fiz nos bastidores da bancada e foram essenciais para que todas as engrenagens funcionassem em perfeita harmonia: **Saete, Ana Cristina e Isaías**, do LIM-57 de Fisiologia Obstétrica; **Esmeralda e Sandra**, do Laboratório de Imuno-histoquímica, e **Lucília**, do Departamento de Patologia.

Meu agradecimento especial aos professores titulares e suplentes da Comissão Examinadora do Exame de Qualificação – **Prof. Dr. Mário Burlacchini, Profa. Dra. Lisandra Stein Bernandes, Dr. Fábio Cabar, Prof. Dr. Adolfo Liao e Profa. Dra. Rossana Pulcineli** – pelas críticas valiosas que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Por fim, agradeço às **gestantes** que aceitaram participar desta tese, mesmo sabendo que não seriam diretamente beneficiadas pelos seus resultados. Vocês são o motivo de nosso trabalho.

Obrigada!

*“Só eu sei de cada passo por mim dado
nessa estrada esburacada que é a vida.
Passei coisas que até mesmo Deus duvida.
Fiquei triste, capiongo, aperreado,
porém nunca me senti abandonado.
Me agarrava sempre numa mão amiga
e de força minha alma era munida,
pois do céu uma voz dizia assim:
- Suba o queixo, meta os pés, confie em mim.
Siga a luta, que eu cuido das feridas”.*

(Bráulio Bessa, poeta e cordelista nordestino)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo primário	7
2.2 Objetivos secundários.....	7
3 REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1 Resposta imunológica materna na gestação normal	9
3.2 Células <i>natural killer</i> decíduais e a gestação normal	11
3.3 Células <i>natural killer</i> decíduais e a pré-eclâmpsia	14
3.4 Células <i>natural killer</i> decíduais e gestação múltipla	17
3.5 Interleucinas e gestação	17
3.5.1 Interleucina 10 (IL-10)	18
3.5.1.1 Participação da IL-10 na gestação normal.....	18
3.5.1.2 Participação da IL-10 na pré-eclâmpsia.....	19
3.5.2 Interleucina 12 (IL-12)	21
3.5.2.1 Participação da IL-12 na gestação normal.....	21
3.5.3.2 Participação da IL-12 na pré-eclâmpsia.....	22
3.5.3 Interleucina 15 (IL-15)	23
3.5.3.1 Participação da IL-15 na gestação normal.....	23
3.5.3.2 Participação da IL-15 na pré-eclâmpsia.....	24
3.6 Interleucinas e gestação múltipla.....	25
3.7 Fatores angiogênicos, o sistema imune e a pré-eclâmpsia	25
3.8 sFlt-1, PIGF e gestação múltipla.....	27
4 CASUÍSTICA E MÉTODO	30
4.1 Casuística.....	30
4.1.1 Seleção de casos	31
4.2 Cálculo do tamanho amostral.....	33

4.3 Método	33
4.3.1 Coleta das amostras	33
4.3.2 Avaliação placentária.....	34
4.3.3 Análise sérica materna	37
4.3.4 Variáveis analisadas	38
4.3.4.1 <i>Variáveis populacionais</i>	38
4.3.4.2 <i>Variáveis gestacionais e do parto</i>	39
4.3.4.3 <i>Variáveis neonatais.....</i>	40
4.4 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Caracterização da população	42
5.2 Expressão placentária de células dNK e suas interleucinas reguladoras	45
5.3 Interleucinas reguladoras de células dNK no sangue materno	48
5.4 Fatores reguladores de angiogênese (sFlt-1 e PlGF).....	50
6 DISCUSSÃO.....	53
6.1 Caracterização da população.....	53
6.2 Expressão placentária de células dNK e suas interleucinas reguladoras	55
6.3 Interleucinas reguladoras de células dNK no sangue materno	58
6.4 Fatores reguladores de angiogênese (sFlt-1 e PlGF)	59
6.5 Considerações finais.....	60
7 CONCLUSÕES.....	63
8 ANEXOS.....	65
8.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	65
8.2 Anexo B – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria do HC-FMUSP.....	68
9 REFERÊNCIAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
≤	Menor ou igual que
=	Igual
≥	Maior ou igual que
>	Maior que
μm	Micrômetro
AIG	Adequado para Idade Gestacional
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CTEV	Citotrofoblasto Extraviloso
CTV	Citotrofoblasto Viloso
DAB	Diaminobenzidina
DC	Dicoriônico
DHL	Desidrogenase Láctica
dNK	<i>Natural Killer</i> decidual
DPP	Descolamento Prematuro de Placenta
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EF	Estreptavidina-Ficoeritrina
Flt-1	<i>Fms-Like Tyrosine Kinase-1</i>
G	Gramma
GC	Grupo-Controle
GPE	Grupo Pré-Eclâmpsia
HAC	Hipertensão Arterial Crônica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HELLP	<i>Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet count</i>

HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
IFN-gama	Interferon-gama
IG	Idade Gestacional
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-10^{-/-}	Deficiência para Interleucina 10
IL-1RA	Receptor de Interleucina 10
IMC	Índice de Massa Corpórea
KDR	<i>Kinase Domain Receptor</i>
Kg	Quilograma
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptor</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Máx	Máximo
MC	Monocoriônico
MG	Miligrama
Mín	Mínimo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NK	<i>Natural Killer</i>
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PE	Pré-Eclâmpsia
Pg	Picograma
PIG	Pequeno para Idade Gestacional
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
pNK	<i>Natural Killer</i> do Sangue Periférico
RCF	Restrição de Crescimento Fetal
RN	Recém-Nascido
RT-PCR	Reação de Transcriptase Reversa Seguida de Reação em Cadeia de Polimerase

sFlt-1	<i>Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1</i>
ST	Sinciciotrofoblasto
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-beta	Fator de Crescimento Transformante Beta
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
Th	<i>T helper</i>
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Treg	Células T Regulatórias
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGFR-1	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1</i>
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>
vs.	<i>versus</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fluxograma de caracterização da população estudada – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	42
-------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e sociodemográficas das pacientes na entrada no estudo e desfechos gestacionais associados, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	43
Tabela 2 -	Parâmetros indicativos de pior prognóstico da doença nas gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	45
Tabela 3 -	Expressão placentária de células dNK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia (análise semiquantitativa) – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	46
Tabela 4 -	Expressão placentária de células NK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos (análise semiquantitativa) – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	46
Tabela 5 -	Percentual de marcação de células dNK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	47
Tabela 6 -	Percentual de marcação de células dNK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017.....	47
Tabela 7 -	Níveis séricos maternos das interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017.....	48
Tabela 8 -	Níveis séricos maternos das interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	49
Tabela 9 -	Valores de sFIT-1, PIGF e da razão sFIT-1/PIGF, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017.....	50
Tabela 10 -	Valores de sFIT-1, PIGF e da razão sFIT-1/PIGF, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017	51

RESUMO

Agra IKR. *Expressão de células natural killer e suas citocinas em gestações gemelares complicadas com pré-eclâmpsia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

OBJETIVOS: Comparar a expressão placentária de células *natural killer* decíduais (dNK), e a expressão sérica e placentária de suas citocinas reguladoras em gestações gemelares com pré-eclâmpsia (grupo pré-eclâmpsia, GPE) e sem comorbidades (grupo-controle, GC). **MÉTODOS:** Estudo transversal do tipo caso-controle, desenvolvido na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP no período de julho de 2015 a junho de 2017. Foram obtidas amostras das regiões decíduais placentárias, para avaliação, por meio de técnica de imuno-histoquímica, da expressão de células dNK e suas interleucinas (IL) 10, 12 e 15, em pacientes que contemplaram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo. Além disso, estas pacientes tiveram amostra sérica colhida no terceiro trimestre para dosagem de IL-10, IL-12 e IL-15 – por meio de kit comercial Milliplex®, que utiliza a tecnologia Luminex® xMAP®, da EMD Millipore (*Merck Millipore Co.*, Alemanha) – e de fatores relacionados à angiogênese, como *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) e *placental growth factor* (PlGF) – por meio de ensaio com imunoanalisador COBAS e411 (*Roche Diagnostics*, Alemanha). Os valores obtidos para as análises placentárias e séricas foram comparados entre o GPE e o GC, e a significância estatística estabelecida foi $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Foram selecionadas 30 pacientes, sendo 20 no GC e 10 no GPE. Não se observaram diferenças significativas com relação às características maternas, gestacionais e de desfechos perinatais entre os dois grupos, exceto pela idade gestacional de início do pré-natal, menor no GPE (12,5 vs. 20,0 semanas, $p = 0,015$). Quanto à avaliação placentária, houve maior expressão de IL-15 no GPE ($p = 0,001$), e não houve diferença entre os grupos quanto à expressão placentária local de células dNK ($p = 0,999$), IL-10 ($p = 0,063$) e IL-12 ($p = 0,135$). Com relação às interleucinas séricas maternas, demonstrou-se aumento significativo nos níveis de IL-10 (22,7 vs. 11,9 pg/mL, $p = 0,024$) e IL-15 (15,9 vs. 7,4 pg/mL, $p = 0,024$) no GPE com relação ao GC, sem diferença entre os grupos para IL-12 (102,5 vs. 61,5 pg/mL, $p = 0,373$). A dosagem dos fatores relacionados à angiogênese demonstrou maiores níveis séricos maternos de sFlt-1 (15920 vs. 7978 pg/mL, $p = 0,009$) e da razão sFlt-1/PlGF (88,71 vs. 24,63, $p = 0,002$), e menores valores de PlGF (193,0 vs. 340,6 pg/mL, $p = 0,036$) no GPE. **CONCLUSÃO:** Observou-se maior concentração sérica materna tanto de fatores pró quanto anti-inflamatórios no GPE, quando comparado ao GC. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à expressão placentária de IL-10, importante fator anti-inflamatório. Estes achados podem sugerir que a tentativa sérica materna de equilibrar estas interleucinas não alcançou

resposta localmente na placenta, contribuindo para o desenvolvimento da doença no GPE.

Descritores: gestação gemelar; pré-eclâmpsia; sistema imunológico; células matadoras naturais; interleucinas; proteínas angiogênicas.

ABSTRACT

Agra IKR. *Expression of natural killer cells and their cytokines in twin pregnancies with preeclampsia* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

OBJECTIVES: To compare the placental expression of decidual natural killer cells (dNK) and serum and placental expression of their regulatory cytokines in twin pregnancies with preeclampsia (preeclampsia group, PEG) and uncomplicated twin pregnancies (control group, CG). **METHODS:** This was a case-control study, developed in a tertiary referral center, from July 2015 to June 2017. Samples of the placental decidual region were obtained and analyzed by immunohistochemistry technique for the expression of dNK cells and interleukins (IL) 10, 12 and 15, in patients who met the inclusion criteria. In addition, maternal serum sample was collected in the third trimester for the dosage of IL-10, IL-12 and IL-15 – by means of a commercial Milliplex® kit using Luminex® xMAP® technology from EMD Millipore (Merck Millipore Co., Germany) – and angiogenesis factors, such as soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) and placental growth factor (PlGF) – by COBAS e411 immunoassay (Roche Diagnostics, Germany). The values obtained for the placental analyzes and maternal circulating factors were compared between PEG and CG and the statistical significance was set at $p < 0.05$. **RESULTS:** Thirty patients were selected, 20 in CG and 10 in PEG. There were no significant differences in maternal, gestational and perinatal outcomes between the two groups, except for the gestational age at the onset of prenatal care, which was lower in PEG (12.5 vs. 20.0 weeks, $p = 0.015$). PEG showed strong immunostaining for IL-15 ($p = 0.001$) when compared to CG, with no difference between the groups concerning the placental expression of dNK ($p = 0.999$), IL-10 ($p = 0.063$), and IL -12 ($p = 0.135$). Relating to maternal circulating interleukins, a significant increase in IL-10 (22.7 vs. 11.9 pg/mL, $p = 0.024$) and IL-15 (15.9 vs. 7.4 pg/mL, $p = 0.024$) was observed in PEG, with no difference between the groups for IL-12 (102.5 vs 61.5 pg/mL, $p = 0.373$). We also demonstrated higher maternal levels of sFlt-1 (15920 vs. 7978 pg/mL, $p = 0.009$) and sFlt-1/PlGF ratio (88.71 vs. 24.63, $p = 0.002$) and lower levels of PlGF (193 vs. 340.6 pg/mL, $p = 0.036$) in PEG. **CONCLUSION:** A higher maternal serum concentration of both pro- and anti-inflammatory factors was observed in the PEG. However, no difference was found between the groups regarding the placental expression of IL-10, an important anti-inflammatory factor. These findings may suggest that the maternal serum attempt to balance these interleukins did not reach local placental response, which contribute to the development of the disease in the PEG.

Descriptors: pregnancy, twin; preeclampsia; immune system; killer cells, natural; interleukins; angiogenic proteins.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Devido à ampliação da sua incidência, as gestações múltiplas tornaram-se um tema de grande importância na atualidade, já que, quando comparadas às gestações únicas, estão associadas com aumento de praticamente todas as complicações maternas e fetais, exceto pós-datismo e macrosomia fetal^{1,2}. Aproximadamente, 80% das gestações gemelares apresentam complicações clínico-obstétricas, percentual mais expressivo do que os 25% observados entre as gestações únicas³.

Do ponto de vista materno, uma das complicações gestacionais que ocorre com maior frequência são as síndromes hipertensivas. Em um estudo multicêntrico prospectivo envolvendo 684 gestações gemelares e 2.946 gestações únicas, observou-se frequência maior de pré-eclâmpsia (PE) no primeiro grupo (12,7% *versus* 4,9%), bem como, das suas formas graves, como síndrome HELLP – do acrônimo em Inglês: *hemolysis, elevated liver enzymes* e *low platelets count* – ou eclâmpsia (1% vs. 0,4%)⁴. Com relação ao descolamento prematuro de placenta (DPP), este também foi maior no grupo de gestações múltiplas (4,7% vs. 0,7%)⁴.

Os aspectos relacionados ao diagnóstico e ao tratamento das síndromes hipertensivas nas gestações múltiplas não diferem em relação à abordagem das gestações únicas⁵. De modo geral, despertam grande interesse em Obstetrícia devido à grande morbimortalidade que impõem ao binômio materno-fetal, persistindo como importante causa de morte materna no Brasil e no mundo^{6,7}. Na cidade de São Paulo, em 2007, um estudo evidenciou que a hipertensão arterial foi responsável por 23,3% dos casos de morte em gestantes e puérperas, e, dentre estes, quase 70% estiveram relacionados à PE⁸. Dados mais recentes, do Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde, demonstraram que, no ano de 2015, as síndromes hipertensivas foram responsáveis por 20,6% dos óbitos maternos no Brasil e 15,1% no estado de São Paulo⁹.

Com relação à prevalência destas síndromes hipertensivas nas gestações múltiplas, estudo retrospectivo realizado no HC-FMUSP, no período de 2003 a 2006, incluindo 289 gestações gemelares, evidenciou frequência de 28% (81 pacientes), sendo um pouco mais da metade destes casos (55,6%, 45 pacientes) classificados como PE “pura”, 28,4% como hipertensas crônicas e 16% como PE superajuntada¹⁰. A incidência de PE na sua forma “pura”, sem diagnóstico de hipertensão arterial crônica (HAC) prévia à gestação, dentre todas as pacientes gemelares incluídas no estudo, foi de 15,6%¹⁰.

Os desfechos maternos e fetais podem diferir entre as entidades clínicas que compõem as síndromes hipertensivas, sendo que a HAC na sua forma não complicada, geralmente, cursa sem repercussões desfavoráveis ao binômio materno-fetal¹¹. Por outro lado, a PE, mesmo em suas formas leves, merece atenção rigorosa, visto que determina risco de cerca de 3 a 25 vezes maior na taxa de complicações gestacionais, incluindo insuficiência renal aguda, edema agudo de pulmão, coagulopatias, síndrome HELLP, restrição de crescimento fetal (RCF), DPP e óbito fetal¹¹. Dessa forma, a vigilância cuidadosa durante a assistência pré-natal é fundamental para impedir sua progressão para formas graves e evitar a piora clínica.

Apesar da sua reconhecida importância clínica e epidemiológica, e dos inúmeros esforços que têm sido realizados no sentido de elucidar a sua etiologia, a fisiopatologia da PE permanece desconhecida, dificultando a sua prevenção primária, sobretudo nos grupos de maior risco.

A hipótese central que domina o atual entendimento da doença é que a PE resulta, em última análise, de isquemia placentária, que liberaria na circulação materna fatores responsáveis pelas manifestações clínicas da doença¹². Este conceito deriva-se de observações realizadas desde 1914 de que infartos placentários são comuns em pacientes portadoras da doença¹³. Estudos subsequentes demonstraram que a redução da perfusão sanguínea uteroplacentária (por meio do clampeamento da aorta abdominal em modelos animais) estaria associada ao aparecimento de hipertensão na gestação^{14,15}.

Atualmente, sabe-se que o processo de placentação fisiológica depende da invasão das arteríolas espiraladas maternas pelo trofoblasto, promovendo o remodelamento destes vasos, pela substituição da camada muscular média e consequente diminuição de sua resistência vascular¹⁶. Este processo inicia-se no final do primeiro trimestre e termina por volta de 20 semanas de gestação¹⁶. Na PE, no entanto, não há transformação fisiológica do segmento miometrial destas arteríolas, levando à isquemia uteroplacentária e até alterações inflamatórias locais, tais como presença de macrófagos carregados de lipídeos no lúmen vascular, necrose fibrinoide da parede arterial e infiltrado perivascular mononuclear¹⁷. Este regime de hipóxia pode promover, ainda, desbalanço na produção e liberação de fatores angiogênicos (como o PIGF, *placental growth factor*) e antiangiogênicos (como o sFlt-1, *soluble fms-like tyrosine kinase-1*), com predomínio destes últimos nos casos de PE¹⁸.

Os mecanismos responsáveis pela falha na transformação fisiológica das arteríolas espiraladas ainda não foram completamente elucidados e vale ressaltar que a invasão trofoblástica deficiente não é específica da PE e foi observada em outras complicações obstétricas, tais como abortamento espontâneo, RCF, DPP, trabalho de parto prematuro e rotura prematura de membranas ovulares¹⁹⁻²¹.

Tendo em mente que a implantação do conceito cria condições nas quais células fetais (carregando antígenos paternos) e células maternas entram em contato com a decídua uterina, não é difícil imaginar que haja um papel para o sistema imunológico no processo de placentação. A gravidez bem-sucedida requer que o sistema imunológico materno não rejeite o trofoblasto, já que, apesar do feto ser considerado o semienxerto, é a placenta que entra em contato direto com o sangue materno²².

Este reconhecimento imunológico materno-fetal é altamente individualizado pela presença de dois sistemas de genes polimórficos: o sistema HLA (*Human Leukocyte Antigens*, moléculas do complexo principal de histocompatibilidade), notadamente o HLA-C, único antígeno de histocompatibilidade polimórfico descrito, capaz de sinalizar a especificidade paterna; e os receptores destes antígenos de compatibilidade, conhecidos

como KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*), presentes nas células *natural killer* (NK)²².

Pelo menos dois grupos de haplótipos de receptores KIR (A e B) e dois tipos de HLA-C (C1 e C2) são conhecidos, sendo que HLA-C2 interage com KIRs mais fortemente do que o HLA-C1. O haplótipo A de KIR tem como característica uma maior expressão de genes inibitórios, enquanto que o haplótipo B possui maior expressão de genes ativadores ou estimulatórios²². Portanto, a atividade de produção e secreção de citocinas pelas células NK presentes na decídua (dNK) pode ser aumentada após a ligação dos antígenos HLA-C aos KIRs do haplótipo B, enquanto que são reduzidas pela ligação dos antígenos ao haplótipo A de KIRs³⁰. Assim, gestantes portadoras de receptores KIR AA (homozigose para haplótipo A) com fetos HLA-C2 podem ter susceptibilidade aumentada à PE, porque esta combinação inibiria a secreção de interleucinas pelas dNK, importantes para manutenção da homeostase materno-fetal^{23,24}. A produção destas interleucinas parece estar envolvida na ativação ou supressão da resposta imunológica na interface materno-fetal, a depender do seu perfil pró ou anti-inflamatório²⁴.

Dessa forma, muitos esforços têm se concentrado na elucidação da fisiopatologia da PE, sobretudo dos mecanismos envolvidos nos estágios pré-clínicos da doença. Diversos estudos foram realizados em gestações únicas envolvendo a participação de células dNK e suas interleucinas reguladoras no desenvolvimento da PE. Entretanto, mesmo neste grupo, ainda não há consenso sobre o comportamento destas células na fisiopatogenia da doença.

Neste contexto, os fatores imunológicos têm recebido papel de destaque, já que distúrbios no seu equilíbrio poderiam ser responsáveis pelo desenvolvimento de estágios precoces da PE, antes mesmo das alterações encontradas no remodelamento das arteríolas espiraladas. Vale destacar ainda que não há, até o momento, dados na literatura científica relacionando estes mesmos fatores às gestações múltiplas. Por ser centro de referência terciário no atendimento obstétrico e perinatal, o HC-FMUSP apresenta alta frequência de atendimento a gestações múltiplas, tornando-se local propício para a realização deste estudo.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente estudo, envolvendo gestações gemelares com pré-eclâmpsia (grupo pré-eclâmpsia, GPE) e gestações gemelares sem comorbidades (grupo-controle, GC), no terceiro trimestre, tem como objetivos:

2.1 Objetivo primário

Comparar, entre os grupos GPE e GC, a expressão placentária de células dNK.

2.2 Objetivos secundários

- Comparar a expressão placentária e sérica materna de interleucinas (IL) reguladoras de células dNK (IL-10, IL-12 e IL-15);
- Comparar os níveis séricos maternos dos fatores relacionados à angiogênese – sFlt-1, PlGF e sFlt-1/PlGF.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Resposta imunológica materna na gestação normal

Há mais de 60 anos, o biólogo Peter Medawar (1953) sugeriu que a sobrevivência do feto – sabidamente um enxerto semialogênico, portando metade do seu material genético de origem paterna – poderia ser explicada por três princípios: existência de uma barreira anatômica entre a mãe e o conceito; imaturidade antigênica do feto e, finalmente, pela inércia imunológica materna²⁵. Alguns anos mais tarde, Billingham (1963) acrescentou a estas teorias a hipótese de que o útero seria um ambiente imunologicamente exclusivo e privilegiado, possibilitando a tolerância necessária para o desenvolvimento fetal adequado²⁶. Entretanto, esta última explicação tornou-se logo pouco provável pela descrição, ainda naquela época, de gestações ectópicas que evoluíram até estágios avançados, fora do ambiente intrauterino^{27,28}.

O próprio Billingham, em 1964, iniciou as pesquisas que refutariam parte das explicações vigentes, ao sugerir que a placenta não pode mais ser vista como uma barreira intransponível, já que foi demonstrada transferência bidirecional de glóbulos vermelhos entre a mãe e o feto²⁹. Além disso, sugeriu a ocorrência de transplante de antígenos (do sistema HLA), ainda muito cedo, na vida embrionária, refutando a hipótese de que o conceito seria imunologicamente imaturo. Restava, então, dos princípios iniciais de Medawar²⁵, a ideia de que a sobrevivência fetal estaria associada à indolência imunológica materna.

Entretanto, sabe-se, atualmente, que o sucesso da gestação depende muito mais do equilíbrio motivado pela dinâmica interação entre os fatores imunológicos de origem materna e fetal, do que pela inércia de uma ou ambas as partes³⁰. Com relação às adaptações imunológicas maternas, estas podem ser divididas em modificações locais e sistêmicas³¹.

No que concerne às alterações uterinas, ocorre fenômeno de decidualização do endométrio, que somente se completa após a implantação do blastocisto. A decídua é o endométrio especializado, altamente modificado em camada secretora, por meio da ação dos hormônios maternos liberados na fase inicial da gestação³². De acordo com Damjanov (1985), o termo decídua foi utilizado em analogia às folhas que caem, indicando que este tecido é eliminado logo após o parto³³. A decídua imediatamente abaixo do blastocisto implantado é modificada pela invasão do trofoblasto e torna-se a decídua basal. A porção capsular da decídua recobre o blastocisto em crescimento e, inicialmente, o separa da cavidade uterina, ficando em contato com a membrana fetal avascular – o córion. O restante do útero é revestido pela decídua parietal, algumas vezes denominada decídua vera quando se une à decídua capsular, após o primeiro trimestre, em torno de 14 a 16 semanas de idade gestacional³³.

Com o avançar da gestação, a decídua basal forma a porção materna da placenta, sendo composta por células imunes (células NK deciduais, macrófagos, células dendríticas e células T regulatórias [Treg]), e componentes do sistema vascular arterial e venoso^{34,35}. A parte fetal da placenta é representada pelo córion viloso, revestido externamente pelo sinciotrofoblasto (ST) e internamente por células do citotrofoblasto. A proliferação do citotrofoblasto na extremidade das vilosidades produz colunas de células trofoblásticas, que formam as vilosidades de ancoragem. Elas se ancoram à decídua basal, formando o córion frondoso, componente fetal da placenta propriamente dito³⁶. No decorrer da gestação, células do citotrofoblasto viloso (CTV) extrapolam os limites das vilosidades na região de ancoragem com a decídua basal, invadindo este tecido; estas células são chamadas de citotrofoblasto extraviloso (CTEV) e podem ser divididas em duas subpopulações: intersticial, que circundam as artérias espiraladas maternas; e intravascular, que as penetram³⁷.

Dessa forma, ocorre o remodelamento das artérias espiraladas uterinas pelo CTEV, por meio da desorganização da camada de células musculares lisas destas artérias, e da oclusão e remoção endotelial, buscando

estabelecer condições para o intercâmbio adequado de nutrientes entre as circulações materna e fetal³⁸. O desenvolvimento destes vasos uteroplacentários é descrito em fases, ou ondas de invasão, ao longo do curso da gestação. A primeira fase ocorre antes de 12 semanas, e consiste na invasão e modificação das arteríolas espiraladas da decídua, cuja borda atinge o miométrio. Entre a 12^a e a 16^a semanas de gestação, acontece a segunda fase, que envolve a invasão da porção intramiometrial destas artérias, convertendo-as em vasos de baixa resistência³⁸. Na placenta a termo, as células do CTEV são encontradas em menor quantidade e parcialmente substituídas por fibrinoide³⁹.

Estas modificações requerem uma regulação apropriada, mediada, sobretudo, pelas células imunes locais, como dNK, macrófagos e células Treg, presentes no endométrio já antes da implantação do blastocisto, aumentando em número e função logo após. Essas células imunes são, portanto, importantes reguladoras do equilíbrio e da tolerância maternos, orquestrando a invasão trofoblástica fetal⁴⁰.

3.2 Células *natural killer* deciduais e a gestação normal

As células NK são células do sistema imune inato e representam a população celular dominante na decídua materna no primeiro trimestre, correspondendo a cerca de 70% dos leucócitos nesta região – dados demonstrados tanto por meio de citometria de fluxo quanto por imuno-histoquímica^{32,41}. Em consonância com seu domínio numérico, as células dNK foram o foco da grande maioria dos trabalhos relacionados à imunologia da interface materno-fetal⁴²⁻⁴⁶.

Moffet-King, em artigo de revisão publicado em 2002, demonstrou que, até o início dos anos 2000, acreditava-se que havia uma diminuição na quantidade de células dNK após o primeiro trimestre, tornando-se quase ausentes no termo^{42,43}. Entretanto, dados mais recentes evidenciaram que estas células estão presentes, embora em menor proporção – representam

cerca de 20-40% dos leucócitos decíduais no termo – em todos os trimestres da gestação, corroborando sua contribuição para a regulação do equilíbrio materno-fetal também em estágios posteriores^{44,45}.

A caracterização destas células é feita por meio dos seus antígenos de superfície (CD, *cluster of differentiation*), notadamente CD16 e CD56. CD16 é um receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G (IgG) e é responsável pela função de citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Com relação ao CD56, conforme a intensidade da sua expressão, estas células podem ser diferenciadas ainda em duas populações distintas – CD56^{dim}, que expressam fracamente o antígeno de superfície e são altamente citotóxicas; CD56^{bright}, que expressam o antígeno mais fortemente, são pouco citotóxicas e exercem função regulatória, pela produção de citocinas com perfil pró-inflamatório, como interferon-gama (IFN-gama) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa)⁴⁷.

Análises por meio de técnicas de citometria de fluxo e RT-PCR (reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase) demonstraram que o fenótipo das células dNK é diferente das células NK do sangue periférico (pNK). As primeiras são, em sua vasta maioria, CD16^{neg}CD56^{bright}, capazes de produzir e secretar citocinas, quimionas e fatores angiogênicos, porém com reduzida atividade citotóxica, o que pode favorecer sua interação com as células do CTEV. Com relação às células pNK, cerca de 90% apresentam fenótipo CD16^{bright}CD56^{dim}, com reconhecida atividade citotóxica⁴⁸.

Adicionalmente, Sanchez-Rodriguez e colaboradores descreveram, em 2011, pela primeira vez, que o fenótipo das células dNK no termo é semelhante àquele observado no primeiro trimestre⁴⁵. Esses resultados sugerem que os precursores de células NK seriam localmente induzidos a se diferenciar em células especializadas com funções específicas para atender as necessidades da gestação. Consistente com esta ideia está a demonstração de que interleucina 15 (IL-15) e fator de crescimento transformante beta (TGF-beta), ambos expressos na decídua, promovem a conversão de células pNK CD16^{bright} CD56^{dim} em células com fenótipo semelhante às dNK^{49,50}.

Duas funções principais atribuídas às células dNK são a habilidade em promover a invasão trofoblástica e a angiogênese^{31,51}. O papel destas células no remodelamento das arteríolas espiraladas foi demonstrado, inicialmente, por Zhang e colaboradores (2011), utilizando vários modelos de camundongos geneticamente modificados deficientes para células NK – desde organismos com depleção de células linfáticas até animais com deficiência de IL-15. As arteríolas espiraladas, em ambos os casos, apresentaram paredes muito espessadas, bem como, lúmen vascular estreito, em contraste com os vasos de paredes finas e lúmen dilatado nos controles selvagens, não modificados geneticamente⁵². Demonstraram, ainda, que o remodelamento vascular poderia ser resgatado se fossem enxertadas amostras de medula óssea de doadores contendo apenas células NK ou por meio de injeção sistêmica de IFN-gama⁵³. Estes resultados sugerem que as células dNK contribuem para a ocorrência da invasão trofoblástica por meio da produção de IFN-gama, principalmente.

Em seres humanos, evidências da participação das células dNK no remodelamento arteriolar derivam de estudo genético de Chazara e colaboradores (2011), que avaliaram como o desfecho gestacional poderia ser influenciado pelo genótipo dos receptores KIR maternos – que codificam receptores de superfície das células dNK – e pelos alelos fetais de HLA-C – que codificam a molécula HLA-C polimórfica⁵⁴. HLA-C é o principal ligante dos receptores KIR, e a única molécula do complexo principal de histocompatibilidade expressa pelo CTEV⁵⁵. Os autores demonstraram que o remodelamento arteriolar ocorria de forma deficiente quando o repertório genético materno carecia da região telomérica do haplótipo KIR B e o feto possuía um grupo de genes classificado como C2 para HLA-C⁵⁴. Esta combinação é funcionalmente importante porque a região telomérica B codifica genes para receptores KIR ativadores, quando em união às moléculas HLA-C2. Assim, na ausência desta região na interface materna, e presença de HLA-C2 no feto, é demonstrado forte sinal inibitório para as células dNK. Esta combinação de genes também foi encontrada em casos de abortamentos recorrentes e RCF⁵⁶.

Quando ativadas, as células dNK são capazes de produzir e liberar localmente citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos³¹. Lash e colaboradores (2006) demonstraram, pela primeira vez, a produção de fatores angiogênicos pelas células dNK ainda no primeiro trimestre, sugerindo uma participação destas células na preparação dos vasos maternos para a invasão trofoblástica propriamente dita, nos estágios finais do remodelamento vascular⁵⁷. Os autores evidenciaram produção de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), PlGF, angiopoetinas – família de proteínas angiogênicas relacionadas estruturalmente – e TGF-beta.

Posteriormente, foi demonstrada a produção e liberação de outras substâncias envolvidas na angiogênese, como CXCL8 e CXCL10, quimiocinas relacionadas com o recrutamento de células do CTEV, para as quais as células trofoblásticas expressam os receptores CXCR1 e CXCR2⁵⁸. Juntos, esses resultados sugerem fortemente que as interações entre as células trofoblásticas e as células dNK parecem ser mais fortes do que a mera proximidade física entre elas e podem ser fundamentais para uma gravidez bem-sucedida.

3.3 Células *natural killer* decíduais e a pré-eclâmpsia

Durante muitos anos, a PE foi considerada uma doença de dois estágios: sendo o primeiro pré-clínico, representado por um processo de placentação deficiente; e o segundo, correspondendo à sua expressão clínica propriamente dita, caracterizado pelos sinais clássicos de hipertensão e proteinúria⁵⁹. À luz dos conhecimentos atuais, sobretudo no que diz respeito à participação imunológica na fisiopatologia da doença, esses estágios parecem superficiais.

Assim, Redman, em 2014, propôs um modelo ampliado subdividido em seis fases, que teria início ainda no período pré-concepcional (fase 1), relacionado ao intervalo de tempo entre o primeiro coito e a concepção, e sua influência sobre a implantação embrionária (fase 2). Por volta da 8ª semana,

inicia-se a placentação e, já no primeiro trimestre, ao demonstrar sinais de inadequação, constitui a terceira fase deste novo modelo (fase 3). As outras etapas ocorrem somente na segunda metade da gestação: a fase 4 relaciona-se ao excesso ou deficiência de substâncias produzidas pela placenta, secundárias à isquemia local, pouco antes das manifestações clínicas da doença (fase 5). A última fase (fase 6) ocorre em menos da metade dos casos e é representada por fenômenos que predispõem à trombose arterial e a infartos placentários subjacentes⁶⁰.

Seja no estágio pré-clínico seja nas fases mais iniciais do modelo proposto por Redman⁶⁰, parece haver importante influência do componente imunológico no desenvolvimento da PE⁶¹. Uma interação inadequada entre as células dNK e as células trofoblásticas pode ter impacto sobre a ativação das próprias células dNK e sobre a invasão trofoblástica⁶¹. Portanto, o remodelamento arteriolar deficiente associado à PE parece ser resultado da ativação inadequada das células dNK, levando à secreção de substâncias que inibem a função das células do CTEV¹⁵. Entretanto, ainda restam inúmeras dúvidas sobre as etapas precisas envolvidas neste processo, já que até sobre a composição celular decidual das pacientes portadoras de PE ainda não há consenso, devido, entre outros fatores, às divergências metodológicas observadas⁴⁵.

Stallmach e colaboradores (1999) realizaram o primeiro estudo comparando a população de leucócitos deciduais em pacientes portadoras de PE e seus controles no terceiro trimestre; as amostras deciduais foram obtidas por meio de biópsias uterinas do leito placentário logo após a dequitação, durante a cesárea, envolvendo 19 casos no grupo-controle e 15 casos no grupo PE. A contagem diferencial de células foi realizada por meio de imuno-histoquímica e os autores evidenciaram um aumento significativo de células dNK nas gestantes portadoras de PE; entretanto, este achado apresentou significância estatística somente quando houve associação entre PE e RCF⁶². Em outro estudo, de forma semelhante, Wilczynski e colaboradores (2002) demonstraram maior quantidade de células dNK nas pacientes portadoras de PE. Neste estudo, a obtenção da amostra decidual também foi realizada por

meio de curetagem uterina durante o parto cesárea de 11 pacientes no grupo-controle e 21 no grupo PE; porém, a quantificação das subpopulações de leucócitos deciduais foi realizada por meio de citometria de fluxo⁶³. Os dados clínicos maternos deste estudo evidenciaram importantes sinais de gravidade para PE no grupo acometido pela doença – média de proteinúria de 4,9g/24h, PA sistólica média de 178,5 mmHg e PA diastólica média de 111,6 mmHg, sugerindo estágios mais avançados da doença⁶³. Similarmente, Bachmayer e colaboradores (2006), em estudo que contou com a participação de 24 gestantes no grupo-controle e 22 no grupo com PE (sendo 14 delas portadoras da forma grave da doença), também evidenciaram maior expressão de células dNK no grupo PE no terceiro trimestre; desta vez, a quantificação foi realizada por meio de técnica de imuno-histoquímica e as amostras deciduais obtidas diretamente da placenta no momento do parto⁶⁴.

Contrariamente, em 2009, dois grupos europeus distintos (Rieger *et al.*; Williams *et al.*, 2009) demonstraram, por meio de técnicas laboratoriais diferentes – citometria de fluxo e imuno-histoquímica – a diminuição da quantidade células dNK no terceiro trimestre em placentas de pacientes portadoras de PE^{65,66}. O estudo de Williams e colaboradores – envolvendo 12 pacientes no grupo-controle, 12 no grupo PE e 8 gestantes no grupo de RCF sem comorbidades – ainda evidenciou que essa depleção de células dNK também poderia ser observada nos casos de RCF (sem PE associada)⁶⁵. Esta associação da depleção de dNK e RCF já havia sido descrita anteriormente por Eide e colaboradores (2006)⁶⁷, em pesquisa que contou com a participação de 5 gestantes no grupo de RCF, 8 no grupo PE e 17 gestantes no grupo de RCF associada à PE, demonstrando redução da população de dNK somente nos casos de RCF e PE associadas. De forma interessante, este último estudo não evidenciou diferenças estatisticamente significativas no percentual de células dNK quando o grupo PE (com ou sem RCF) foi comparado ao grupo-controle⁶⁷.

Vê-se, então, que os dados descritos na literatura, relacionando dNK e PE, são conflitantes e ainda inconsistentes. Todos os estudos descritos acima foram realizados em gestações únicas.

3.4 Células *natural killer* decíduais e gestação múltipla

Com relação às gestações múltiplas, não há estudos descritos na literatura científica, até o momento, que descrevam a caracterização da população de leucócitos decíduais – particularmente dNK – nas gestações gemelares sem comorbidades, bem como, nos casos associados à PE.

3.5 Interleucinas e gestação

Já foi discutido anteriormente que a sobrevivência fetal no microambiente uterino depende da manutenção da tolerância imunológica materna. De fato, o organismo uteroplacentário produz uma série de fatores que, quando em equilíbrio, resultam em uma gestação saudável⁶⁸. De acordo com sua ação pró ou anti-inflamatória, estes fatores foram classificados, respectivamente, como pertencentes ao grupo Th1 ou Th2, devido à descoberta inicial de sua produção pelas células do sistema imune T *helper* (Th). Hoje, sabe-se que elas podem ser produzidas por outros tipos celulares presentes na interface materno-fetal^{69,70}.

Durante a gestação, parece haver um predomínio da resposta Th2, com diminuição de fatores inflamatórios e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, com a finalidade de manter a tolerância imunológica ao conceito⁷¹. Embora essa dicotomia Th1/Th2 tenha sido demonstrada, estudos mais recentes descreveram que outras populações de linfócitos T – notadamente os T *helper* 17 (Th17) –, com reconhecida atividade pró-inflamatória, aumentam em número nas fases mais avançadas da gravidez, podendo contribuir para a angiogênese e para o desencadeamento do trabalho de parto^{72,73}.

Dessa forma, a gestação pode ser entendida como uma progressão mutável de fases imunológicas, com monopólio variável dos padrões pró ou anti-inflamatórios, a depender das necessidades do binômio. Sucintamente, os estágios extremos – implantação, o mais inicial; e parto, o final – estariam

associados ao maior domínio inflamatório, enquanto que, no intervalo entre eles – denominado de gestação ativa –, haveria maior produção de fatores anti-inflamatórios⁷⁴.

3.5.1 Interleucina 10 (IL-10)

3.5.1.1 Participação da IL-10 na gestação normal

IL-10 foi descrita, pela primeira vez, por Fiorentino e colaboradores (1989), como uma proteína com a habilidade de inibir a atividade inflamatória das células Th1⁷⁵. Apesar de, originalmente, definida um como produto das células Th2, sabe-se, atualmente, que ela pode ser produzida por outras células do sistema imune e não imune, notadamente células NK e células do citotroblasto viloso⁷⁰.

A cinética da expressão de IL-10 no tecido placentário humano indica níveis mais elevados durante o primeiro e segundo trimestres, em comparação com o terceiro trimestre da gravidez⁷⁶. Esta citocina é regulada e produzida em resposta à ativação inflamatória excessiva, por meio de mecanismos de retroalimentação. Atua, portanto, como fator anti-inflamatório, inibindo a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF-alfa⁷⁰. IL-10 age, ainda, de forma imunossupressora, ao impedir a apresentação de antígenos – por meio do bloqueio da expressão de moléculas da classe II do complexo principal de histocompatibilidade – e ao regular a diferenciação de células do sistema imune, tais como linfócitos, células NK, mastócitos e granulócitos^{70,77}.

Fu e colaboradores (2013) demonstraram que as células dNK são capazes de suprimir a expressão das células inflamatórias Th17, mecanismo provavelmente mediado pela ação da IL-10⁷⁸. Os autores evidenciaram que as expressões de IL-10, de seu receptor (IL-1RA) e de IFN-gama estavam significativamente diminuídas nas células dNK de pacientes portadoras de abortamentos espontâneos recorrentes; enquanto que, nestas mesmas

pacientes, a expressão de células Th17 encontrava-se aumentada⁷⁸. Assim, a IL-10 atuaria como importante modulador da resposta imune e inflamatória ao longo da gravidez, fundamental para permitir a sobrevivência e o desenvolvimento fetais.

Embora seu papel anti-inflamatório pareça estar bem estabelecido, novos esforços estão sendo realizados para esclarecer a participação desta interleucina nos mecanismos de remodelamento vascular⁷⁹.

Estudos realizados em camundongos deficientes para IL-10 (IL-10^{-/-}) forneceram uma importante ferramenta biológica para investigação e evidenciaram que a IL-10 funciona como um fator protetor contra o remodelamento vascular inadequado⁸⁰⁻⁸². Animais IL-10^{-/-} exibiram maiores taxas de parto prematuro e RCF, bem como, remodelamento das arteríolas espiraladas e angiogênese placentária deficientes⁸¹. Na tentativa de mimetizar os mecanismos envolvidos nas fases iniciais da gestação, estudo realizado por meio de modelos *in vitro*, capazes de demonstrar a interação celular na interface materno-fetal no primeiro trimestre, evidenciou que a participação de IL-10 é essencial para que a invasão trofoblástica ocorra de forma adequada⁸⁰. Em conjunto, esses resultados podem sugerir um papel protetor da IL-10 sobre a angiogênese placentária.

3.5.1.2 Participação da IL-10 na pré-eclâmpsia

A perfusão placentária deficiente associada à PE é consequência, sobretudo, de um provável desbalanço inflamatório¹². Sendo a IL-10 um potente fator anti-inflamatório e, diante das descobertas sobre a sua atuação no endotélio vascular⁸⁰, o foco da atenção estaria voltado, agora, para o seu papel no desenvolvimento da PE.

Hennesy e colaboradores (1999), em estudo envolvendo 10 pacientes com PE e 14 sem comorbidades, evidenciaram que a IL-10 esteve reduzida, tanto em amostras séricas maternas (colhidas no momento do diagnóstico de PE) como na decídua de pacientes portadoras de PE, em comparação ao

grupo-controle sem comorbidades⁸². Similarmente, Wilczynski e colaboradores (2002), em estudo que contou com a participação de 11 pacientes no grupo-controle e 21 no grupo PE, demonstraram diminuição nos níveis de IL-10 *in vitro*, por meio de cultura de células decíduais de pacientes portadoras de PE⁶³. Corroborando estes resultados estão os achados posteriores de que, diante de níveis reduzidos de IL-10, ocorreria, com maior frequência, fenômenos de placentação deficiente e aumento da produção de substâncias antiangiogênicas⁸⁰.

De maneira interessante, em 2013, um estudo brasileiro comparou os níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias de mulheres não gestantes (81 casos), gestantes normotensas (69 casos) e gestantes portadoras de PE (69 casos)⁸³. Os autores demonstraram níveis reduzidos de IL-10 no grupo PE e no grupo de não gestantes, em comparação às gestantes normotensas; sendo que as pacientes portadoras da doença apresentaram valores de IL-10 muito semelhantes ao das não gestantes.

Entretanto, apesar dos estudos descritos acima e da comprovação em modelos animais de que a deficiência de IL-10 estaria associada ao desenvolvimento de sinais clínicos de PE⁸⁴, ainda não há consenso na literatura sobre o papel desta citocina na PE. Metanálise publicada em 2011, analisando o papel das citocinas nas gestações únicas complicadas com PE, evidenciou aumento de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, incluindo IL-10, nesta doença⁸⁵. Fazem parte desta análise os estudos de Madazli e colaboradores (2003) – envolvendo 35 pacientes com PE e 34 sem comorbidades – e Olusi e colaboradores (2000) – envolvendo 32 pacientes nos grupos controle e PE –, que evidenciaram que, em comparação às gestantes sem comorbidades, as com PE apresentaram aumento nos níveis de IL-10 no sangue materno, colhido no terceiro trimestre, logo antes do parto^{86,87}.

3.5.2 Interleucina 12 (IL-12)

3.5.2.1 Participação da IL-12 na gestação normal

A identificação e purificação da IL-12 foi realizada, pela primeira vez, por Kobayashi e colaboradores (1989), ao buscar uma explicação para a proliferação de células NK⁸⁸. Por este motivo, também é conhecida como fator estimulador de células NK. Apesar de ter sido descoberta como um produto de linfócitos de linhagem B, estes não parecem ser os principais responsáveis pela sua produção, já que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram grande participação das células apresentadoras de antígenos (macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas) na sua produção^{89,90}.

Os principais alvos de atuação desta interleucina são as células T e as células NK. Dessa forma, sobretudo com relação às células NK, IL-12 é capaz de induzir a proliferação celular e a produção de citocinas, bem como, de estimular suas funções citotóxicas⁹¹. Entre as citocinas produzidas pelas células NK, há predomínio de IFN-gama, substância com reconhecidas habilidades pró-inflamatórias³⁵. Além disso, o IFN-gama, ao atuar sobre as células fagocíticas, aumenta a capacidade destas células em produzir mais IL-12, perpetuando um mecanismo muito poderoso de amplificação da resposta inflamatória³⁵. A interrupção dessa cascata é necessária para reestabelecer o equilíbrio e é mediada por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, que pode ser considerada, então, uma potente inibidora da produção de IL-12⁷⁷.

Com relação à sua atuação na decídua, estudos realizados no primeiro trimestre evidenciaram que a IL-12 parece inibir a invasão trofoblástica, por meio da ativação de fatores inibidores de metaloproteinases. Neste sentido, agiria de forma semelhante à IL-10, como fator não invasivo^{92,93}.

Já no terceiro trimestre, quando comparados aos leucócitos periféricos, aqueles presentes na decídua parecem produzir menores quantidades de IL-12 e IFN-gama. Adicionalmente, avaliações *in vitro* destes leucócitos deciduais, após estimulação mitogênica, demonstraram aumento da

concentração de citocinas anti-inflamatórias, como IL-2, IL-4 e IL-10, e diminuição da concentração de IL-12. Em conjunto, esses achados evidenciam importante papel da resposta anti-inflamatória Th2 no terceiro trimestre de gestações normais⁹⁴.

3.5.3.2 Participação da IL-12 na pré-eclâmpsia

Poucos estudos investigaram a participação de IL-12 na PE, de maneira isolada. Wilczynski e colaboradores (2002) demonstraram, por meio de avaliação *in vitro* de leucócitos decíduais obtidos no terceiro trimestre, que os níveis de IL-12 produzidos por estas células foram significativamente menores no grupo de pacientes portadoras de PE (21 pacientes), quando comparadas ao grupo-controle (11 pacientes)⁶³. Apesar disso, o grupo PE apresentou maiores níveis de IFN-gama, achado em consonância com estudo publicado anteriormente, em que, apesar da diminuição da produção de IL-12, não houve prejuízo na secreção de IFN-gama no grupo PE⁹⁵.

De forma semelhante, Bachmayer e colaboradores (2006), em estudo envolvendo 46 pacientes, 24 sem comorbidades e 22 no grupo PE, evidenciaram menor expressão de IL-12 nas células trofoblásticas e decíduais de pacientes com PE no terceiro trimestre⁶⁴. Entretanto, neste mesmo estudo, a avaliação sérica materna foi inversa, já que demonstrou maiores níveis desta interleucina no grupo PE⁶⁴.

Mais recentemente, buscando avaliar a participação das interleucinas na primeira metade da gestação e sua utilização na predição da PE, Taylor e colaboradores (2016), em estudo envolvendo 242 pacientes, realizaram a dosagem de diversas interleucinas pró e anti-inflamatórias no primeiro (5-13 semanas) e segundo (14-19 semanas) trimestres⁹⁶. Com relação à IL-12, esta foi a única interleucina dosada no primeiro trimestre que apresentou correlação com o desenvolvimento de PE – altos níveis de IL-12 dosados até 13 semanas estariam relacionadas à chance 1,6 vezes maior de apresentar a

doença. No segundo trimestre, esta diferença não se manteve e não houve distinção entre os grupos PE e controle quanto à dosagem de IL-12.

3.5.3 Interleucina 15 (IL-15)

3.5.3.1 Participação da IL-15 na gestação normal

A IL-15 foi, originalmente, descoberta como um agente estimulador de células T presente no sobrenadante da cultura de uma linhagem celular de macacos⁹⁷. Ela compartilha atributos funcionais importantes com a IL-2, incluindo o estímulo à proliferação, sobrevivência e diferenciação de vários tipos de células distintas, como células NK, T e B⁹⁷.

Sua principal função consiste na sua atuação como fator de crescimento para as células dNK, possibilitando, ainda, estimular seu potencial citotóxico, quando necessário⁹¹. Em uma série de experimentos elegantes, utilizando camundongos modificados geneticamente, Barber e Pollard (2003) demonstraram que as células NK, provavelmente, originam-se da medula óssea e necessitam de IL-15 para se especializar em células dNK, migrando para o útero⁹⁸. Adicionalmente, camundongos modificados geneticamente e deficientes para IL-15 apresentaram ausência de dNK e falha no remodelamento vascular placentário, resultando em artérias com paredes espessadas e decídua basal hipocelular⁹⁸.

Os mecanismos celulares envolvidos na regulação das células dNK por IL-15, por sua vez, ainda permanecem desconhecidos. Sabe-se que macrófagos deciduais expressam altos níveis de IL-15, tanto em camundongos quanto em humanos. Entretanto, não há prejuízo no desenvolvimento de células dNK em camundongos modificados geneticamente com expressão deficiente de macrófagos deciduais⁹⁹. Assim, a produção de IL-15 por outros tipos celulares deciduais, como as células estromais ou as células endoteliais, parece ter maior relevância fisiológica.

Estudos realizados em seres humanos evidenciaram que a IL-15 está presente tanto na decídua quanto no CTEV, atuando de forma a permitir a invasão trofoblástica por meio da ativação de metaloproteinases locais¹⁰⁰. Recentemente, demonstrou-se que a interação entre estas células – dNK e células trofoblásticas – é bidirecional, e mediada pela IL-15: a supressão da ativação de IL-15, promovida pelo CTEV, modifica a função das células dNK para um padrão pouco citotóxico, diminuindo a produção e liberação de perforinas, granzimas e IFN-gama¹⁰¹.

3.5.3.2 Participação da IL-15 na pré-eclâmpsia

Sabendo-se que as células dNK parecem exercer papel importante no remodelamento arteriolar uterino e que a regulação destas células é realizada, sobretudo, pela IL-15, faria sentido imaginar um papel para esta interleucina no desenvolvimento da PE.

Sendo assim, alguns estudos foram realizados em modelo murino específico para PE, em que estes camundongos desenvolvem espontaneamente os sinais clássicos da doença, como hipertensão e proteinúria, bem como, as alterações placentárias relacionadas ao remodelamento arteriolar inadequado¹⁰². Os autores demonstraram um menor número de células dNK nas fases iniciais da gestação, nos modelos de PE, em comparação aos animais selvagens. Além disso, os animais com a doença apresentaram aumento significativo da expressão de IL-15, já no início do processo de decidualização, talvez numa resposta à diminuição das células dNK. Os achados parecem corroborar as hipóteses de que os eventos imunológicos e inflamatórios da PE iniciam bem antes da segunda metade da gestação e da invasão trofoblástica propriamente dita^{101,102}.

Poucos trabalhos na literatura discorrem sobre a participação destas interleucinas no terceiro trimestre, seja localmente na decídua seja sistemicamente, por meio de avaliação sérica materna. Bachmayer e colaboradores (2006) demonstraram aumento nos níveis de IL-15 no sangue

de gestantes portadoras de PE (22 casos), coletado pouco antes do parto, quando comparadas ao grupo-controle (24 casos). Entretanto, esta diferença não se manteve na avaliação histológica da decídua placentária, por meio de técnica de imuno-histoquímica⁶⁴. Dois outros estudos, publicados posteriormente, também evidenciaram aumento desta interleucina no sangue materno de portadoras de PE^{103,104}, sem menção à avaliação placentária.

3.6 Interleucinas e gestação múltipla

De maneira semelhante ao que foi dito anteriormente para as células dNK, não há estudos na literatura, até o presente momento, que descrevam o comportamento destas interleucinas nas gestações múltiplas, com ou sem PE.

3.7 Fatores angiogênicos, o sistema imune e a pré-eclâmpsia

Foi discutido previamente que as células imunes presentes na decídua parecem ser agentes críticos para o desenvolvimento placentário adequado, por meio da promoção do recrutamento trofoblástico, remodelamento vascular e angiogênese^{58,61,69}. Sugere-se que as células dNK e os macrófagos regulem a invasão trofoblástica por meio da produção e liberação de uma ampla variedade de substâncias, como as interleucinas – descritas anteriormente – e os fatores angiogênicos, descritos a seguir¹⁰⁵.

A lista de moléculas pró e anti-angiogênicas que parecem desempenhar um papel no desenvolvimento vascular placentário normal está aumentando nos últimos anos, mas a família do VEGF tem sido a mais extensivamente estudada, e inclui os fatores VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D, além do PlGF¹⁰⁶. Os receptores de VEGF são expressos nas células endoteliais, nas células da musculatura lisa dos vasos e no trofoblasto humano, e podem ser subdivididos em dois tipos principais: *vascular endothelial growth factor*

receptor-1 (VEGFR-1) ou *fms-like tyrosine kinase-1* (Flt-1) e *vascular endothelial growth factor receptor-2* (VEGFR-2) ou *kinase domain receptor* (KDR). Ambos são importantes para o desenvolvimento vascular, mas apresentam intensidades de resposta diferentes ao estímulo por VEGF. O VEGFR-1, por exemplo, exibe resposta muito mais fraca ao estímulo com VEGF, podendo exercer até algum efeito regulatório inibitório na angiogênese. Além disso, existe uma forma alternativa solúvel de expressão do VEGFR-1, o sFlt-1, que não possui a porção transmembrana do receptor e, portanto, não exerce atividade de sinalização intracelular, funcionando como antagonista da atividade angiogênica do VEGF e do PIGF^{16,106}.

Sabe-se que o PIGF encontrado na decídua é produzido, sobretudo, pelas células dNK e está envolvido na maturação destas mesmas células¹⁰⁷. Se a implantação embrionária ocorrer de forma adequada, as células NK endometriais convertem-se em células dNK produtoras de PIGF, processo mediado pela IL-15^{107,108}. Estudos em modelos animais evidenciaram que camundongos deficientes para PIGF apresentaram elevação anormal no número de células dNK com atividade citotóxica, levando a estresse oxidativo e abortamentos recorrentes, sugerindo mecanismos de retroalimentação entre este fator angiogênico e as células dNK¹⁰⁹.

Com relação à PE, ensaio de expressão gênica, envolvendo 11 casos sem comorbidades e 21 casos de PE, demonstrou que há aumento na regulação e produção de sFlt-1 nestes últimos casos, com potente efeito inibidor sobre a atividade angiogênica de VEGF e PIGF¹¹⁰. Consistente com a propriedade deste receptor solúvel de ligar-se ao PIGF está a demonstração de que há diminuição dos níveis circulantes de PIGF (na sua forma livre) nas pacientes portadoras de PE, estabelecendo um predomínio da atividade antiangiogênica nesta doença¹¹⁰. Além disso, em modelos *in vitro*, a administração exógena de VEGF/PIGF ou de anticorpo contra sFlt-1 pode reverter estes processos antiangiogênicos¹¹¹. De forma interessante, o aumento dos níveis séricos de sFlt-1 e a diminuição dos níveis de PIGF podem preceder o aparecimento dos sintomas clássicos da doença, tendo sido

demonstrado que as variações de sFlt-1 podem aparecer até cinco semanas antes dos sinais clínicos da doença¹¹².

3.8 sFlt-1, PIGF e gestação múltipla

A literatura científica relacionando a dosagem destes fatores angiogênicos e as gestações gemelares é escassa. Droge e colaboradores (2015) – em estudo multicêntrico envolvendo 31 gestações gemelares sem comorbidades e 18 gemelares com PE – demonstraram que os níveis circulantes de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF foram significativamente maiores, e os níveis de PIGF significativamente menores em gestações gemelares com PE, comparadas com gestações gemelares sem a doença¹¹³. Adicionalmente, este estudo permitiu a comparação dos valores destes fatores angiogênicos entre gestações únicas com PE (54 casos) e gestações gemelares com PE (18 casos), e evidenciou que, nestas últimas, os valores médios de sFlt-1 e PIGF são maiores do que nas gestações únicas, porém não há diferença significativa na razão sFlt1/PIGF¹¹³. Os autores relacionam este achado à maior massa placentária nas gestações múltiplas, embora uma correlação direta entre o peso da placenta e os níveis de fatores angiogênicos ainda não tenha sido estabelecida.

De forma diversa, nas gestações gemelares sem intercorrências, os níveis séricos maternos de sFlt-1 e a razão sFlt-1/PIGF foram maiores do que nas gestações únicas sem comorbidades. Entretanto, não foi demonstrada diferença nos níveis séricos maternos de PIGF entre estes dois grupos¹¹³. Estes achados estão em consonância com os dados descritos por Bdolah e colaboradores (2008), que compararam a dosagem destes fatores angiogênicos em 10 gestações únicas e 9 gemelares¹¹⁴.

Contrariamente, estudo realizado no primeiro trimestre – portanto dificultando a comparação com os estudos descritos acima, que foram realizados na segunda metade da gestação – evidenciou maiores concentrações de sFlt-1 e PIGF, em gestações gemelares sem comorbidades

(61 casos), quando comparadas às gestações únicas (50 casos). Estes autores ainda descreveram que casos de gestações gemelares concebidas por meio de técnicas de reprodução assistida apresentaram maiores níveis de sFlt-1 no primeiro trimestre, em comparação às gestações gemelares espontâneas¹¹⁵.

Os estudos ainda são controversos com relação à influência da corionicidade sobre os níveis séricos destes fatores angiogênicos, alguns deles demonstrando ausência de interferência^{114,115}, enquanto outro – realizado no primeiro trimestre envolvendo 440 gestações dicoriônicas e 116 monocoriônicas – evidenciou maiores níveis de PlGF em gestações dicoriônicas¹¹⁶.

Vê-se, portanto, que a literatura acerca deste tema em gestações gemelares ainda é escassa e seus resultados são conflitantes.

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

4 CASUÍSTICA E MÉTODO

Foi realizado estudo transversal do tipo caso-controle.

4.1 Casuística

Foram acompanhadas prospectivamente gestantes que realizaram o pré-natal na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP durante o período de julho de 2015 a junho de 2017. As pacientes em seguimento no Setor de Gestação Múltipla do HC-FMUSP que contemplavam os critérios de inclusão adotados foram convidadas a participar do estudo na última consulta de pré-natal, no terceiro trimestre, após explicação sobre o projeto de pesquisa e mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do hospital, sob protocolo número 46741815.8.0000.0068 (Anexo B). Gestantes com idade menor que 18 anos tiveram seu TCLE assinado também por seu responsável legal.

Os critérios de inclusão adotados foram:

- a) gestação gemelar (dupla) diamniótica, com ambos os fetos vivos, cujo parto tenha sido programado para acontecer no HC-FMUSP;
- b) perfil sorológico materno negativo para doenças infecciosas por HIV, hepatites B e C, sífilis, toxoplasmose e rubéola durante o pré-natal;
- c) ausência de anomalias congênitas fetais;
- d) não realização de corticoide antenatal por alteração de vitalidade ou trabalho de parto prematuro;
- e) ausência de diagnóstico ultrassonográfico de Síndrome de Transfusão Feto-Fetal;

- f) ausência de trabalho de parto antes da coleta da amostra sérica materna;
- g) **para o grupo-controle:** ausência de doenças maternas prévias à gestação ou descobertas durante o pré-natal;
- h) **para o grupo PE:** diagnóstico de pré-eclâmpsia “pura”, conforme os critérios utilizados na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP⁵, sem outras comorbidades associadas.

Os critérios de exclusão utilizados foram:

- a) rotura prematura de membranas ovulares por tempo prolongado (maior que 12 horas);
- b) não obtenção de fragmentos de decídua placentária, após o parto;
- c) não obtenção dos resultados laboratoriais;
- d) diagnóstico pós-natal de anomalia congênita ou síndrome gênica em, pelo menos, um dos recém-nascidos;
- e) desistência por parte da gestante em continuar no estudo.

4.1.1 Seleção dos casos

Assim, os grupos de estudo e controle foram constituídos da seguinte forma:

- a) grupo de estudo (grupo com pré-eclâmpsia, GPE): gestações gemelares com diagnóstico de PE “pura”, definida pelos critérios descritos, que não tenham apresentado outras intercorrências clínicas antes ou durante o seguimento pré-natal.
 - Pré-eclâmpsia: presença de hipertensão arterial, definida como pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg (pelo menos duas medidas, com intervalo de quatro horas entre elas,

com paciente em repouso, sentada e com manguito adequado) após 20 semanas de idade gestacional, associada a um dos dois critérios abaixo:

- ✓ proteinúria maior ou igual a 300mg em volume de urina de 24 horas; OU
 - ✓ edema generalizado (edema de mãos e face ou ganho de peso materno de, pelo menos, 1 kg em uma semana).
 - PE Grave: envolve a presença de, pelo menos, um dos critérios abaixo em paciente com diagnóstico de PE:
 - ✓ PAS maior ou igual a 160 mmHg e/ou PAD maior ou igual a 110 mmHg, confirmado em duas medidas, com intervalo mínimo de uma hora;
 - ✓ proteinúria maior que 5g em volume de urina de 24 horas;
 - ✓ oligúria (diurese menor que 400 mL em 24 horas);
 - ✓ cianose e/ou edema pulmonar;
 - ✓ iminência de eclâmpsia (cefaleia, dor epigástrica e alterações visuais);
 - ✓ eclâmpsia: aparecimento de convulsões tônico-clônicas.
 - PE Leve: ausência de critérios de gravidade.
- b)** grupo-controle (GC): gestações gemelares cujo acompanhamento não tenha demonstrado ocorrência de complicações clínicas prévias à gestação ou durante o pré-natal, pareados com o grupo de estudo pela corionicidade.

As gestantes foram, então, selecionadas de forma sequencial, conforme pareamento de casos e controles, na proporção de 2 controles para cada 1 caso previamente selecionado. Foram ainda observadas, durante a seleção das pacientes, características de corionicidade, objetivando selecionar um terço de casos monocoriônicos e dois terços, dicoriônicos, em cada grupo.

4.2 Cálculo do tamanho amostral

Visto que não há estudos na literatura que examinam a expressão de células dNK e/ou suas interleucinas reguladoras em gestações gemelares complicadas com PE, o cálculo do tamanho amostral foi definido de acordo com a publicação de Olusi e colaboradores (2000)⁸⁷. Neste estudo, os autores determinaram as concentrações séricas maternas de interleucinas colhidas em gestações únicas com e sem PE. Com relação à IL-10, encontraram os seguintes resultados:

- a) grupo com pré-eclâmpsia: $93,2 \pm 24,1$ pg/mL;
- b) grupo-controle: $31,1 \pm 7,0$ pg/mL.

Para demonstrar a mesma diferença descrita, seriam necessárias 5 pacientes em cada grupo (erro alfa de 5%, poder do teste de 80%).

4.3 Método

4.3.1 Coleta das amostras

As gestantes selecionadas para o estudo tiveram amostra de sangue (10mL) coletada na última consulta de pré-natal, até sete dias antes do parto, no momento de sua inclusão no estudo. O sangue foi coletado por meio de punção venosa periférica e acondicionado em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e tubo seco, prontamente encaminhados ao Laboratório da Disciplina de Obstetrícia (Laboratório de Investigação Médica – LIM 57) para processamento. Após centrifugação, o plasma e o soro foram separados e estocados em *freezer* com temperatura de -80°C , para posterior análise.

Com relação às placentas, estas foram fixadas em formalina imediatamente após o parto e enviadas ao Departamento de Anatomia

Patológica do HC-FMUSP, em que foi confirmada a corionicidade e confeccionados fragmentos das regiões deciduais. Para isso, foi determinado um raio de até três centímetros de cada cordão em que a amostra decidual deveria ser obtida da face materna da placenta, sendo denominada “A” a amostra do primeiro concepto a nascer e “B”, o segundo. Os fragmentos obtidos foram, então, incluídos em parafina.

4.3.2 Avaliação placentária

No Departamento de Patologia, por meio de ensaio de imuno-histoquímica, foram avaliadas as expressões de células dNK e suas citocinas reguladoras (IL-10, IL-12 e IL-15) na região placentária decidual, conforme técnica padronizada descrita abaixo:

- a) **desparafinização:** as lâminas contendo os cortes do tecido em parafina com espessura de, aproximadamente, 3 μ m foram colocadas em xilol quente, em estufa a 60°C e, logo em seguida, passaram, rapidamente, em três banhos de xilol à temperatura ambiente;
- b) **hidratação:** as lâminas foram passadas em banhos de álcool (etanol) em concentrações decrescentes: dois banhos em álcool absoluto; um banho em álcool 95%; e um banho em álcool 70%. Em seguida, passaram três minutos em ácido fórmico e foram lavadas em água corrente;
- c) **digestão ou recuperação antigênica:** as lâminas foram colocadas em solução de citrato 10 mM, pH 6.0, em panela de pressão (20 minutos a 37° C);
- d) **bloqueio da peroxidase endógena:** as lâminas foram colocadas em água oxigenada 10 Volumes (3%) durante cinco minutos. Esta operação foi repetida ainda por quatro vezes. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente;

- e) **incubação com os anticorpos:** o anticorpo primário foi adequadamente diluído em diluente comercial, e pipetado cuidadosamente sobre os cortes. A seguir, as lâminas foram incubadas em câmara úmida em geladeira *overnight* (por 18-20 horas). Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS (tampão fosfato-salino) por cerca de três minutos, para serem incubadas com anticorpo secundário (*Novolink Polymer, Leyca Biosystems Newcastle Ltd*). Só então, as lâminas foram colocadas em solução de cromógeno DAB (3,3 diaminobenzidina, *Sigma Chemical Corporation, St Louis, Missouri, EUA*);
- f) **contracoloração:** foi realizada com hematoxilina de Harris (Merck, Alemanha), por cerca de um minuto; logo após, as lâminas foram lavadas com água corrente;
- g) **montagem:** as lâminas foram colocadas em soluções com concentrações crescentes de álcool: primeiro álcool 70%; seguido de álcool 95% e, por fim, três banhos em álcool absoluto. Realizada, então, diafanização em três banhos de xilol e montagem das lâminas com lamínula e resina sintética para microscopia Entellan (Merck, Alemanha).

As especificações dos anticorpos primários (Abcam, Cambridge, UK) utilizados são descritas a seguir:

- a) anti-NCAM (CD56): anticorpo monoclonal produzido em camundongos (clone RNL-1), marcador de células NK, cuja diluição utilizada neste estudo foi de 1:75. De maneira particular para este anticorpo, na etapa de digestão antigênica, optou-se por utilizar o pH 9.0, após padronização das análises;
- b) anti-IL10: anticorpo policlonal produzido em coelhos, cuja diluição utilizada neste estudo foi de 1:200;
- c) anti-IL12 p40: anticorpo policlonal produzido em coelhos, cuja diluição usada foi de 1:150;

- d) anti-IL15: anticorpo monoclonal produzido em camundongos (IgG2a), cuja diluição utilizada foi de 1:300.

A análise das amostras foi realizada no LIM-57 por três pessoas diferentes, alheias à condição clínica de cada gestante. A avaliação foi, inicialmente, baseada em uma escala semiquantitativa em cruzes, que identificou a presença e a intensidade da marcação para cada fator avaliado. Nesta escala, 0 (zero) indica ausência de marcação; + marcação fraca; ++ marcação moderada; e +++ marcação forte. Os três avaliadores analisaram todos os casos, alheios à avaliação feita por seus pares. Na eventualidade de ocorrer discrepâncias entre as análises, os casos foram reavaliados e discutidos individualmente, até se obter um consenso.

Posteriormente, para análise quantitativa desses marcadores, procedeu-se à digitalização de cinco campos histológicos para cada caso analisado, escolhidos aleatoriamente nas regiões placentárias de marcação mais intensa, utilizando, de forma padronizada, aumento microscópico de lente objetiva de 40x e de lente ocular de 10x, resultando em aumento final de 400x. O procedimento de digitalização foi realizado utilizando-se microscópio Leica (*Leica Biosystems*, Alemanha) e *software* de aquisição de imagem LAS (*Leica Biosystems*, Alemanha). Para obtenção do valor em área da marcação de cada anticorpo, foi utilizado o programa ImageJ versão 1.50i (NIH, Maryland, EUA), em que, para o aumento final de 400x, 1 pixel na imagem digitalizada equivale a 0,084242 μ m. O *software* do programa permite, ainda, aplicação de filtro de deconvolução, capaz de desmembrar a imagem original, destacando a marcação do cromógeno DAB da contracoloração histológica fornecida pela hematoxilina, permitindo maior fidedignidade à avaliação. Assim, o programa permitiu a obtenção do percentual de marcação para os fatores analisados, dividindo-se o valor da área corada pelo DAB pelo valor da área total, e multiplicando o resultado final por 100.

Na etapa de padronização dos ensaios de imuno-histoquímica, comparamos as regiões decíduais “A” e “B” de 7 casos de gestações dicoriônicas (sendo 5 do GC e 2 do GPE) e percebemos que não houve

diferença entre elas, quanto à intensidade da marcação, para nenhum dos fatores analisados (dNK, IL10, IL-12 e IL-15). Sendo assim, optamos por analisar somente uma das regiões deciduais coletadas, exceto nos casos nos quais houve discordância de peso ao nascimento, com um dos recém-nascidos (RN) abaixo do 10º percentil, em que as duas regiões deciduais foram analisadas separadamente em todos os casos.

4.3.3 Análise sérica materna

As análises das amostras foram realizadas em duplicatas, na Divisão de Laboratório Central da FMUSP, utilizando diferentes tecnologias de aferição a depender das substâncias que foram analisadas:

- a) interleucinas (IL-10, IL-12 e IL-15): o ensaio para dosagem destas interleucinas foi realizado por meio de kit comercial Milliplex®, que utilizou a tecnologia Luminex® xMAP®, da EMD Millipore (*Merck Millipore Co.*, Alemanha). Este ensaio envolveu um processo que cora internamente microesferas de poliestireno (*beads*) com dois corantes fluorescentes. Com concentrações precisas desses corantes, podem ser criados 100 conjuntos coloridos distintos de esferas, cada um dos quais revestido por um anticorpo de captura específico. Após o analito de uma amostra ser capturado pelas esferas, ocorreu uma detecção biotinizada do anticorpo. Essa mistura foi, em seguida, incubada com o conjugado estreptavidina-ficoeritrina (EF) para completar a reação na superfície de cada microesfera. As microesferas passaram, então, rapidamente através de um laser que excitou os corantes internos, marcando um conjunto específico de microesferas, a depender do analito utilizado. Um segundo laser excitou o conjugado EF, que é o corante fluorescente. Finalmente, processadores de sinais digitais identificaram cada microesfera individualmente e quantificaram o

resultado do bioensaio, baseado em sinais fluorescentes, para cada IL testada;

- b)** sFlt-1 e PIGF: foi utilizado para isso ensaio com imunoanalisador COBAS e411 (*Roche Diagnostics*, Alemanha), totalmente automatizado, baseado na tecnologia de eletroquimioluminescência. O equipamento utiliza micropartículas revestidas com estreptavidina, anticorpos monoclonais específicos biotinilados e anticorpos monoclonais específicos para cada analito, marcados com um quelato de rutênio. Esta mistura foi, então, fixada magneticamente, graças às micropartículas de estreptavidina, na superfície de um eletrodo, permitindo que todo o material não fixado fosse removido. Por fim, foi aplicada uma corrente elétrica no eletrodo que induziu uma emissão quimioluminescente, medida por um fotomultiplicador. Dessa forma, a concentração de cada analito medida foi diretamente proporcional à intensidade do sinal.

A aluna participou ativamente de todas as etapas clínicas e laboratoriais desta tese, desde a realização do pré-natal das gestantes, coleta do sangue das pacientes, elaboração do protocolo de coleta dos fragmentos placentários decíduais e do protocolo de imuno-histoquímica, leitura das lâminas para avaliação semiquantitativa e quantitativa, e dos ensaios laboratoriais para análise sérica materna.

4.3.4 Variáveis analisadas

4.3.4.1 Variáveis populacionais

- a)** idade (anos);
- b)** cor da pele (branca e não branca);
- c)** nível educacional (anos);

- d)** índice de massa corpórea (IMC) pré-gestacional: medida obtida pela razão peso/altura ao quadrado, sendo este peso aferido no primeiro trimestre ou referido pela gestante;
- e)** tabagismo (sim ou não): uso de cigarro durante a gravidez.

4.3.4.2 Variáveis gestacionais e do parto

- a)** nuliparidade (sim ou não);
- b)** gestação espontânea (sim ou não);
- c)** idade gestacional de início do pré-natal (em semanas);
- d)** corionicidade (dicoriônica, DC ou monocoriônica, MC): de acordo com a definição final anatomopatológica;
- e)** idade gestacional da coleta do sangue materno (em semanas);
- f)** presença de alteração no estudo Dopplervelocimétrico de artérias umbilicais em quaisquer dos fetos: aumento de resistência, diástole zero ou reversa (sim ou não);
- g)** idade gestacional do diagnóstico de PE (em semanas): para o GPE;
- h)** proteinúria de 24 horas (em gramas): para o GPE;
- i)** critérios de gravidade para PE (sim ou não): para o GPE, sendo utilizados como critérios de gravidade aqueles preconizados na Clínica Obstétrica do HC-FMUSP⁵, descritos anteriormente;
- j)** idade gestacional de instalação da PE (precoce ou tardia, conforme momento do diagnóstico, se $<$ ou $\geq$ 34 semanas de gestação, respectivamente): para o GPE;
- k)** diagnóstico de eclâmpsia ou iminência de eclâmpsia (sim ou não): para o GPE, ocorrência da tríade de cefaleia, epigastralgia e alterações visuais (iminência) e/ou convulsões;

- l)** diagnóstico de síndrome HELLP (sim ou não): para o GPE, presença de alterações laboratoriais características: TGO > 70UI/L; TGP > 70UI/L; DHL > 600 UI/L; bilirrubina total > 1,2mg%; plaquetas < 100.000/mm³;
- m)** diagnóstico de DPP (sim ou não);
- n)** idade gestacional do parto (em semanas);
- o)** via de parto cesárea (sim ou não);
- p)** peso da placenta (em gramas).

4.3.4.3 Variáveis neonatais

- a)** peso do RN (em quilogramas);
- b)** RN pequeno para idade gestacional (PIG, sim ou não): quando for menor que o 10º percentil da curva de Alexander para gêmeos¹¹⁷;
- c)** escore de Apgar abaixo de sete no quinto minuto (sim ou não).

4.4 Análise estatística

Para a análise estatística, foram utilizados os *softwares* Microsoft Excel versão 2010 para a construção do banco de dados e IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY) para os cálculos estatísticos.

Variáveis com distribuição normal foram descritas quanto à sua média e a seu desvio padrão, e a diferença entre os grupos específicos foi testada pelo teste *t* de Student. Variáveis com distribuição não normal foram descritas pelos valores de mediana, mínimo e máximo, e a comparação entre os grupos do estudo foi realizada pelo teste de Mann Whitney. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Para as variáveis categóricas, foram calculadas as frequências relativas. A comparação entre as proporções foi avaliada por meio do teste exato de Fisher. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população

Durante o período de estudo, foram recrutadas 34 pacientes, sendo 24 sem comorbidades e 10 com diagnóstico de PE. Destas, foram excluídas, por não obtenção de fragmentos de decídua da placenta, quatro pacientes no grupo-controle, permanecendo, portanto, para avaliação, 30 gestantes: 20 no GC e 10 no GPE.

Após ajuste para corionicidade – numa proporção de 2 casos controles para cada 1 caso do grupo de estudo, obtivemos: no GC, 14 gemelares DC e 6 gemelares MC; no GPE, das 10 gestantes incluídas, 7 eram gemelares DC e 3 gemelares MC (Figura 1).

Figura 1 – Fluxograma de caracterização da população estudada – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

DC: dicoriônica; MC: monocoriônica; PE: pré-eclâmpsia

Na Tabela 1, estão apresentadas as características clínicas e sociodemográficas, bem como, os desfechos gestacionais das pacientes na entrada no estudo.

Tabela 1 -Características clínicas e sociodemográficas das pacientes na entrada no estudo e desfechos gestacionais associados, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle (n = 20)	Pré-Eclâmpsia (n = 10)	p
Características maternas			
Idade, anos ^a	30 (19-40)	25 (16-48)	0,328
Cor não branca, n (%) ^b	7 (35)	6 (60)	0,255
Nível educacional, anos ^a	11 (6-14)	8 (6-14)	0,502
IMC pré-gestacional (kg/m ²) ^a	27,2 (21,6-47,3)	30,7 (22,0-33,5)	0,397
Tabagismo, n (%) ^b	3 (15)	0 (0)	0,532
Características gestacionais			
IG de início do PN, semanas ^a	20,0 (8,0-28,0)	12,5 (5,0-21,0)	0,015
Nulíparas, n (%) ^b	8 (40)	8 (80)	0,058
Gestação espontânea, n (%) ^b	17 (85)	8 (80)	0,999
DC, n (%) ^b	14 (70)	7 (70)	0,999
MC, n (%) ^b	6 (30)	3 (30)	0,999
Proteinúria de 24 horas, gramas	NA	1,07 (0,32-7,9)	NA
IG diagnóstico PE, semanas	NA	34,3 (30,1-37,0)	NA
Alteração Doppler, n (%) ^b	0 (0)	0 (0)	0,999
IG coleta sangue, semanas ^a	36,9 (35,1-37,5)	36,5 (31,0-37,0)	0,186
IG parto, semanas ^a	37,4 (35,1-38,0)	36,7 (31,7-37,2)	0,131
Via de parto cesárea, n (%) ^b	13 (65)	8 (80)	0,675
Peso placenta, gramas ^a	852,5 (515-1278)	755,0 (570-1030)	0,307
Características neonatais			
Peso RN, kg ^a	2,56 (1,56-3,15)	2,43 (1,69-3,16)	0,760
Apgar <7 no 5º min, n (%) ^b	0 (0)	0 (0)	0,999
Peso ao nascer <10º percentil, n/N (%) ^b	5/40 (12,5)	1/20 (5)	0,653

Dados descritos como mediana (mín-máx). ^aTeste de Mann Whitney. ^bTeste exato de Fisher. DC = dicoriônico; IG = idade gestacional; IMC = índice de massa corpórea; MC = monocoriônico; NA = não se aplica; PE = pré-eclâmpsia; PN = pré-natal; RN = recém-nascido.

Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos com relação às características maternas, embora tenha havido uma maior proporção de pacientes classificadas como não brancas (60% vs. 35%) e de nulíparas (80% vs. 40%) no grupo de estudo ($p = 0,255$ e $0,058$, respectivamente).

Com relação aos aspectos gestacionais, observamos que as gestantes do GC iniciaram o pré-natal mais tardiamente, em torno de 20 semanas de idade gestacional, enquanto que aquelas do GPE realizaram a primeira consulta, em média, com 12 semanas ($p = 0,015$). Entretanto, esses resultados não parecem ter interferido nos desfechos perinatais, já que não houve diferença significativa entre os grupos no que diz respeito à idade gestacional do parto (37,4 semanas no GC; 36,7 semanas, GPE; $p = 0,131$), peso de nascimento dos RNs (2,56kg, GC; 2,43kg, GPE; $p = 0,760$) e escore de Apgar abaixo de sete no quinto minuto (nenhum caso nos dois grupos). A proporção de recém-nascidos PIG foi de 12,5% (5/40) no GC e 5% (1/20) no GPE, sem diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,653$).

No que diz respeito ao GPE, houve desenvolvimento precoce, com descoberta da doença antes de 34 semanas, em 3 casos (3/10, 30%). De maneira interessante, 70% (7/10) dos casos foram classificados como graves pelos critérios estabelecidos anteriormente: todos os casos por níveis pressóricos acima de 160/110 mmHg em, pelo menos, duas medidas, sendo que, em um deles, o valor da proteinúria de 24 horas também estava acima de 5 gramas. Não foram observados casos de síndrome HELLP, iminência de eclâmpsia ou eclâmpsia entre as pacientes do grupo de estudo. Apenas um caso de DPP foi descrito, em paciente que estava internada por motivo de PE grave desde 31,0 semanas (momento em que o sangue materno foi coletado), tendo o parto ocorrido cinco dias após a internação (Tabela 2).

Os casos do GPE foram analisados separadamente com relação à corionicidade e, apesar do pequeno número de casos em cada grupo, parece não haver influência deste fator sobre os parâmetros da doença, já que as medianas encontradas foram semelhantes entre os grupos com relação ao valor da proteinúria de 24h (0,42g, DC; 0,40g, MC), idade gestacional do

diagnóstico (35,0 semanas, DC; 34,3 semanas, MC) e a proporção de casos precoces (28,6%, 2/3 casos, DC; 33,3%, 1/3 casos, MC). Houve, entretanto, maior prevalência de casos graves da doença entre as gestações dicoriônicas (85,7%, 6/7) em comparação às monocoriônicas (33,3%, 1/3).

Tabela 2 - Parâmetros indicativos de pior prognóstico da doença nas gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Grupo Pré-Eclâmpsia (n = 10)
PE grave, n (%)	7 (70)
PE precoce (<34 sem), n (%)	3 (30)
HELLP ou iminência, n (%)	0 (0)
DPP, n (%)	1 (10)

DPP = descolamento prematuro de placenta; HELLP = *hemolysis, elevated liver enzymes e low platelets*; PE = pré-eclâmpsia.

5.2 Expressão placentária de células dNK e suas interleucinas reguladoras

Observou-se maior expressão de IL-15 na placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia ($p = 0,001$), quando comparadas ao GC. Com relação à expressão placentária das células dNK, IL-10 e IL-12, não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,999$; 0,063 e 0,135, respectivamente) (Tabela 3).

Ao excluir das análises os casos em que, pelo menos, um dos RNs apresentou peso ao nascer abaixo do 10º percentil (4 casos excluídos do GC e 1 caso do GPE), os resultados obtidos mantiveram-se inalterados, com diferença significativa entre os grupos apenas para expressão de IL-15, que persistiu aumentada nos casos com pré-eclâmpsia ($p = 0,006$) (Tabela 4).

Tabela 3 – Expressão placentária de células dNK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia (análise semiquantitativa) – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	0	+	++	+++	p ^a
CD56					
GC, n/N (%)	2/20 (10)	15/20 (75)	3/20 (15)	0 (0)	
GPE, n/N (%)	0 (0)	8/10 (80)	2/10 (20)	0 (0)	0,999
IL-10					
GC, n/N (%)	7/20 (35)	9/20 (45)	4/20 (20)	0 (0)	
GPE, n/N (%)	0 (0)	5/10 (50)	4/10 (40)	1/10 (10)	0,063
IL-12					
GC, n/N (%)	1/20 (5)	11 (55)	8 (40)	0 (0)	
GPE, n/N (%)	0 (0)	3 (30)	5 (50)	2 (20)	0,135
IL-15					
GC, n/N (%)	0 (0)	6 (30)	12 (60)	2 (10)	
GPE, n/N (%)	0 (0)	0 (0)	2 (20)	8 (80)	0,001

Escala semiquantitativa: 0: ausência de marcação; +: marcação fraca; ++: marcação moderada; +++: marcação forte. CD56: marcador de células *natural killer* decíduais; GC = grupo-controle; GPE = grupo pré-eclâmpsia; IL = interleucina; ^aTeste exato de Fisher.

Tabela 4 - Expressão placentária de células NK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos (análise semiquantitativa) – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	0	+	++	+++	p ^a
CD56, n/N (%)					
GPE-AIG	0 (0)	7/9 (77,8)	2/9 (22,2)	0 (0)	
GC-AIG	2/16 (12,5)	12/16 (75)	2/16 (12,5)	0 (0)	0,643
IL-10, n/N (%)					
GPE-AIG	0 (0)	5/9 (55,6)	3/9 (33,3)	1/9 (11,1)	
GC-AIG	6/16 (37,5)	7/16 (43,8)	3/16 (18,7)	0 (0)	0,111
IL-12, n/N (%)					
GPE-AIG	0 (0)	3/9 (33,3)	5/9 (55,6)	1/9 (11,1)	
GC-AIG	1/16 (6,2)	9/16 (56,3)	6/16 (37,5)	0 (0)	0,398
IL-15, n/N (%)					
GPE-AIG	0 (0)	0 (0)	2/9 (22,2)	7/9 (77,8)	
GC-AIG	0 (0)	5/16 (31,2)	9/16 (56,3)	2/16 (12,5)	0,006

Escala semiquantitativa: 0: ausência de marcação; +: marcação fraca; ++: marcação moderada; +++: marcação forte. AIG = adequado para idade gestacional; CD56: marcador de células *natural killer* decíduais; IL = interleucina; GC = grupo-controle; GPE = grupo pré-eclâmpsia; ^aTeste exato de Fisher.

A expressão destes fatores foi ainda analisada de forma quantitativa, sendo evidenciados resultados semelhantes aos descritos para a análise semiquantitativa, com maior expressão de IL-15 no GPE ($p = 0,001$), sem diferença entre os grupos para os outros anticorpos analisados (Tabela 5).

Excluindo-se da avaliação os casos de RCF, os resultados obtidos mantiveram-se inalterados, com diferença significativa entre os grupos apenas para expressão de IL-15, que persistiu aumentada nos casos com pré-eclâmpsia ($p = 0,001$) (Tabela 6).

Tabela 5 - Percentual de marcação de células dNK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle (n = 20)	Pré-Eclâmpsia (n= 10)	p^a
CD56 (%)	0,15 (0,04-0,56)	0,11 (0,04-0,35)	0,231
IL-10 (%)	3,10 (1,12-14,82)	4,55 (1,87-12,0)	0,231
IL-12 (%)	2,17 (0,81-11,57)	6,76 (1,66-17,59)	0,100
IL-15 (%)	6,09 (1,62-16,33)	34,82 (19,07-47,37)	0,001

Dados descritos como mediana (mínimo-máximo). CD56: marcador de células *natural killer* decíduais; IL = interleucina; ^aTeste de Mann-Whitney.

Tabela 6 - Percentual de marcação de células dNK e suas interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle-AIG (n = 16)	Pré-Eclâmpsia-AIG (n= 9)	p^a
CD56 (%)	0,12 (0,04-0,56)	0,11 (0,04-0,35)	0,637
IL-10 (%)	3,10 (1,12-11,82)	4,75 (1,87-12,0)	0,301
IL-12 (%)	2,17 (0,81-11,57)	7,36 (1,66-17,59)	0,074
IL-15 (%)	6,09 (1,81-16,33)	37,62 (19,07-47,37)	0,001

Dados descritos como mediana (mínimo-máximo). AIG = adequado para idade gestacional; CD56: marcador de células *natural killer* decíduais; IL = interleucina; ^aTeste de Mann-Whitney.

Os dois grupos foram ainda avaliados com relação à corionicidade e parece não haver influência deste fator sobre a expressão placentária das variáveis estudadas (no GC, envolvendo 14 DC e 6 MC, $p = 0,999$ para dNK; $p = 0,999$ para IL-10; $p = 0,630$ para IL-12 e $p = 0,999$ para IL-15; teste estatístico não apresentado para o GPE devido ao pequeno número de casos: 7 DC e 3 MC).

Adicionalmente, o GPE foi subdividido com relação à gravidade e precocidade de instalação dos sintomas e, apesar do pequeno número de casos em cada subgrupo (3 casos leves vs. 7 casos graves; 3 casos precoces vs. 7 casos tardios), parece não haver diferença entre os grupos quanto à expressão placentária de células dNK e suas interleucinas reguladoras.

5.3 Interleucinas reguladoras de células dNK no sangue materno

Observou-se, no GPE, aumento significativo nos níveis séricos maternos de IL-10 e IL-15 ($p = 0,024$) com relação ao GC, sem diferença entre os grupos para IL-12 ($p = 0,373$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Níveis séricos maternos das interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle (n = 20)	Pré-Eclâmpsia (n= 10)	p^a
IL-10 (pg/mL)	11,9 (2,1-35,5)	22,7 (4,6-46,4)	0,024
IL-12 (pg/mL)	61,5 (2,8-253,2)	102,5 (2,8-251,8)	0,373
IL-15 (pg/mL)	7,4 (0,8-25,8)	15,9 (4,0-24,2)	0,024

Dados descritos como mediana (mínimo-máximo). IL = interleucina. ^aTeste de Mann Whitney.

Os grupos foram, ainda, comparados levando em consideração o peso dos RNs ao nascimento. Pelo menos, um dos RNs foi classificado como PIG em quatro casos no GC e apenas um caso no GPE. Estas interleucinas foram, então, novamente, analisadas somente entre os casos cujos RNs apresentaram peso adequado ao nascimento, e a diferença observada entre os grupos para IL-10 ($p = 0,017$) e IL-15 ($p = 0,027$) manteve-se significativa. Com relação à IL-12, apesar de persistir não havendo diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,487$), as medianas tornaram-se mais próximas e menos divergentes (88,3 vs. 73,1 pg/mL, GC e GPE, respectivamente) nesta nova avaliação (Tabela 8).

Tabela 8 - Níveis séricos maternos das interleucinas, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle AIG (n = 16)	PE AIG (n = 9)	p ^a
IL-10 (pg/mL)	10,5 (2,0-35,5)	22,1 (4,6-46,4)	0,017
IL-12 (pg/mL)	88,3 (2,8-218,5)	73,1 (2,8-251,8)	0,487
IL-15 (pg/mL)	7,5 (0,8-25,9)	15,0 (4,0-24,2)	0,027

Dados descritos como mediana (mínimo-máximo). AIG = adequado para idade gestacional; IL = interleucina. ^aTeste de Mann Whitney.

Não houve interferência da corionicidade nos níveis séricos maternos das interleucinas no GC (para IL-10: 11,1 vs. 16,6 pg/mL, $p = 0,602$; para IL-12: 61,5 vs. 58,6 pg/mL, $p = 0,841$; e para IL-15: 7,4 vs. 9,9 pg/mL, $p = 0,718$; nas gestações gemelares DC e MC, respectivamente). Para o GPE, devido ao pequeno número de casos analisados (7 DC, 3 MC), não foi apresentado teste estatístico entre os grupos; entretanto, as medianas encontradas parecem não diferir para IL-10 (23,2 vs. 18,9 pg/mL, DC e MC, respectivamente) e IL-15 (18,6 vs. 13,6 pg/mL, DC e MC, respectivamente). De maneira diversa, as gestações gemelares MC do GPE parecem apresentar menores níveis séricos maternos de IL-12 quando comparadas às gestações DC complicadas com PE (132,2 vs. 17,6 pg/mL, DC e MC, respectivamente).

Adicionalmente, dentre as pacientes do GPE, a gravidade (medianas observadas para IL-10: 23,3 vs. 19,6 pg/mL; para IL-12: 73,1 vs. 131,8 pg/mL; e para IL-15: 15,0 vs. 16,8 pg/mL; nos casos graves e leves, respectivamente) e a idade gestacional de instalação dos sintomas (medianas observadas para IL-10: 23,2 vs. 22,1 pg/mL; para IL-12: 131,8 vs. 73,1 pg/mL; e para IL-15: 16,8 vs. 13,6 pg/mL; nos casos diagnosticados $\geq$ e $<$ 34 semanas, respectivamente) parecem não interferir nos valores séricos maternos observados para nenhuma das interleucinas avaliadas.

5.4 Fatores reguladores de angiogênese (sFlt-1 e PlGF)

Para a análise destes fatores, foram incluídas 16 pacientes no grupo-controle e 10 no grupo de estudo. Isto porque, devido à disponibilidade comercial dos kits, estas análises precisaram ser realizadas antes que todas as pacientes tivessem sido selecionadas no GC.

Observamos que as gestantes do GPE apresentaram valores maiores de sFlt-1 ($p = 0,009$) e da razão sFlt-1/PlGF ($p = 0,002$), bem como, níveis reduzidos de PlGF ($p = 0,036$), quando comparadas ao GC (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de sFIT-1, PlGF e da razão sFIT-1/PlGF, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle (n = 16)	Pré-Eclâmpsia (n= 10)	p^a
sFIT-1 (pg/mL)	7978 (5007-85000)	15920 (9062-20742)	0,009
PlGF (pg/mL)	340,6 (116,9-1956)	193 (61,35-368)	0,036
Razão sFIT-1/PlGF	24,63 (4,3-311,7)	88,71 (31,79-283,62)	0,002

Dados descritos como mediana (mínimo-máximo). PlGF = *placental growth factor*; sFIT-1 = *soluble fms-like tyrosine kinase-1*; ^aTeste de Mann Whitney.

Em seguida, foi realizada comparação entre estes mesmos fatores e sua razão levando em consideração o peso dos RNs ao nascimento. Foram, então, excluídas desta análise 2 casos de gestações com RNs PIG no GC e 1 caso no GPE. Dessa forma, quando os marcadores de angiogênese foram novamente analisados, as diferenças entre sFlt-1 ($p = 0,007$), PlGF ($p = 0,023$) e a razão sFlt-1/PlGF ($p = 0,001$) mantiveram-se significativas entre os dois grupos, de forma semelhante ao exposto anteriormente (Tabela 10).

Tabela 10 - Valores de sFIT-1, PIGF e da razão sFIT-1/PIGF, de acordo com os grupos controle e pré-eclâmpsia, e o peso de nascimento dos recém-nascidos – HC-FMUSP – São Paulo, 2015-2017

	Controle AIG (n = 14)	PE AIG (n = 9)	p ^a
sFIT-1 (pg/mL)	7978 (5007-15518)	14496 (9602-20742)	0,007
PIGF (pg/mL)	529,3 (130,1-1956)	190,9 (61,35-368)	0,023
Razão sFIT-1/ PIGF	20,55 (4,3-81,49)	85,59 (31,79-283,61)	0,001

Dados descritos como mediana (mínimo-máximo). AIG = adequado para idade gestacional; PE = pré-eclâmpsia; PIGF: *placental growth factor*; sFIT-1: *soluble fms-like tyrosine kinase-1*; ^aTeste de Mann-Whitney.

Não foi observada diferença significativa entre nenhum destes fatores relacionados à angiogênese, quando as pacientes do GC foram separadas com relação à corionicidade (sFlt-1, $p = 0,79$; PIGF, $p = 0,87$ e razão sFlt-1/PLGF, $p = 0,95$). Para o GPE, também parece não haver diferença entre os casos quanto à corionicidade, dada a semelhança entre os valores observados para as suas medianas (sFlt-1 = 15920 vs. 15561 pg/mL; PIGF = 193,3 vs. 195,6 pg/mL; e a razão sFlt-1/PLGF = 88,7 vs. 91,4; DC e MC, respectivamente).

Adicionalmente, ao avaliar os casos do GPE com relação às características de gravidade e idade gestacional de início da instalação dos sintomas, parece não haver diferença entre os casos leves e graves (sFlt-1 = 13888 vs. 15923 pg/mL; PIGF = 229,7 vs. 193 pg/mL; razão sFlt-1/PIGF = 80,44 vs. 88,71, respectivamente) nem entre aqueles cujo diagnóstico de PE tenha se dado $\geq$ ou $<$ 34 semanas (sFlt-1 = 14446 vs. 18673 pg/mL; PIGF = 157 vs. 196 pg/mL; razão sFlt-1/PIGF = 85,59 vs. 94,51, respectivamente), para nenhum dos fatores angiogênicos analisados.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão de células dNK e suas citocinas em gestações gemelares com PE e naquelas sem comorbidades no terceiro trimestre, evidenciando aumento da expressão placentária de IL-15 e dos níveis séricos maternos de IL-10 e IL-15 no GPE.

Apesar dos inúmeros avanços na área científica e no campo tecnológico, os mecanismos para predição e diagnóstico precoce da PE ainda não estão completamente esclarecidos, sobretudo nos casos que cursam com maior gravidade, como as gestações múltiplas. Grande parte desta dificuldade reside nas lacunas que ainda persistem a serem preenchidas quanto à fisiopatogenia e aos fatores de risco envolvidos nesta doença.

6.1 Caracterização da população

Nossos dados demonstraram não haver diferença entre os grupos quanto à caracterização da população, apesar de ter sido observada maior proporção de gestantes nulíparas e não brancas no GPE, embora sem significância estatística. Em consonância com estes achados, os estudos relatam que a incidência de PE é maior nas circunstâncias em que a formação de anticorpos para os antígenos placentários locais pode estar comprometida, evento que pode acontecer na primeira gestação^{11,12}. Sabe-se, ainda, que, em relação à população de primíparas, a incidência de PE é o dobro na população afrodescendente quanto comparada à população branca¹¹⁸. Este fator de risco pode estar ainda correlacionado ao nível socioeconômico destas pacientes, em que a falta de assistência pré-natal ou assistência precária propiciam o desenvolvimento da doença e sua evolução para formas mais graves⁵.

De maneira interessante, observamos que as gestantes do GC iniciaram o pré-natal mais tardiamente do que as pacientes que desenvolveram PE.

Seria válido supor que este atraso na assistência materno-fetal pudesse ter interferido nos desfechos clínicos gestacionais, facilitando o surgimento de complicações. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os grupos quanto aos resultados obstétricos e perinatais. Parte deste achado pode ser explicada pelo fato de que a mediana para idade gestacional de início da assistência pré-natal no GC foi de 20 semanas (vs. 12,5 semanas no GPE), estágio no qual, apesar de tardio, a maioria das complicações obstétricas ainda poderia ser prevenida ou detectada precocemente. Além disso, o número pequeno de casos em cada grupo limita análises mais precisas desta população, determinando intervalo amplo entre os valores mínimo e máximo para cada grupo.

É bem descrito na literatura científica que os distúrbios hipertensivos relacionados à gestação têm mais chance de ocorrer no grupo de gestações múltiplas. Os dados sugerem que o número de fetos e a massa placentária estariam envolvidos na patogênese da doença. Nas gestações múltiplas, a hipertensão não apenas ocorre com maior frequência, como também tende a surgir mais precocemente e ser mais grave. Consistente com estes dados estão os nossos resultados de que 70% dos casos no GPE foram caracterizados como graves, e, destes, a grande maioria (6/7, 85%) era constituída por gestações gemelares dicoriônicas. Diversos estudos foram realizados buscando estabelecer uma associação entre a corionicidade e a PE, entretanto, os resultados observados foram conflitantes. Enquanto alguns autores postulam maior risco de desenvolvimento da doença à medida que aumenta o tamanho da massa placentária, outros não evidenciaram relação entre os achados¹¹⁹⁻¹²². Nosso estudo limita-se a descrever estes dados, já que nos falta um maior número de casos para estabelecer uma medida de associação significativa entre a corionicidade e a gravidade da doença.

6.2 Expressão placentária de células dNK e suas interleucinas reguladoras

Ainda que a etiologia da PE não esteja inteiramente elucidada, diversos estudos têm apontado a placenta como a principal responsável pelas manifestações clínicas desta condição, já que, em última análise, o parto é a única cura definitiva para a doença^{5,12}. Em contraste com a gestação normal, na PE, ocorre uma hipoperfusão placentária, resultando em hipóxia tecidual e isquemia local. Nesse processo, há marcantes alterações hemodinâmicas, responsáveis por um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstrictores, levando a um aumento da resistência vascular periférica e da pressão arterial sistêmica¹².

Considerando que a interação adequada entre os grupos celulares presentes na interface materno-fetal é mediada pelas células do sistema imune¹²¹, seria razoável supor que, em pacientes com PE, fosse observada uma modificação da expressão de células dNK – importante grupo celular presente na decídua – quando em comparação às gestantes sem comorbidades. Entretanto, os estudos realizados em gestações únicas no terceiro trimestre ainda são inconclusivos, independentemente do método laboratorial utilizado, seja por citometria de fluxo seja por meio de técnicas de imuno-histoquímica. Enquanto alguns autores demonstraram aumento desta população celular no GPE⁶²⁻⁶⁴, outros demonstraram diminuição das células dNK nos casos portadores da doença^{65,66}. Vale ressaltar que não há evidência na literatura, até o momento, de estudos avaliando estes fatores em gestações múltiplas.

Nossos dados não demonstraram diferença entre os grupos quanto à expressão placentária de células dNK no terceiro trimestre. Os dados foram inicialmente obtidos por meio de metodologia semiquantitativa em cruces, executada por três avaliadores cegados. Posteriormente, estes resultados foram confirmados por meio de técnica quantitativa, utilizando *software* específico, na tentativa de minimizar possíveis vieses de avaliação. Nossos achados estão em consonância com aqueles descritos por Eide e colaboradores (2006)⁶⁷ que avaliaram gestações únicas com e sem PE, e não

observaram diferença entre os grupos com relação à quantidade de células dNK. Tal fato pode sugerir uma maior participação da função e interação destas células na fisiopatologia da doença, em detrimento da sua expressão numérica.

Sabe-se que essa interação é parte importante do reconhecimento imunológico na interface materno-fetal e é mediada, sobretudo, por receptores KIR presentes nas células dNK e ligantes do sistema HLA pertencentes às células trofoblásticas⁵⁴. Os receptores KIR são codificados por genes do complexo de receptores leucocitários, situados no cromossomo 19q13.4 e representam, atualmente, os maiores reguladores da função das células dNK¹²³. Diversos genes e pseudogenes foram identificados, mas aqueles envolvidos com o processo de invasão trofoblástica na gestação são: KIR2DL1 e KIR2DL2, com função inibitória e KIR2DS1, com propriedades de ativação⁵⁵. A depender da maior quantidade de receptores inibitórios ou ativadores, podemos encontrar haplótipos KIR A ou B, respectivamente.

Foi demonstrado que pacientes com haplótipo A (inibitório) em associação com fetos contendo HLA-C2 possuem risco aumentado de apresentar desordens no processo de placentação, com maior possibilidade de desenvolvimento de PE^{55,56}. Em contraste, gestantes portadoras de haplótipo KIR B (com receptores de ativação) possuem algum fator de proteção contra o aparecimento de doenças relacionadas à invasão trofoblástica inadequada, já que permitem a produção e liberação pelas células dNK de citocinas responsáveis pelo remodelamento vascular, como PIGF, VEGF e GM-CSF¹²⁴. Os métodos para quantificação laboratorial destes receptores KIR baseiam-se em técnicas de genotipagem de biologia molecular e podem representar importante ferramenta propedêutica.

Vê-se, portanto, que a atuação das células dNK na fisiopatologia da PE ultrapassa a superficialidade de sua expressão numérica e remete, possivelmente, a aspectos genéticos e moleculares envolvidos com sua função e com sua interação com outros grupos celulares presentes na interface materno-fetal.

Com relação à expressão placentária das citocinas reguladoras de células dNK, observamos aumento de IL-15 no GPE, sem diferença entre os grupos para as outras interleucinas analisadas. Os estudos relacionando a expressão placentária de IL-15 em pacientes com PE são escassos. Entretanto, nossos dados assemelham-se àqueles observados por Bachmayer e colaboradores (2006), em estudo conduzido em gestações únicas no terceiro trimestre⁶⁴.

IL-15 é capaz de agir localmente na interface materno-fetal, e induzir a proliferação e maturação das células dNK⁹⁸. Hromadnikova e colaboradores (2016) demonstraram, recentemente, que esta interleucina é capaz de estimular a proliferação de receptores inibitórios KIR2DL2/L3 na superfície de células dNK¹²⁵. Dessa forma, o aumento da expressão placentária de IL-15 poderia dificultar a liberação de fatores angiogênicos pelas células dNK, perturbando o remodelamento vascular adequado, contribuindo para o surgimento de PE. Além disso, um aumento na expressão de IL-15 pode ser capaz de aumentar a liberação de IFN-gama pelas células dNK, importante fator inflamatório, com propriedades deletérias sobre a invasão trofoblástica⁹⁸.

Sabe-se que, ao ser liberado pelas células dNK, o IFN-gama age sobre essas mesmas células aumentando a expressão de receptores inibitórios em sua superfície, perpetuando esta cadeia de eventos danosos ao remodelamento vascular¹²⁶.

Quanto às outras citocinas reguladoras (IL-10 e IL-12), não observamos modificações na sua expressão placentária ao comparar os dois grupos. Os achados descritos na literatura sobre este assunto são escassos, mesmo entre gestações únicas, e parecem apontar para uma diminuição destes fatores no GPE^{64,82,94}. O pequeno número de casos e o amplo intervalo observado entre os valores mínimo e máximo nos dois grupos limitam a nossa avaliação e não permitem conclusões categóricas sobre esses aspectos.

6.3 Interleucinas reguladoras de células dNK no sangue materno

Sabe-se que a PE está associada à ativação imunológica crônica, resultando em um desbalanço local e sistêmico na produção de citocinas, com predomínio do padrão pró-inflamatório¹². Diversos estudos observaram de forma consistente um aumento dos níveis séricos maternos de fatores pró-inflamatórios, como TNF-alfa, IL-6 e IL-15, em gestantes portadoras de PE¹²⁷⁻¹²⁹. De forma particular, estas citocinas parecem estar envolvidas na disfunção endotelial observada, contribuindo para os sinais e sintomas da doença. Demonstrou-se que estas substâncias podem provocar alterações funcionais e estruturais, incluindo danos oxidativos e comprometimento dos mecanismos de vasoconstrição e relaxamento dos vasos, o que resultaria em alterações da integridade vascular e da hemostasia¹³⁰.

Em consonância com estes resultados, nossos dados demonstraram elevação dos níveis séricos maternos de IL-15 no GPE. Esta interleucina tem reconhecida atividade pró-inflamatória, e é capaz de modular a ativação e proliferação de células dNK, podendo exercer papel fundamental no desenvolvimento da PE^{97,98}. Ademais, IL-15 estimula a liberação de TNF-alfa e IFN-gama pelas células da interface materno-fetal, notadamente as células dNK. É descrito que essas substâncias são potentes agentes inflamatórios, atuando de forma deletéria sobre o remodelamento vascular e a angiogênese^{70,95}.

Com relação às outras citocinas avaliadas, nossos resultados demonstraram ainda aumento dos níveis séricos maternos de IL-10 nas gestantes portadoras de PE. Os dados publicados na literatura ainda são conflitantes quanto à participação deste fator na fisiopatologia da PE. Hennessy e colaboradores (1999)⁸², e Pinheiro e colaboradores (2013)⁸³ demonstraram diminuição dos níveis séricos maternos desta citocina na segunda metade da gestação nos casos de PE. Por outro lado, autores como Olusi e colaboradores (2000)⁸⁷, e Madazli e colaboradores (2003)⁸⁶ descreveram um aumento na expressão dessa substância no sangue materno no terceiro trimestre em gestantes portadoras da doença.

Considerando que, nos casos de PE diagnosticada, os eventos na interface materno-fetal relacionam-se a um aumento da atividade inflamatória local, a elevação observada no nosso estudo nos níveis séricos de IL-10 nas pacientes portadoras de PE pode corresponder a uma resposta do organismo materno, já que esta é uma citocina com reconhecida atividade anti-inflamatória. A evidência desta alteração somente no sangue materno, sem diferença estatística entre os grupos na expressão placentária de IL-10, pode sugerir que o esforço materno para equilibrar as tensões pró e anti-inflamatórias deu-se somente em nível sérico, sem êxito comprovado localmente, na avaliação placentária.

Tendo em vista que 70% dos nossos casos de PE foram classificados como graves, parte dos achados relacionados às diferenças entre os grupos nos títulos de IL-10 pode ter influência deste fator. Podemos supor que a tentativa materna de balancear a exacerbação da resposta inflamatória não encontrou resposta efetiva na avaliação decidual porque estávamos diante de casos mais graves da doença; ou ainda que a não elevação da expressão placentária da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo PE permitiu a progressão para níveis mais graves da doença. Para ratificar estas hipóteses, seria necessário maior número de pacientes portadoras da doença, de forma que pudéssemos analisar separadamente os casos leves e graves, buscando estabelecer se a ausência de resposta anti-inflamatória localmente, na placenta, estaria relacionada à gravidade da PE.

6.4 Fatores reguladores de angiogênese (sFlt-1 e PlGF)

Nossos resultados demonstraram uma diminuição nos níveis séricos de PlGF nas gestantes do GPE, em comparação ao GC. Sabe-se que o PlGF, importante fator angiogênico capaz de promover invasão trofoblástica adequada, é produzido pelas células dNK, em um mecanismo mediado pela ação da IL-15¹⁰⁷. A produção deste fator é modulada pela interação entre receptores KIR presentes nas células dNK e moléculas do sistema HLA

encontradas no trofoblasto, bem como, pela ativação de inúmeros receptores presentes nas células dNK, como NKG2D, NKp30, NKp44 e NKp46¹³⁰.

As moléculas de PIGF atuam sobre receptores específicos, conhecidos como Flt-1, presentes na musculatura lisa da parede dos vasos sanguíneos, nas células endoteliais e no trofoblasto, promovendo angiogênese¹¹¹. Esse efeito é inibido pela ação de uma forma alternativa solúvel deste receptor, conhecida como sFlt-1, que bloqueia a sinalização intracelular induzida pelo PIGF, instituindo um estado de antiangiogênese, com consequente dificuldade nos mecanismos de remodelação vascular placentária, favorecendo o desenvolvimento da PE¹¹¹. É bem descrito na literatura aumento dos níveis séricos maternos de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF nos casos de PE, seja em gestações únicas seja em múltiplas, de forma semelhante ao que foi demonstrado nesse estudo¹¹¹⁻¹¹³.

Estes achados, sobretudo com relação ao comportamento dos valores de PIGF no GPE, parecem corroborar nossa hipótese de que as modificações na interface materno-fetal, envolvendo a participação das células dNK, dão-se mais na sua função - por meio da produção e liberação de substâncias, e da sua interação com outros tipos celulares, a depender do tipo de receptores presentes em sua superfície – do que na sua quantidade.

6.5 Considerações finais

Trata-se, até o presente momento, do primeiro estudo avaliando a participação de células dNK em gestações gemelares complicadas com PE. Considerando o aumento do número de casos de gestações múltiplas nas últimas décadas e a maior gravidade com que doenças, como a PE, podem acometer este grupo de pacientes, nossos dados revestem-se de importância clínica e epidemiológica. Além disso, buscamos aprofundar nossas análises nos mecanismos imunológicos envolvidos nesta doença, tentando decifrar sua fisiopatologia, ainda hoje parcialmente desconhecida.

Entretanto, apesar do aumento de sua incidência e de constituir uma população atraente do ponto de vista clínico, as gestações múltiplas ainda representam uma modesta parcela dos casos obstétricos, tornando a casuística dos estudos realizados em centros únicos – mesmo que terciários e de referência, como o nosso – ainda pequena. Dessa forma, faz-se necessário, para corroborar os nossos achados, trabalhos científicos com número de casos mais representativo.

Além disso, nossos dados apontam para a possibilidade de alterações funcionais na interface materno-fetal nos casos de PE, que merecem ser investigadas por meio de metodologia laboratorial específica, com o aprofundamento molecular necessário para tentar alcançar, de uma vez por todas, a etiologia indecifrável desta doença.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente estudo envolvendo gestações gemelares do GPE e GC, no terceiro trimestre, concluiu que:

- a)** não houve diferença entre os dois grupos com relação à expressão placentária de células dNK;
- b)** houve maior expressão placentária de IL-15 e aumento dos níveis séricos maternos de IL-10 e IL-15 no GPE;
- c)** observaram-se níveis séricos maternos maiores de sFlt-1 e da razão sFlt-1/PIGF e menores de PIGF no GPE.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Expressão de células *natural killer* decíduais e suas citocinas em gestações gemelares complicadas com pré-eclâmpsia

PESQUISADOR: Profa. Dra. Maria de Lourdes Brizot
CARGO/FUNÇÃO: Livre-Docente do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia FMUSP
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 62218
UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Obstetrícia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Essas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária nesse estudo, que tem como objetivo avaliar a presença de células na placenta e sangue de gestantes gemelares com pressão alta, comparando com gestantes gemelares sem este ou outros problemas de saúde. Hoje em dia, o aumento da pressão é um das doenças mais comuns na gravidez e, se não diagnosticado e tratado corretamente, pode trazer problemas sérios para mãe e seus bebês.

Se concordar em participar, precisaremos coletar um pedaço pequeno da placenta e um pouco do seu sangue de uma veia no braço, próximo ao parto. Esse material será levado para o laboratório onde será realizada a análise dessas substâncias. O pedaço que será retirado não prejudicará outros exames que já são realizados na placenta. Esse estudo provavelmente não trará nenhum benefício direto para sua gravidez, mas sua participação é muito importante para uma melhor assistência no futuro para mulheres com gestações de gêmeos e pressão alta.

Se você não quiser participar, o seu atendimento não será prejudicado, você continuará recebendo os mesmos cuidados no pré-natal e parto. Se você mudar de ideia, poderá pedir para ser retirada da pesquisa a qualquer momento. Seu nome e sua identificação não serão revelados fora do hospital em nenhum momento. As informações obtidas serão utilizadas somente para este estudo, e serão analisadas em conjunto, não sendo divulgada a identificação de nenhuma paciente individualmente. Você terá o direito de conhecer os resultados desta pesquisa depois, se desejar. Lembramos que a participação nesta pesquisa é voluntária, e não há nenhum tipo de cobrança ou pagamento.

Em qualquer momento do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisa será realizada pela aluna de pós-graduação Dra Isabela Karine Rodrigues Agra, sob orientação da pesquisadora responsável Dra Maria de Lourdes Brizot, que podem ser encontrados no endereço: Hospital das Clínicas, 10º andar ou por telefone: 2661.6209 ou 3091.7307.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Expressão de células *natural killer* decíduais e suas citocinas em gestações gemelares complicadas com pré-eclâmpsia”.

Eu discuti com a Dra. Isabela Karine Rodrigues Agra sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo
Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

8.2 Anexo B – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria do HC-FMUSP.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: EXPRESSÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER DECIDUAIS E SUAS CITOCINAS EM GESTAÇÕES GEMELARES COMPLICADAS COM PRÉ-ECLÂMPSIA
Pesquisador Responsável: Maria de Lourdes Brizot **Versão:** 1
Pesquisador Executante: Isabela Karine Rodrigues Agra **CAAE:** 46741815.8.0000.0068
Coautores: Mara Sandra Hoshida, Rossana P.V. Francisco, Marcelo Zugaib
Instituição: HCFMUSP
Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13578

Número do Parecer: 1.151.162

Data da Relatoria: 15/07/2015

Apresentação do Projeto: O projeto apresenta adequadamente a casuística e o contexto clínico e sua relevância.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo da pesquisa, que é investigar a expressão gênica nas células NK presentes na placenta e sua relação com a pré-eclâmpsia está claramente definido no projeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os riscos são mínimos e em nada afetam o desenvolvimento do estudo. Os benefícios são apenas indiretos, mas justificam plenamente a pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa tem relevância e viabilidade altas, sendo esperada sua conclusão com sucesso.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido tem ótima redação, com texto simples e acessível, cumprindo todos os objetivos de esclarecer os participantes. O texto do TCLE pode ser considerado praticamente como um modelo a ser seguido.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O projeto tem todas as condições para ser aprovado pela comissão.

Situação do Parecer: Aprovado.

Necessita Apreciação da CONEP: Não.

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante o CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 15 de Julho de 2015

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

9 REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. Sebire NJ, Snijders RJ, Hughes K, Sepulveda W, Nicolaides KH. The hidden mortality of monochorionic twin pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:1203-07.
2. Garne E, Andersen HJ. The impact of multiple pregnancies and malformations on perinatal mortality. *J Perinat Med.* 2004;32:215-9.
3. Conde-Agudelo A, Belizan JM, Lindmark G. Maternal morbidity and mortality associated with multiple gestations. *Obstet Gynecol.* 2000;95:899-904.
4. Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, *et al.* Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(4):938-42.
5. Bittar RE, Pereira PP, Liao AW, Fittipaldi FS. Doença hipertensiva específica da gestação. In: Zugaib, M, editor. *Zugaib Obstetrícia.* 2a ed. Barueri: Manole; 2012. p. 633-62.
6. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet.* 2006;367:1066-74.
7. Zanette E, Parpinelli MA, Surita FG, Costa ML. Maternal near miss and death among women with severe hypertensive disorders: a Brazilian multicenter surveillance study. *Reproductive Health.* 2014;11:4.
8. Vega C, Kahhale S, Zugaib M. Maternal mortality due to arterial hypertension in São Paulo city (1995-1999). *Clinics.* 2007;62:679-84.
9. Brasil. Ministério da Saúde. *Sistema de Informações sobre Mortalidade.* Acesso em: 31 jul. 2017. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>.
10. Assunção RA. *Perfil clínico-epidemiológico das gestações gemelares com parto no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no período de 2003 a 2006* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

11. American College of Obstetricians and Gynecologists. Chronic hypertension in pregnancy. ACOG Practice Bulletin No. 125. *Obstet Gynecol.* 2012;119:396-407.
12. Chaiworapongsa T, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol.* 2014 Aug;10(8):466-80.
13. Young J. The aetiology of eclampsia and albuminuria and their relation to accidental haemorrhage: an anatomical and experimental investigation. *Proc R Soc Med.* 1914;7:307-48.
14. Ogden E, Hildebrand GJ, Page EW. Rise of blood pressure during ischemia of gravid uterus. *Proc Soc Exp Bio Med.* 1940;43:49-51.
15. Lunell NO, Nylund LE, Lewander R, Sarby B. Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked gamma camera. *Clin Exp Hypertens.* 1982;105-17.
16. Lam C, Lim KH, Karumanchi AS. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension.* 2005;46:1077-85.
17. Staff AC, Dechend R, Redman CW. Review: preeclampsia, acute atherosclerosis of the spiral arteries and future cardiovascular disease: two new hypotheses. *Placenta.* 2013;34(Suppl.):S73–S78.
18. Schrey-Petersen S, Stepan H. Anti-angiogenesis and preeclampsia in 2016. *Curr Hypertens Rep.* 2017 Jan;19:6.
19. Ball E, Bulmer JN, Ayis S, Lyall F, Robson, SC. Late sporadic miscarriage is associated with abnormalities in spiral artery transformation and trophoblast invasion. *J. Pathol.* 2006;208:535-42.
20. Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS. Placental bed disorders in preterm labor, preterm PROM, spontaneous abortion and abruptio placentae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun;25(3):313-27.
21. Labarrere CA, DiCarlo HL, Bammerlin E, Hardin JW, Kim YM, Chaemsaitong P, *et al.* Failure of physiologic transformation of spiral arteries, endothelial and trophoblast cell activation, and acute atherosclerosis in the basal plate of the placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 2017 Mar;216(3):287.e1-287.e16.
22. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63:534-43.

23. Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Mar 5;370(1663):20140071.
24. Moffett A, Hiby SE. How does the maternal immune system contribute to the development of preeclampsia? *Placenta*. 2007;28(Suppl. A):S51–S56.
25. Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol*. 1953;7:320-38.
26. Billingham RE, Silvers WK. Sensitivity to homografts of normal tissues and cells. *Annu Rev Microbiol*. 1963;17:531-64.
27. Bradshaw J. Case of advanced abdominal pregnancy. *Br Med J*. 1963 May 18;1(5341):1330.
28. Foster HW, Moore DT. Abdominal pregnancy: report of 12 cases. *Obstet Gynecol*. 1967 Aug;30(2):249-52.
29. Billingham RE. Transplantation immunity and maternal fetal relation. *N Eng J Med*. 1964;270:667.
30. Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update*. 2001;7:135-60.
31. Arvelund-Svensson J, Ernerudh J, Buse E, Cline JM, Haeger JD, Dixon D, *et al*. The placenta in toxicology. Part II: systemic and local immune adaptations in pregnancy. *Toxicologic Pathology*. 2014;42:327-38.
32. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*. 2004;63:1-12.
33. Damjanov I. Vesalius and Hunter were right: decidua is a membrane. *Lab Invest*. 1985;53:597.
34. Lash GE, Robson SC, Bulmer JN. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta*. 2010;31:S87-92.
35. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci*. 2010;17:209-18.
36. Kaufmann P, Scheffen I. Placental development. In: Polin R, Fox W (eds). *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: Saunders;1992. p. 47.

37. Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, *et al.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest.* 2004;114:744-54.
38. Dubinsky V, Poehlmann TG, Suman P, Gentile T, Markert UR, Gutierrez G. Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(3):193-9.
39. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen RN. *Pathology of human placenta.* New York: Springer-Verlag; 2006.
40. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2010;17:209-18.
41. Bulmer JN, Williams PJ, Lash GE. Immune cells in the placental bed. *Int J Dev Biol.* 2010;4:281-94.
42. Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human Reprod.* 1991;6:791-8.
43. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:656-63.
44. Rieger L, Segerer S, Bernar T, Kapp M, Majic M, Morr AK, *et al.* Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia - a prospective observational study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:132.
45. Sanchez-Rodriguez EN, Nava-Salazar S, Mendoza-Rodriguez CA, Moran C, Romero-Arauz JF, Ortega E, *et al.* Persistence of decidual NK cells and KIR genotypes in healthy pregnant and preeclamptic women: A case-control study in the third trimester of gestation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:8.
46. Le Bouteiller P, Bensussan A. Up-and-down immunity of pregnancy in humans. *F1000Res.* 2017 Jul 25;6:1216.
47. Rai R, Sacks G, Trew G. Natural Killer cells and reproductive failure – theory, practice and prejudice. *Human Reprod.* 2005; 20(5):1123-6.
48. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, *et al.* Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med.* 2003;198:1201-12.
49. Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod.* 2000;63:683-7.

50. Keskin DB, Allan DS, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JN, Kopcow HD, *et al.* TGF β promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:3378-83.
51. Ye W, Zheng LM, Young JD, Liu CC. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J Exp Med.* 1996;184:2405-10.
52. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:387-411.
53. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell Mol Immunol.* 2011;8:1-11.
54. Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol.* 2011;90:703-16.
55. Parham P, Norman PJ, Abi-Rached L, Hilton HG, Guethlein LA. Review: immunogenetics of human placentation. *Placenta.* 2012;33(Suppl.):S71-80.
56. Hiby SE, Apps R, Sharkey AM, Farrell LE, Gardner L, Mulder A, *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure mediated by fetal HLA-C2. *J Clin Investig.* 2010;120:4102-10.
57. Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, *et al.* Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol.* 2006;80:572-80.
58. Fraser R, Whitley GS, Johnstone AP, Host AJ, Sebire NJ, Thilaganathan B, *et al.* Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J Pathol.* 2012;228:322-32.
59. Kahhale S, Zugaib M. Conceito, classificação e incidência das síndromes hipertensivas na gestação. In: Kahhale S, Zugaib M (eds.). *Síndromes hipertensivas na gravidez.* Rio de Janeiro: Atheneu; 1995. p. 1-14.
60. Redman C. The six stages of pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2014 Jul;4(3):246.
61. Wallace AE, Fraser R, Cartwright JE. Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodelling partnership. *Hum Reprod Update.* 2012;18:458-71.
62. Stallmach T, Hebisch G, Orban P, Lu X. Aberrant positioning of trophoblast and lymphocytes in the feto-maternal interface with pre-eclampsia. *Virchows Arch.* 1999;434:207-11.

63. Wilczynski JR, Tchorzewski H, Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Szpakowski M, *et al.* Cytokine secretion by decidual lymphocytes in transient hypertension of pregnancy and pre-eclampsia. *Mediators of Inflammation*. 2002;11:105-11.
64. Bachmayer N, Hamad RR, Liszka L, Bremme K, Sverremark-Ekstro E. Aberrant uterine natural killer (NK)-cell expression and altered placental and serum levels of the NK-cell promoting cytokine interleukin-12 in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2006;56:292-301.
65. Williams PJ, Bulmer JN, Searle RF, Innes BA, Robson SC. Altered decidual leucocyte populations in the placental bed in pre-eclampsia and foetal growth restriction: a comparison with late normal pregnancy. *Reproduction*. 2009;138:177-84.
66. Rieger L, Segerer S, Bernar T, Kapp M, Majic M, Morr AK, *et al.* Specific subsets of immune cells in human decidua differ between normal pregnancy and preeclampsia - a prospective observational study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009;7:132.
67. Eide IP, Rolfseng T, Isaksen CV, Mecsei R, Roald B, Lydersen S, *et al.* Serious foetal growth restriction is associated with reduced proportions of natural killer cells in decidua basalis. *Virchows Arch*. 2006;448:269-76.
68. Murphy SP, Sharma S. IL-10 and pregnancy. In: Gil Mor., editor. *Immunology of Pregnancy*. NY: Springer Science; 2004. p. 26-36.
69. Weetman AP. The immunology of pregnancy. *Thyroid*. New York. 1999;9:643-6.
70. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.
71. Lin H, Mossmann TR, Guibert L, Tuntipopat S, Wegmann TG: Synthesis of T helper-2 cytokines at the maternal fetal interface. *J Immunol*. 1993;151:4562-73.
72. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-10.
73. Cornelius DC, Lamarca B. TH17- and IL-17-mediated autoantibodies and placental oxidative stress play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Minerva Ginecologica*. 2014;66(3):243-9.
74. Kalkunte S, Nevers T, Norris WE, Sharma S. Vascular IL-10: A protective role in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88(2):165-9.

75. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170:2081-95.
76. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, *et al*. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol*. 2000;164:5721-8.
77. Thaxton JE, Sharma S. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):2-14.
78. Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, *et al*. Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(3):E231-40.
79. Cheng SB, Sharma S. Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2015 Jun;73(6):487-500.
80. Kalkunte S, Lai Z, Tewari N, Chichester C, Romero R, Padbury J, Sharma S. In vitro and in vivo evidence for lack of endovascular remodeling by third trimester trophoblasts. *Placenta*. 2008;29(10):871-8.
81. Lai Z, Kalkunte S, Sharma S. A critical role of interleukin-10 in modulating hypoxia-induced preeclampsia-like disease in mice. *Hypertension*. 2011;57(3):505-14.
82. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol*. 1999 Sep 15;163(6):3491-5.
83. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota APL, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira ACO, *et al*. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*. 2013;62:165-73.
84. Kalkunte S, Boij R, Norris W, Friedman J, Lai Z, Kurtis J, *et al*. Sera from preeclampsia patients elicit symptoms of human disease in mice and provide a basis for an in vitro predictive assay. *Am J Pathol*. 2010 Nov;177(5):2387-98.
85. Xie C, Yao MZ, Liu JB, Xiong LK. A meta-analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 in preeclampsia. *Cytokine*. 2011;56:550-9.
86. Madazli R, Aydin S, Uludag S, Vildan O, Tolun N. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003;82:797-802.

87. Olusi SO, Diejomaoh M, Omu A, Abdulaziz A, Prabha K, George S. Interleukins in preeclampsia. *Ann Saudi Med.* 2000;20:4-7.
88. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 1989 Sep 1;170(3):827-45.
89. Cassatell MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri C. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol.* 1995;25:1-5.
90. Macatoni SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh C, Culpepper JÁ, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4 cells. *J Immunol.* 1995;154:5071-9.
91. Zourbas S, Dubanchet S, Martal J, Chaouat G. Localization of pro-inflammatory (IL-12, IL-15) and anti-inflammatory (IL-11, IL-13) cytokines at the foeto-maternal interface during murine pregnancy. *Clinical and Experimental Immunology.* 2001;126:519-28.
92. Roth I, Fisher SJ. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol.* 1999;205:194-204.
93. Karmakar S, Dhar R, Das C: Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon gammamediated pathway. *J Biol Chem.* 2004;279:55297–307.
94. Wilczynski JR, Tchorzewski H, Głowacka E, Banasik M, Szpakowski M, Wieczorek A, et al. 'In vitro' cytokine secretion by peripheral blood and decidual lymphocytes during the third trimester of normal pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 2003;55(2):68-72.
95. McRae BL, Semnani RT, Hayes MP, van Seventer GA. Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol.* 1998;160:4298-304.
96. Taylor BD, Ness RB, Klebanoff MA, Zoh R, Bass D, Hougaard DM, et al. First and second trimester immune biomarkers in preeclamptic and normotensive women. *Preg Hyper: An Int J Women's Card Health.* 2016:1-6.
97. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein KH, Kumaki S, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* 1994;13:2822-30.
98. Barber EM, Pollard JW. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 2003;71:37-46.

99. Kiso Y, Pollard JW, Croy BA. A study of granulated metrial gland cell differentiation in pregnant, macrophage-deficient, osteopetrotic (op/op) mice. *Experientia*. 1992;48:973-5.
100. Toth B, Haufe T, Scholz C, Kuhn C, Friesse K, Karamouti M, *et al.* Placental interleukin-15 expression in recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2010;64:402-10.
101. Park SY, Yun S, Ryu BJ, Han AR, Lee SK. Trophoblasts regulate natural killer cells via control of interleukin-15 receptor signaling. *Am J Reprod Immunol*. 2017:e12628.
102. Davisson RL, Hoffmann DS, Butz GM, Aldape G, Schlager G, Merrill DC, *et al.* Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia. *Hypertension*. 2002;39:337-42.
103. El-Baradie SM, Mahmoud M, Makhoulf HH. Elevated serum levels of interleukin-15, interleukin-16, and human chorionic gonadotropin in women with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can*. 2009 Feb;31(2):142-8.
104. Kalantar F, Rajaei S, Heidari AB, Mansouri R, Rashidi N, Izad MH, *et al.* Serum levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-15 and interleukin-10 in patients with pre-eclampsia in comparison with normotensive pregnant women. *Iran J Nurs Midwifery Res*. 2013 Nov;18(6):463-6.
105. Faas MM, Spaans F, De Vos P. Monocytes and macrophages in pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol*. 2014;5:298.
106. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001 Feb;26(1):25-35.
107. Manaster I, Mandelboim O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta*. 2008;29:60-6.
108. Nejabati HR, Latifi Z, Ghasemnejad T, Fattahi A, Nouri M. Placental growth factor (PlGF) as an angiogenic/inflammatory switcher: lesson from early pregnancy losses. *Gynecological Endocrinology*. 2017;Early online:1-7.
109. Kroger C, Vijayaraj P, Reuter U, Windoffer R, Simmons D, Heukamp L, *et al.* Placental vasculogenesis is regulated by keratin-mediated hyperoxia in murine decidual tissues. *Am J Pathol*. 2011;178:1578-90.
110. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111:649-58.

111. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res*. 2004;95:884-91.
112. Chaiworapongsa T. Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2005;17(1):3-18.
113. Dröge L, Herraiz I, Zeisler H, Schlembach D, Stepan H, Küssel L, *et al*. Maternal serum sFlt-1/PIGF ratio in twin pregnancies with and without pre-eclampsia in comparison with singleton pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Mar;45(3):286-93.
114. Bdolah Y, Lam C, Rajakumar A, Shivalingappa V, Mutter W, Sachs BP, *et al*. Twin pregnancy and the risk of preeclampsia: bigger placenta or relative ischemia? *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:428.e421-6.
115. Sánchez O, Llurba E, Marsal G, Domínguez C, Aulesa C, Sánchez-Durán MA, *et al*. First trimester serum angiogenic/anti-angiogenic status in twin pregnancies: relationship with assisted reproduction technology. *Hum Reprod*. 2012;27:358-65.
116. Cowans NJ, Spencer K. First trimester maternal serum placental growth factor levels in twin pregnancies. *Prenat Diagn*. 2013;33(13):1260-3.
117. Alexander GR, Michael K, Martin J, Papiernick E. What are fetal growth patterns of singletons, twins and triples in United States? *Clin Obstet Gynecol*. 1998;41:115-25.
118. Sibai BM, Ewell M, Levine RJ. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. *Am J Obstet Gynaecol*. 1997;172:1003-10.
119. Campbell DM, Mac Gillivray I. Preeclampsia in twin pregnancies. incidence and outcome. *Hypertens Pregnancy*. 1999;18:197-207.
120. Savvidou Md, Karanastasi E, Skentou C, Geerts L, Nicolaides KH. Twin chorionicity and pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001;18:228-31.
121. Laura S, Giuseppe MM, Vera D, Saccone G, Pasquale M. Risk of preeclampsia: comparison between dichorionic and monochorionic twin pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 Jul;27(10):1080-1.
122. Sparks TN, Cheng YW, Phan N, Caughey AB. Does risk of preeclampsia differ by twin chorionicity? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26(13):1273-7.
123. Wilson MJ. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(9):4778-83.

124. Xiong S, Skarkey AM, Kennedy PR, Gardner L, Farrell LE, Chazara O, *et al.* Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J Clin Invest.* 2013 Oct 1;123(10):4264-72.
125. Hromadnikova I, Li S, Kotlabova K, Dickinson AM. Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp 70 derived 14-mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors on peripheral blood T cells, B cells and NKT cells. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151535.
126. Bachmayer N, Sohlberg E, Sundstrom Y, Hamad RR, Berg L, Bremme K, *et al.* Women with pre-eclampsia have an altered NKG2A and NKG2C receptor expression on peripheral blood Natural Killer cells. *Am J Reprod Immunol.* 2009;62:147-57.
127. Szarka A, Rigo J, Lazar L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 2010;11:59.
128. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:550-5.
129. Conrad KP, Miles TM, Benyo DF. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1998;40:102-11.
130. Vacca P, Cantoni C, Prato C, Fulcheri E, Moretta A, Moretta L, *et al.* Regulatory role of NKp44, NKp46, Dnam-1 and NKG2D receptors in the interaction between NK cells and trophoblast cells. Evidence for divergent functional profiles of decidual versus peripheral NK cells. *Int Immunol.* 2008;20:1395-405.