



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



Polimorfismo dos genes *TLRs* 7 e 9 e a sua associação com presença de patógenos virais e complicações na gestação em uma população do extremo sul do Brasil

Karen Sánchez
Rio Grande, Fevereiro de 2019.



Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



Polimorfismo dos genes *TLRs* 7 e 9 e a sua associação com presença de patógenos virais e complicações na gestação em uma população do extremo sul do Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanusa Da Hora
Co-orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Rio Grande, Fevereiro de 2019.

Karen Y. Sánchez Luquez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Polimorfismo dos genes *TLRs 7 e 9* e a sua associação com presença de patógenos virais e complicações na gestação em uma população do extremo sul do Brasil

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Andrea Von Groll – FURG
Prof. Dr. Carlos Barros – UFPel
Prof(a). Dr(a). Ana María Barral Martínez – FURG
Prof. Dr. Carlos Scaini (Suplente) – FURG

Profª. Dra. Vanusa Pousada da Hora.

Agradecimentos

Aos meus orientadores Professora Dra . Vanusa Pousada da Hora e Professor Dr. Jose Arthur Chies, pelo apoio, incentivo, amizade e pelo carinho com que me receberam e me orientaram na realização desta pesquisa.

À Universidade Federal do Rio Grande, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e especialmente ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular pela acolhida no desenvolvimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas participantes do estudo.

A todos aqueles que contribuíram para tornar minhas metas no mestrado possíveis, minha família, os professores e minhas colegas, muito obrigada!



Programa de
Pós-Graduação
em Ciências da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA 04/2019

A banca examinadora, designada pela PORTARIA nº 451/2019, de dezenove de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, em sessão presidida e registrada pelo (a) orientador (a), Profa. Dra. Vanusa Pousada da Hora reuniu-se no dia vinte e cinco de fevereiro do ano de dois mil e dezenove, às 9h30min, na sala 214 da Faculdade de Medicina, para avaliar a Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada: "**Polimorfismo dos genes TLRs 7 e 9 e a sua associação com presença de patógenos virais e complicações na gestação em uma população do extremo sul do Brasil**", do (a) mestrando (a) **Karen Yumaira Sánchez Luquez**. Para o início dos trabalhos, o (a) Senhor (a) Presidente procedeu à abertura oficial da sessão, com a apresentação dos membros da banca examinadora. A seguir, prestou esclarecimentos sobre a dinâmica de funcionamento da sessão, concedendo o tempo de até 30 (trinta) minutos para a apresentação da dissertação pelo mestrando, que iniciou às 9 horas e 30 minutos e terminou às 10 horas e 0 minutos. Após a apresentação, passou a palavra aos membros da banca examinadora, para que procedessem à arguição e apresentassem suas críticas e sugestões. Ao término dessa etapa de avaliação, de acordo com os membros da banca examinadora, a dissertação de mestrado avaliada foi Aprovada (aprovado - reprovado).

Rio Grande, 25 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Vanusa Pousada da Hora - (Orientadora - FURG)

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros - (Externo - UFPEL)

Profa. Dra. Andrea Von Groll - (Titular- FURG)

Profa. Dra. Ana Maria Barral de Martinez - (Titular- FURG)

Prof. Dr. Carlos James Scaini - (Suplente - FURG)

Ciente: Karen Yumaira Sánchez Luquez
Mestrando (a) **Karen Yumaira Sánchez Luquez**

Sumário

Resumo.....	7
<i>Abstract</i>	8
Lista de abreviaturas e siglas.....	11
1. Introdução.....	13
1.1 Papel dos TLRs na gravidez.....	16
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. Métodos.....	22
4.1. Delineamento do estudo.....	22
4.2. Amostras.....	22
4.3. Detecção dos patógenos.....	26
4.3.1. Serológica.....	26
4.3.2 Molecular.....	26
4.4 Análise dos polimorfismos dos genes <i>TLRs</i>	27
4.4.1. Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RLFP).....	27
4.4.2. PCR de alelos específicos bidirecionais (Bi-PASA)- <i>TLR9</i>	28
.....	28
4.5. Análise dos resultados.....	31
5. Referências.....	31
6. Artigo pronto para publicação.....	38
7. Conclusões.....	39
8. Apêndice 1: Instrumento para coleta de dados.....	41
9. Apêndice 2: padronização do polimorfismo do gene <i>TLR7</i>	43
.....	43
10. Apêndice 3: padronização do polimorfismo do gene <i>TLR9</i>	44
11. Apêndice 4: código R de um arquivo “.Rmd”.....	46

Resumo

Receptores Toll-like (TLRs) são reguladores da imunidade inata que podem ser ativados após o reconhecimento de ligantes em várias classes de patógenos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses receptores estão envolvidos em várias funções imunológicas, como a proteção do trato reprodutivo feminino contra patógenos invasores e desempenham um papel importante durante os diferentes estágios da gravidez, incluindo a implantação e o trabalho de parto. Esta pesquisa foi conduzida para avaliar a frequência dos polimorfismos rs179008 em *TLR7* e rs5743836 em *TLR9* e sua associação com complicações na gravidez na presença de patógenos infecciosos ou não. Foram incluídas no estudo 455 gestantes, cujos históricos clínicos foram revisados para obter informações ginecológicas e clínicas. O DNA genômico humano foi extraído a partir de tecido da placenta de gestantes atendidas no Hospital da Universidade Federal do Rio Grande. Os genótipos dos SNPs *TLR7* e *TLR9* foram estimados por polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e por amplificação por PCR de alelos específicos bidirecionais (Bi-PASA), respectivamente. Os desfechos adversos com maior ocorrência foram condição hipertensiva (21,24%), histórico de hospitalização pelo menos uma vez (35,5%) e condição de infecção (45,71%). As frequências genotípicas para *TLR7* foram AA 63,45%, AT 20,30% e TT 7,87% e para *TLR9* TT 63,78%, TC 34,69% e CC 1,53%, na população total estudada. A presença do genótipo TT no SNP do gene *TLR7* duplica a suscetibilidade à infecção por HVS1 (OR = 2, p = 0,05). No caso do *TLR9*, o genótipo TC, confere proteção para sofrer infecção (OR = 0,62, p = 0,05) e favorece a chance de ter um parto normal (OR = 1,75, p = 0,02). A combinação genotípica CT / AA reduz significativamente o risco de hospitalização (OR = 0,4, p = 0,00). Este estudo permitiu determinar a ocorrência das principais alterações durante a gestação em presença de infecção ou não, além de avaliar e confirmar com significância estatística a participação dos SNPs estudados dos receptores *TLR7* e 9 na fisiopatologia de alguns distúrbios, o que permitiu uma contribuição para o conhecimento do desempenho de receptores imunes no processo gestacional.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil.

Palavras-chave: Toll, PAMP, gravidez, infecções sexualmente transmissíveis.

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are regulators of innate immunity that can be activated after recognition of bacterial and viral ligands known as molecular patterns associated with the pathogen (PAMPs). These receptors are involved in various immune functions, such as the protection of the female reproductive tract against invading pathogens and play an important role during the different stages of pregnancy, including implantation and labor. This study was conducted to evaluate the frequency of rs179008 polymorphisms in *TLR7* and rs5743836 in *TLR9* and its association with complications in pregnancy in the presence of infectious or non-pathogenic pathogens. The study included 455 pregnant women whose clinical records were reviewed for gynecological and clinical information. Human genomic DNA was extracted from the placenta tissue of pregnant women attended at the Hospital of the Federal University of Rio Grande. *TLR7* and *TLR9* SNPs genotypes were estimated by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and PCR amplification of bidirectional specific alleles (Bi-PASA), respectively. The most frequent adverse events were hypertensive condition (21.24%), hospitalization history at least once (35.5%) and infection condition (45.71%). The genotype frequencies for *TLR7* were 63.45%, AT 20.30% and TT 7.87%, and for *TLR9* TT 63.78%, TC 34.69% and CC 1.53%, in the total population studied. The presence of the TT genotype in the SNP of the *TLR7* gene doubles the susceptibility to HVS1 infection (OR = 2, $p = 0.05$). In the case of *TLR9*, the TC genotype confers protection to infection (OR = 0.62, $p = 0.05$) and takes advantage of the chance of having a normal delivery (OR = 1.75, $p = 0.02$). The CT / AA genotypic combination significantly reduces the risk of hospitalization (OR = 0.4, $p = 0.00$). This study allowed to determine the occurrence of the main changes during pregnancy in the presence of infection or not, besides to evaluate and to confirm with statistical significance the participation of the studied SNPs of *TLR7* and 9 receptors in the pathophysiology of some disorders, which allowed a contribution to the knowledge of the performance of immune receptors in the gestational process.

Financial Support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil.

Keywords: Toll, PAMP, complications of pregnancy, sexually transmitted infections.

Lista de tabelas

Tabela 1. Seleção dos SNPs em genes <i>Toll 7</i> e <i>9</i> associados com um maior número de diferentes patologias.....	15
Tabela 2. Tabela descritiva de variáveis numéricas.....	23
Tabela 3. Tabela descritiva de variáveis categóricas.....	23

Lista de figuras

- Figura 1.** Funções fisiológicas de receptores Toll-like. TLRs estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares microbianos de acordo com a sua localização celular, tanto extracelular ou intracelular.....14
- Figura 2.** Esquema do padrão de corte do PCR-RFLP para o polimorfismo Gln11Leu (rs179008) do gene *TLR7*. Pb, pares de bases.....27
- Figura 3.** Esquema de Bi-PASA. Os quatro primers (P, Q, A e B) são representados por setas. X representa a mudança de sequência em relação ao outro alelo. Linhas onduladas nos primers internos representam as sequências de cauda 5' não complementares.....29
- Figura 4.** Esquema do padrão de corte do PCR-BiPASA para o polimorfismo -1237T/C do gene *TLR9*. Pb, pares de bases.....30

Lista de abreviaturas e siglas

A: Adenina

AIG: Adequado para idade gestacional

AP-1: Ativação da proteína-1

ApoI: Enzima de restrição reconhece R ^ AATTY

Bi-PASA: Amplificação por PCR de alelos específicos bidirecionais

C: Citocina

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEPAS: Comitê de Ética em Pesquisa na Área de Saúde

CMV: Citomegalovírus

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

DF: Pé diabético

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico DNA

dNTP: Desoxinucleotídeos trifosfato

FAMED: Faculdade de Medicina

FURG: Universidade Federal do Rio Grande

G: Guanina

GH: Hipertensão gestacional

GIG: Gigante para idade gestacional

Gln: Glutamina

HAS: Hipertensão sistêmica

HCMV: Citomegalovirus Humano

HCV: Vírus da hepatite C

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HPV: Papilomavirus humano

HSV1: Vírus herpes simples tipo 1

HSV2: Vírus herpes simples tipo 2

HU: Hospital Universitário

IC: Intervalos de confiança

IST: Infecções sexualmente transmissíveis

ITU: Infecção do trato urinário

Leu: Leucina

MgCl₂: Cloreto de magnésio

NF-κβ: Fator de transcrição nuclear (NF) -Kappaβ

OMS: Organização Mundial da Saúde

ONU: Organização das Nações Unidas

OR: *Odds ratios*

PAMPs: Padrões moleculares associados ao patógeno

pb: pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PIG: Pequeno para idade gestacional

PRRs: Receptores de padrão de reconhecimento

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

rs: *Clustered RefSNPs*

RUPREME: Ruptura prematura de membrana

SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas

SNPs: polimorfismos de um único nucleotídeo

T: Timina

TLRs: Receptores Toll-like

TORCH: Acrônimo, são os seguintes: Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirus, e vírus

Herpes simples

TPP: Trabalho prematuro de parto

U: Unidades

UV: Ultra violeta

XapI: enzima de restrição reconhece R ^ AATTY

1 1. Introdução

2 A gravidez saudável é o resultado de um sistema finamente regulado e com importante
3 interligação entre as estruturas fetais e maternas. A implantação é iniciada quando as células
4 do trofoblasto invadem o revestimento epitelial da superfície da decídua para fixar e invadir,
5 levando a indução da tolerância materna, à formação da placenta, geração de citocinas pró-
6 inflamatórias, rápidas mudanças hormonais e a atividade de células imunológicas, as quais
7 são fundamentais para a ativação do útero e o início do trabalho de parto (KELLY; KING;
8 CRITCHLEY, 2001).

9

10 O sucesso de uma gravidez depende do equilíbrio coordenado entre o trofoblasto
11 invasor e uma decídua materna receptiva (MOR, 2008). Além das células deciduais e das
12 células endoteliais, as células imunes infiltrantes representam um importante componente
13 celular da decídua materna (MOR, 2008).

14

15 A gravidez começa em um ambiente pró-inflamatório que permite a implantação e a
16 placentação, depois muda para um estágio anti-inflamatório que permite o crescimento fetal, e
17 finalmente retorna a um estágio pró-inflamatório que promove o trabalho de parto e o parto,
18 nesses estágios destacam-se as interações que ocorrem entre as células trofoblásticas e o
19 sistema imunológico materno (MOR, 2008).

20

21 A imunidade inata compreende células e receptores que fornecem a primeira linha de
22 defesa contra microrganismos invasores (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Os agentes
23 patogênicos são reconhecidos por meio de receptores de padrão de reconhecimento (PRRs)
24 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Eles são capazes de reconhecer os diferentes
25 componentes microbianos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos
26 (PAMPs) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

27

28 Um dos principais subgrupos de PRRs são os Toll like receptors (TLRs) (AKIRA;
29 UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Os TLRs são expressos em diferentes células, eles não só

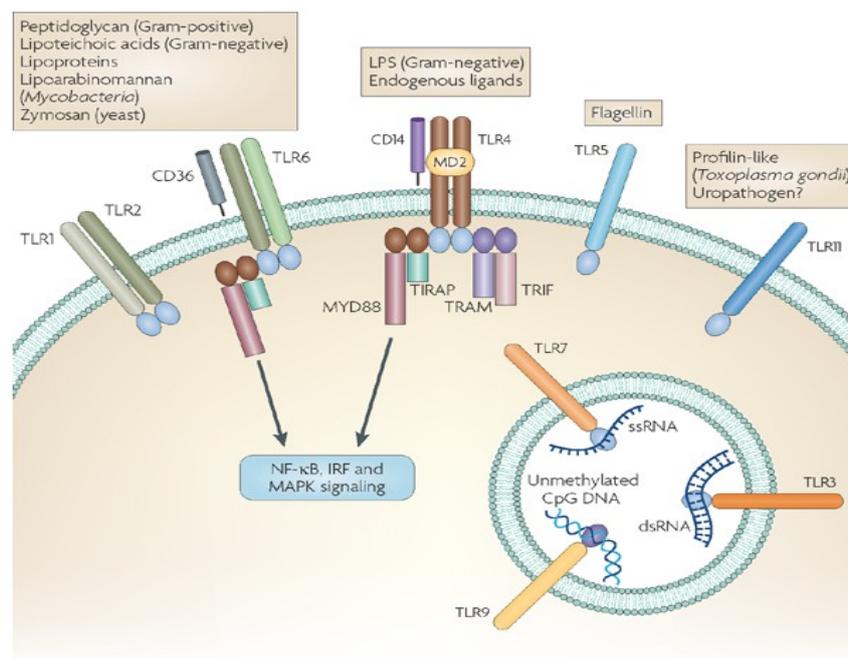
1 são expressos em células do sistema imunológico, mas também em células não imunes,
2 incluindo fibroblastos e células epiteliais(AKIRA; TAKEDA, 2004).

3

4 A expressão dos Toll like receptors no trofoblasto difere de acordo com a fase
5 diferencial do trofoblasto e a idade gestacional (MOR, 2008). Portanto, alguns agentes
6 infecciosos podem romper o ambiente imunológico receptivo criado na interface materno-
7 fetal e levar a complicações na gravidez, como corioamnionite e parto prematuro (ILIEVSKI;
8 HIRSCH, 2010; SCHARFE-NUGENT et al., 2012).

9

10 Os treze TLRs existentes, são classificados de acordo com a sua localização celular e
11 os respectivos ligantes PAMP (figura 1) (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2009). Os
12 ligantes que são reconhecidos pelos TLRs 7 e 9, são RNA de cadeia simples e DNA CpG não
13 metilado (KOGA et al., 2014). Os PRRs também respondem a moléculas endógenas liberadas
14 de células mortas do hospedeiro após estresse celular ou lesões do tecido, conhecidas como
15 padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).



Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Funções fisiológicas de receptores Toll-like. TLRs estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares microbianos de acordo com a sua localização celular, tanto extracelular ou intracelular.

1 Após a ligação do receptor ao ligante, as cascatas intracelulares são ativadas. Todos os
2 TLR induzem vias inflamatórias conservadas, culminando na ativação do fator de transcrição
3 nuclear (NF) -Kappa β (NF- κ B) e na ativação da proteína-1 (AP-1) (KARIN; GRETEN, 2005).

4
5 Esta via de ativação resulta principalmente na produção de citocinas e quimiocinas
6 inflamatórias, na indução de resposta antiviral e maturação de células dendríticas (KAWAI;
7 AKIRA, 2006). Diferentes aspectos da sinalização dos TLRs têm sido utilizados como
8 estratégia terapêutica, como por exemplo, para acelerar e aumentar a indução de respostas a
9 vacinas específicas e também vinculando os TLRs como alvos de agentes inibidores
10 biológicos ou moléculas pequenas para o tratamento de doenças (DOWLING; MANSELL,
11 2016; MAHEASWARI; SIVASANKAR; SUBBARAYAN, 2014).

12
13 Os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes *TLR* podem deslocar o
14 equilíbrio entre as citocinas pró- e anti-inflamatórias, modulando o risco de infecção e
15 inflamação crônica. Estudos sugerem que variações genéticas nesses genes estão associadas
16 com susceptibilidade alterada a doenças infecciosas, inflamatórias e alérgicas, e foram
17 encontrados para desempenhar um papel na tumorigênese (MEDVEDEV, 2013), como se
18 pode ver na tabela 1. No entanto, poucas pesquisas têm analisado potenciais associações dos
19 polimorfismos com distúrbios na gravidez.

Tabela 1. Seleção dos SNPs em genes *Toll 7 e 9* associados com um maior número de diferentes patologias.

<i>TLRs</i>	Polimorfismo	Associação
7	Gln11Leu (rs179008) A32C	- Superior carga viral e evolução rápida para a supressão imunológica em pacientes com HIV (OH et al., 2009). - Infecção por vírus da hepatite C crônica (HCV) induzida por agregados linfóides portal (ASKAR; RAMADORI; MIHM, 2010). - Aumento do risco de lúpus eritematoso sistêmico no sexo feminino (DOS SANTOS et al., 2012). - O polimorfismo foi significativamente menor proporção nos pacientes com sarcoidose comparado com indivíduos controle (BORDIGNON et al., 2013).
9	-1237 T>C (rs5743836)	- O polimorfismo do gene T / C pode ser considerado como um risco molecular para o pé diabético (DF) entre pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (WIFI et al., 2017). - Aspergilose broncopulmonar alérgica (CARVALHO et al., 2008) - Falta de papel mediador na história natural da infecção por HPV (OLIVEIRA et al., 2013).

21

1 **1.1 Papel dos TLRs na gravidez**

2 Estudos têm avaliado a presença e a função dos TLRs ou moléculas a eles relacionadas
3 no trofoblasto e tecido placentário. A expressão dos TLRs no trofoblasto difere de acordo com
4 a fase diferencial do trofoblasto e a idade gestacional (MOR, 2008). A ativação de TLRs no
5 trofoblasto influencia o recrutamento de células imunes, a secreção de citocinas e a resposta
6 decidual a patógenos invasores durante a gravidez (RILEY; NELSON, 2010).

7
8 Cerca de 90% de nascimentos prematuros podem ser correlacionados com a presença
9 de agentes infecciosos (GOLDENBERG et al., 2008) e indução de respostas inflamatórias
10 (GOLDENBERG; HAUTH; ANDREWS, 2000a). A presença de agentes infecciosos na
11 interface materno-fetal é principalmente devido a infecções sexualmente transmissíveis (IST),
12 mas também pode-se associar com infecções crônicas maternas. Os microrganismos podem
13 ter acesso à cavidade amniótica e ao feto através de dois caminhos: 1) por ascensão pela
14 vagina e colo do útero; e 2) por disseminação hematogênica através da placenta (infecção
15 transplacentária); ambos casos têm sido associados com resultados adversos da gravidez e
16 também com prejuízos ao feto e ao neonato (AAGAARD et al., 2014; GONÇALVES;
17 CHAIWORAPONGSA; ROMERO, 2002).

18
19 As infecções virais causadas por vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C
20 (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), papilomavírus humano (HPV) e vírus
21 herpes simples (HSV) são complicações comuns da gravidez, algumas das quais têm
22 consequências bastante significativas como transmissão vertical, que pode afetar a
23 longevidade e a qualidade de vida da criança (HUNTINGTON; SHAFER, 2016). Uma reação
24 em cadeia da polimerase (PCR) positiva em líquido amniótico para ácidos nucleicos de
25 Citomegalovírus humano (CMV) ou vírus herpes simples, está associada a uma taxa
26 aumentada de malformações estruturais fetais, restrição de crescimento intra-uterino e outras
27 anormalidades fetais (REDDY et al., 2005) e com a perda gestacional espontânea (BUJKO et
28 al., 1988; GOLDENBERG; HAUTH; ANDREWS, 2000b; GRIFFITHS; BABOONIAN,
29 1984; ROBB et al., 1986; WENSTROM et al., 1998). Os TLRs intracelulares TLR3, TLR7/8
30 e TLR9 são associados com vários vírus que mostram correlação com resultados adversos da
31 gravidez como desordens hipertensivas e parto pré termo (THAXTON; NEVERS; SHARMA,

1 2010). Com o conhecimento do parto como um processo mediado pela inflamação, pode-se
2 começar a entender que insultos patogênicos podem acionar a imunidade uterina não
3 programada, evidências em modelos animais demonstram que as vias de TLRs ativadas
4 devido a entrada patogênica, podem determinar a cascata imunológica de atividade celular e
5 de citocinas aberrantes que levam ao nascimento prematuro (ABRAHAMS et al., 2008;
6 ILIEVSKI; LU; HIRSCH, 2007; MURPHY et al., 2005, 2009; THAXTON; ROMERO;
7 SHARMA, 2009). A maioria dessas vias geralmente leva ao aumento da atividade do NF-κB
8 que permite a produção de citocinas e mediação dos níveis de progesterona (THAXTON;
9 NEVERS; SHARMA, 2010). Evidências sugerem também que a entrada viral em células
10 trofoblásticas induz a apoptose de trofoblasto e os eventos inflamatórios resultantes podem
11 levar ao nascimento prematuro (KOI; ZHANG; PARRY, 2001).

12
13 Por outro lado independentemente da presença de patógenos, os TLRs podem
14 influenciar negativamente o sucesso da gravidez. O aumento do nível de citocinas pró-
15 inflamatórias no líquido amniótico é uma marca característica do trabalho de parto a termo
16 (COX; CASEY; MACDONALD, 1997). Além disso, tem sido sugerido que complicações da
17 gravidez associadas com disfunção de placenta, tal como trabalho de parto prematuro, podem
18 ser um resultado da ativação de TLR (RILEY; NELSON, 2010), talvez relacionada com a sua
19 capacidade de induzir apoptose numa ampla variedade de células (SALAUN; ROMERO;
20 LEBECQUE, 2007). A apoptose placentária não só é associada à inflamação induzida pela
21 infecção, mas também à pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intra-uterino, parto pré-termo
22 (ISHIHARA et al., 2002) e à hipertensão gestacional (GH), definida como pressão arterial
23 (PA) sistólica de pelo menos 140 mm Hg e / ou PA diastólica de pelo menos 90 mm Hg em,
24 pelo menos, duas ocasiões, após a 20^a semana de gestação (PERAÇOLI; RUDGE;
25 PERAÇOLI, 2007). Scharfe-Nugent e colaboradores, demonstraram que o DNA fetal livre na
26 circulação materna pode ativar TLR9 e sugeriu que o DNA fetal também pode funcionar
27 como um "perigo sinal" para iniciar um processo inflamatório e causar trabalho de parto
28 prematuro ou pré-eclâmpsia (SCHARFE-NUGENT et al., 2012). Esses achados implicam que
29 o nível de expressão/função de TLRs na placenta é controlada por patógeno per se e / ou
30 moléculas endógenas capazes de induzir inflamação, nesse cenário, é consideramos que os

- 1 TLRs estejam envolvidos como moléculas reguladoras em certos processos inflamatórios com
- 2 efeitos determinantes na gravidez.

1 2. Justificativa

2 Estudos têm mostrado que distúrbios na gravidez, relacionados ou não com condições
3 infecciosas, são mediados pela participação dos receptores Toll. Dessa forma, avaliar, do
4 ponto de vista genético, a predisposição a doenças associadas a estes receptores é importante.
5 Alguns aspectos do papel dos TLRs na gestação ainda necessitam de mais estudos, como por
6 exemplo: 1) a modulação e balanço dos sinais de inflamação necessários para a gravidez
7 normal; 2) o reconhecimento dos padrões de lesão celular e colaboração nos processos tais
8 como isquemia (hipóxia) e reperfusão (reoxigenação) da placenta; e, 3) a interação com
9 patógenos, aumentando a susceptibilidade frente a estes ou a sua mediação em alterações do
10 curso da gravidez. Sabe-se que mais estudos sobre a prevalência de IST e sua associação com
11 distúrbios de gravidez na população brasileira são necessários (KARODY et al., 2015;
12 KREDIET et al., 2007; LORENZ et al., 2002; REY et al., 2008). A elucidação desses aspectos
13 pode fornecer conhecimento para que estratégias terapêuticas sejam implementadas.

14
15 Baseado em um estudo transversal, após procurar informações nos históricos de 455
16 parturientes atendidas no Centro Obstétrico do Hospital da Universidade Federal do Rio
17 Grande, identificou-se que as intercorrências mais frequentes na população do estudo foram:
18 presença de infecções virais, doença hipertensiva e necessidade de hospitalização pelo menos
19 uma vez durante o período gestacional. Com base nessas informações, quer se investigar a
20 possível associação entre genótipos dos genes *TLR7* e *9* utilizando a abordagem molecular,
21 com fatores maternos e ambientais em mulheres brasileiras com intercorrências na gravidez.
22 Foi testada a hipótese de que os polimorfismos dentro desses genes são um importante fator de
23 risco para complicações nas gestantes, incidindo talvez na susceptibilidade/resistência a
24 infecções gerando maior risco no desenvolvimento de distúrbios de gravidez.

25
26 Este é um estudo pioneiro no Brasil, que permitirá uma avaliação de dois diferentes
27 genes *TLRs* como um estudo pareado e integrado em um projeto em execução sobre a
28 prevalência de IST em parturientes e seus neonatos, o que dá ampla abrangência e
29 importância a essa pesquisa. A partir dos resultados obtidos neste estudo com mulheres,
30 poderá se estudar os polimorfismos dos receptores Toll-like em recém-nascidos dessa forma,

1 será também possível avaliar o efeito que os polimorfismos têm em termos de alteração da
2 susceptibilidade para adquirir infecções verticais por agentes de infecções virais sexualmente
3 transmissíveis.

4

5 A análise de polimorfismos genéticos permite identificar genes que conferem
6 suscetibilidade às doenças presentes. São utilizados estudos de associação, nos quais se
7 compara a frequência relativa das diferentes variantes, aquelas cuja função pode estar
8 relacionada à doença de interesse, uma série de polimorfismos entre os indivíduos afetados e
9 um grupo controle adequado (INIESTA; GUINÓ; MORENO, 2005), na busca por marcadores
10 genéticos que podem ajudar no prognóstico da condição de saúde e no seu potencial uso como
11 alvo terapêutico.

12

13 Inibidores de molécula pequena (*SMIs*) de *TLR7/8/9* também estão sob investigação
14 em doenças associadas inflamação aguda ou crônica descontrolada (GAO et al., 2017). Por
15 exemplo, a droga antimalárica, a cloroquina (CQ) mostrou seu potencial clínico no tratamento
16 de sepse grave, especialmente na redução do risco de indução de sepse (YASUDA et al.,
17 2008).

18

19 Ainda há uma alta taxa de mulheres que morrem por resultado de complicações na
20 gestação e no parto (WHO et al., 2015) e as principais causas obstétricas de mortalidade
21 materna são hemorragia, doenças hipertensivas da gravidez e sepse materna
22 (GÜLMEZOGLU et al., 2016), todas estas situações onde os TLRs podem estar envolvidos.
23 Assim, o objetivo desse estudo estaria enquadrado no âmbito dos objetivos estratégicos gerais
24 estipulados pela OMS, onde se pretende diminuir e erradicar a mortalidade materna evitável
25 através da abordagem de todas as causas de mortalidade e morbidade materna e reprodutiva,
26 assim como avaliar e dar soluções a deficiências relacionadas ao acesso universal à saúde
27 reprodutiva, melhorando a saúde materna (WHO et al., 2015). Além disso, estes interesses
28 foram retomadas dentro das metas que correspondem ao objetivo três: garantir um estilo de
29 vida saudável e promover o bem-estar para todos em todas as idades, incluídos dentro dos 17
30 objetivos estabelecidos pela ONU para alcançar o desenvolvimento sustentável (ONU, 2016).

1 **3. Objetivos**

2

3 **3.1 Objetivo geral**

4 Avaliar os polimorfismos dos genes *TLR7* (rs179008) e *9* (rs5743836) em gestantes a
5 sua associação com presença de agentes infecciosos e complicações na gestação em uma
6 população do extremo sul do Brasil

7

8 **3.2 Objetivos específicos**

- 9 • Detectar a presença e frequência dos polimorfismos dos genes *TLR7* e *9* na população
10 estudada.
- 11 • Determinar a prevalência de alguns distúrbios da gravidez (pré-eclampsia, restrição de
12 crescimento intra-uterino, parto pré-termo e na hipertensão gestacional) e as infecções
13 causadas pelos virus HBV, HCV, HIV, HCMV, HSV-1 e HSV-2, e outras IST, de
14 puérperas atendidas em um Hospital Universitário no extremo sul do Brasil.
- 15 • Avaliar a possível associação dos SNPs dos genes *TLR7* e *9* na população estudada
16 com susceptibilidade a infecções sexualmente transmissíveis.
- 17 • Avaliar a possível associação dos SNPs dos genes *TLR7* e *9* na população estudada
18 com alguma intercorrência clínica gestacional.

1 **4. Métodos**

2 **4.1. Delineamento do estudo**

3 Estudo transversal analítico observacional. Estudos analíticos objetivam descrever
4 distribuição de variáveis e examinar a existência de associação entre uma exposição e uma
5 doença ou condição relacionada à saúde (LIMA-COSTA; BARRETO, 2003).

6

7 **4.2. Amostras**

8 As amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas do banco de placentas mantidas a
9 -80°C no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da FURG. As amostras
10 consistem de biópsias de placentas da face materna coletadas de voluntárias atendidas no
11 Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. da Universidade Federal do Rio Grande
12 (HU/FURG) entre 2012 a 2016. As mulheres que aceitaram participar do estudo assinaram
13 termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um questionário
14 sociodemográfico, O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Área de
15 Saúde (CEPAS) – FURG, de acordo com o parecer nº54/ 2011.

16

17 Após da triagens de patógenos virais nessas amostras,(etapa desenvolvida por outros
18 projetos do grupo), 455 amostras foram selecionadas para a extração do DNA, que foi
19 realizada a partir do kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit. O DNA da biópsia da
20 placenta foi extraído segundo protocolo do fabricante com modificação previamente descrita
21 na literatura (TEIXEIRA et al., 2015). O DNA proveniente das extrações foi armazenado a
22 -20°C.

23

24 A fim de obter informações sobre a paciente, informações sócio-demográficas foram
25 obtidas no banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular FAMED-FURG e
26 informações de importância clínica e epidemiológicas, foram consultadas nos históricos das
27 pacientes segundo variáveis descritas nas tabelas 2 e 3 (Apêndice 1). Mulheres sem
28 informações do pré-natal, foram excluídas do estudo.

29

30

Tabela 2. Tabela descritiva de variáveis numéricas

Variável numérica	
Variável	Descrição
Anos de estudo	Variável numérica referente ao número de anos de estudo completos
Somatória renda	Variável numérica referente ao ingresso mensal da paciente
Idade do primeiro relacionamento sexual	Variável numérica referente a idade do primeiro relacionamento sexual da paciente
Abortos	Variável numérica referente ao número de abortos auto referidos na entrevista médica
cm: centímetros	Variável numérica referente ao comprimento do bebê ao nascer
Idade gestacional	Variável numérica referente ao número de semanas e dias de gestação
g: gramas	Variável numérica referente ao peso em gramas do bebê ao nascer

1

Tabela 3. Tabela descritiva de variáveis categóricas

Variável categórica	
Variável	Descrição
Nome da paciente	Nome de registro no Hospital Universitário FURG
Cor da pele	Etnia: 1 Branca 0 Não Branca
Idade da paciente	Idade em anos completos
Estado civil	1: Com companheiro estável 0: Sem companheiro
Infecção pelo HSV-1	Resultado molecular para hsv1: 1 positivo 0 negativo
Infecção pelo HSV-2	Resultado molecular para hsv2: 1 positivo 0 negativo
Infecção pelo HCMV	Resultado molecular para HCMV: 1 positivo 0 negativo
Infecção pelo Herpesviridae na Placenta	Resultado molecular para HSV1 e/o HSV2 e/o HCMV: 1 positivo 0 negativo
Condição de hipertensão	Registro no histórico, de ter tido uma doença hipertensiva durante a gravidez, definido como pressão arterial (PA) sistólica de pelo menos 140 mm Hg e / ou PA diastólica de pelo menos 90 mm Hg em, pelo menos, duas ocasiões, após a 20 ^a semana de

Variável categórica	
Variável	Descrição
	gestação: 1 Sim 0 Não
Hipertensão sistêmica (HAS) previa tratada (A)	Registro de ter tido HAS prévio à gravidez: 1 Sim 0 Não
Pico Hipertensivo do fim da gestação (B)	Registro no histórico de ter tido um pico hipertensivo do fim da gestação, definido como pressão arterial (PA) sistólica de pelo menos 140 mm Hg e / ou PA diastólica de pelo menos 90 mm Hg em, pelo menos, duas ocasiões, após a 20ª semana de gestação: 1 Sim 0 Não
Pre eclâmpsia (C)	Registro no histórico de ter tido um pico hipertensivo do fim da gestação, definido como pressão arterial (PA) sistólica de pelo menos 140 mm Hg e / ou PA diastólica de pelo menos 90 mm Hg em, pelo menos, duas ocasiões, após a 20ª semana de gestação mais proteinúria, definida como 300 mg ou mais por 24 horas: 1 Sim 0 Não
Internações	Registro no histórico de ter sido internada numa instituição de saúde durante a gravidez: 1 Sim 0 Não
Mot Int1 ITU	Registro de Motivo da internação, Infecção trato urinário ou Bacteriúria ou pielonefrite: 1 Sim 0 Não
Mot Int 2 DH	Registro de Motivo da internação, doença hipertensiva durante a gravidez: 1 Sim 0 Não
Mot Int 3 HAS prévia	Registro de Motivo da internação, doença hipertensiva durante a gravidez e ter tido HAS previa: 1 Sim 0 Não
Mot Int 4 Perda Líquido	Registro de Motivo da internação, perda de líquido: 1 Sim 0 Não
Mot Int5 Diabetes	Registro de Motivo da internação, diabetes gestacional: 1 Sim 0 Não
Mot Int 6 Bolsa rota	Registro de Motivo da internação, bolsa rota: 1 Sim 0 Não
Mot Int 7 OUTRA	Registro de Motivo da internação, por outra causa não considerada no estudo: 1 Sim 0 Não
Mot Int 8 RUPREME	Registro de Motivo da internação, ruptura prematura de membrana: 1 Sim 0 Não
Mot Int 9 RUPREME < 37S	Registro de Motivo da internação, ruptura prematura de membrana antes das 37 semanas de gestação: 1 Sim 0 Não

Variável categórica	
Variável	Descrição
Mot Int 10 TPP <37S	Registro de Motivo da internação, trabalho de parto antes das 37 semanas de gestação: 1 Sim 0 Não
PAG IG 10-90%	Classificação do peso do bebé ao nascer de acordo com a idade gestacional: P pequeno, A adequado e G gigante.
Pequeno para Idade gestacional	Classificação do peso do bebé ao nascer de acordo com a idade gestacional P pequeno: 1 Sim 0 não
Adequado para Idade gestacional	Classificação do peso do bebé ao nascer de acordo com a idade gestacional A adequado: 1 Sim 0 não
Gigante para Idade gestacional	Classificação do peso do bebé ao nascer de acordo com a idade gestacional G gigante: 1 Sim 0 não
Parto a termo	Registro da idade gestacional no momento do parto, maior ou igual a 37 semanas: 1 Sim 0 Não
Tipo de parto vaginal	Registro do procedimento do parto vaginal: 1 Sim 0 Não
Tipo de parto registrado	Registro do procedimento do parto: 1 vaginal 0 Cesariana com indicação médica 2 Cesariana a pedido
Cesariana pedido	Registro do procedimento do parto cesariana a pedido: 1 Sim 0 Não
Condição Infecto Herpes 1,2 ,3 +rotina	Registro de positividade em detecção de patógeno ao nível molecular ou de rotina serológica:1 Sim 0 Não
Teste de rotina	Registro de positividade em detecção de patógeno ao nível molecular ou de rotina serológica: 1 Sim 0 Não
Vírus da Hepatites C	Registro de positividade em detecção de vírus da Hepatites C na rotina serológica: 1 Sim 0 Não
Vírus da Imunodeficiência Humana	Registro de positividade em detecção de Vírus da Imunodeficiência Humana na rotina serológica: 1 Sim 0 Não
Laboratório de Pesquisa de Doenças Venéreas	Registro de positividade em detecção não treponemico, VDRL, que significa Venereal Disease Research Laboratory, é um exame de sangue que serve para diagnosticar a sífilis
Anticorpos anti Vírus da Hepatites B	Registro de positividade em detecção de anticorpos anti Vírus da Hepatites B na rotina serológica: 1 Sim 0 Não
Anticorpos anti Toxoplasma Gondi	Registro de positividade em detecção de anticorpos anti Toxoplasma Gondi na rotina serológica: 1 Sim

Variável categórica	
Variável	Descrição
	0Não
TLR 9 PCR-Bi PASA	Resultado molecular do genótipo para TLR9
TLR 7 PCR-RFLP	Resultado molecular do genótipo para TLR7 rs179008

1

2

3 **4.3. Detecção dos patógenos**

4 **4.3.1. Serológica**

5 As informações referentes ao resultado da testagem de rotina pré-natal ou ante-natal
6 para HBV, HCV, e HIV, assim como de Sífilis e Toxoplasma, foram obtidos através dos
7 históricos das pacientes no SAME-HU-FURG.

8

9 Os testes para HBV, HCV, e HIV, assim como de Sífilis são feitos de maneira
10 rotineira, mediante testes rápidos, cada vez que a mulher é ingressa no HU, mesmo contando
11 com os resultados reportados na carteirinha de pré-natal. Para efeitos deste trabalho, foi
12 considerado o resultado do último teste realizado, mesmo no momento prévio ao parto natural
13 ou cesariana.

14

15 **4.3.2 Molecular**

16 O estudo de prevalência de agentes de ISTs faz parte de um projeto em andamento no
17 laboratório de Biologia Molecular da FAMED/FURG. As triagens para os agentes virais HSV-
18 1 e 2 e HCMV das amostras selecionadas para este estudo foram realizadas conforme descrito
19 previamente. A detecção de HSV-1 e 2, foram feitos com ensaios adaptados do protocolo de
20 Aurelius et al. (1991) e Schmutzhard et al. (2004). A detecção do HCMV foi realizada de
21 acordo com o protocolo previaente descrito por Kumazaki et al (2002) (AURELIUS et al.,
22 1991; KUMAZAKI et al., 2004; SCHMUTZHARD et al., 2004).

23

24 A importância da detecção desses patógenos especificamente na placenta, é que eles
25 formam parte do conhecido grupo de doenças infecciosas capazes de causar doença em

1 gestantes e malformações congênitas no feto (TORCH é o acrônimo, são os seguintes:
2 Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirus, e vírus Herpes simples), que neste momento no
3 Brasil não estão incluídos dentro das rotinas durante o pré-natal.

4

5 4.4 Análise dos polimorfismos dos genes *TLRs*

6

7 4.4.1. Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RLFP)

8 Nesta técnica utilizam-se enzimas de restrição que cortam o DNA em pontos
9 específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em
10 forma de bandas (figura 1). A separação é feita por eletroforese.

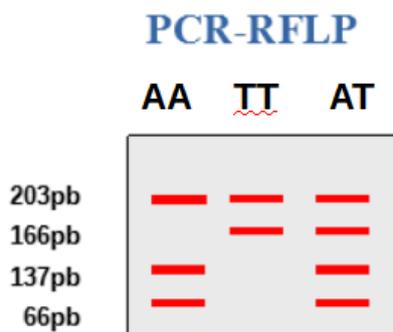


Figura 2. Esquema do padrão de corte do PCR-RFLP para o polimorfismo Gln11Leu (rs179008) do gene *TLR7*. Pb, pares de bases.

12

13 A análise do polimorfismo Gln11Leu (rs179008) do gene *TLR7* foi realizada por
14 Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RLFP), usando os seguintes
15 iniciadores: F 5-TAACAAACGAATAGGAAAATGC-3 e R 5-
16 GTTTTAGGAAACCATCTAGCC-3. A enzima de restrição utilizada para a detecção do
17 polimorfismo foi a *XapI*, o Isosquizômeros da *ApoI*, cujo local de reconhecimento para o
18 corte é R ^ AATTY. (DOS SANTOS et al., 2012).

19

20 A reação em cadeia da polimerase (PCR) será composta por tampão de PCR 1x, 1,5
21 mmol de MgCl₂, 0,25 mmol de mistura de dNTP, 0,25 pmol de cada um dos iniciadores, 1U

1 Taq DNA Polimerase Platinum (QIAGEN Diagnostics GmbH, Hamburgo, Alemanha) e 50-
2 100 ng de DNA genômico em um volume total de reação de 25 µL.

3
4 As condições de PCR foram como segue: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos,
5 desnaturação intermediária a 95° por 30 segundos, anelamento a 52,7° por 30 segundos,
6 extensão intermediária a 72° por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos, em um
7 total de 35 ciclos e resfriamento até 10 °C em Termociclador Mastercycler Nexus Gradient
8 (Eppendorf).

9
10 As condições de digestão, foram as seguintes: alíquotas de 7 µL do produto da PCR
11 foram coletadas e digeridas com 1 U de enzima de restrição *XapI* em 25 µL de volume de
12 reação de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Scientific™).

13
14 A eficiência da PCR e a análise do tamanho do fragmento após a digestão foram
15 realizadas por eletroforese em gel de agarose 2%, visualizados Diamond (Diamond™ Nucleic
16 Acid Dye - Promega) e por luz UV em sistema de fotodocumentação EDAS Kodak.

17 18 **4.4.2. PCR de alelos específicos bidirecionais (Bi-PASA)- *TLR9***

19
20 Amplificação por PCR de alelos específicos bidirecional (Bi-PASA) foi desenvolvida
21 para distinguir entre homozigotos e heterozigotos em uma reação de PCR (figura 3) (LIU et
22 al., 1997). Na Bi-PASA, um dos alelos é amplificado por uma reação da PCR de alelos
23 específicos em uma direção, enquanto o segundo alelo é amplificado por uma reação da PCR
24 de alelos específicos na direção oposta. São necessários dois iniciadores específicos externos
25 (P e Q) e dois específicos do alelo interno (M e W). Nos heterozigotos, três segmentos são
26 amplificados: um segmento de tamanho MQ resultante de um alelo, outro segmento de
27 tamanho PW resultante do segundo alelo e um segmento combinado de tamanho PQ. Nos
28 homozigotos, o segmento PQ e os segmentos MQ ou PW amplificam. Os dois iniciadores
29 internos (M e W) contêm uma região complementar relativamente curta e uma cauda 5' rica
30 em G-nucleótido de 10 nucleótidos. Os primers internos "trocam" de amplificação de baixa
31 eficiência para alta eficiência quando o DNA genômico é substituído por DNA modelo
32 amplificado anteriormente (QIAN et al., 2015).

1
2
3
4

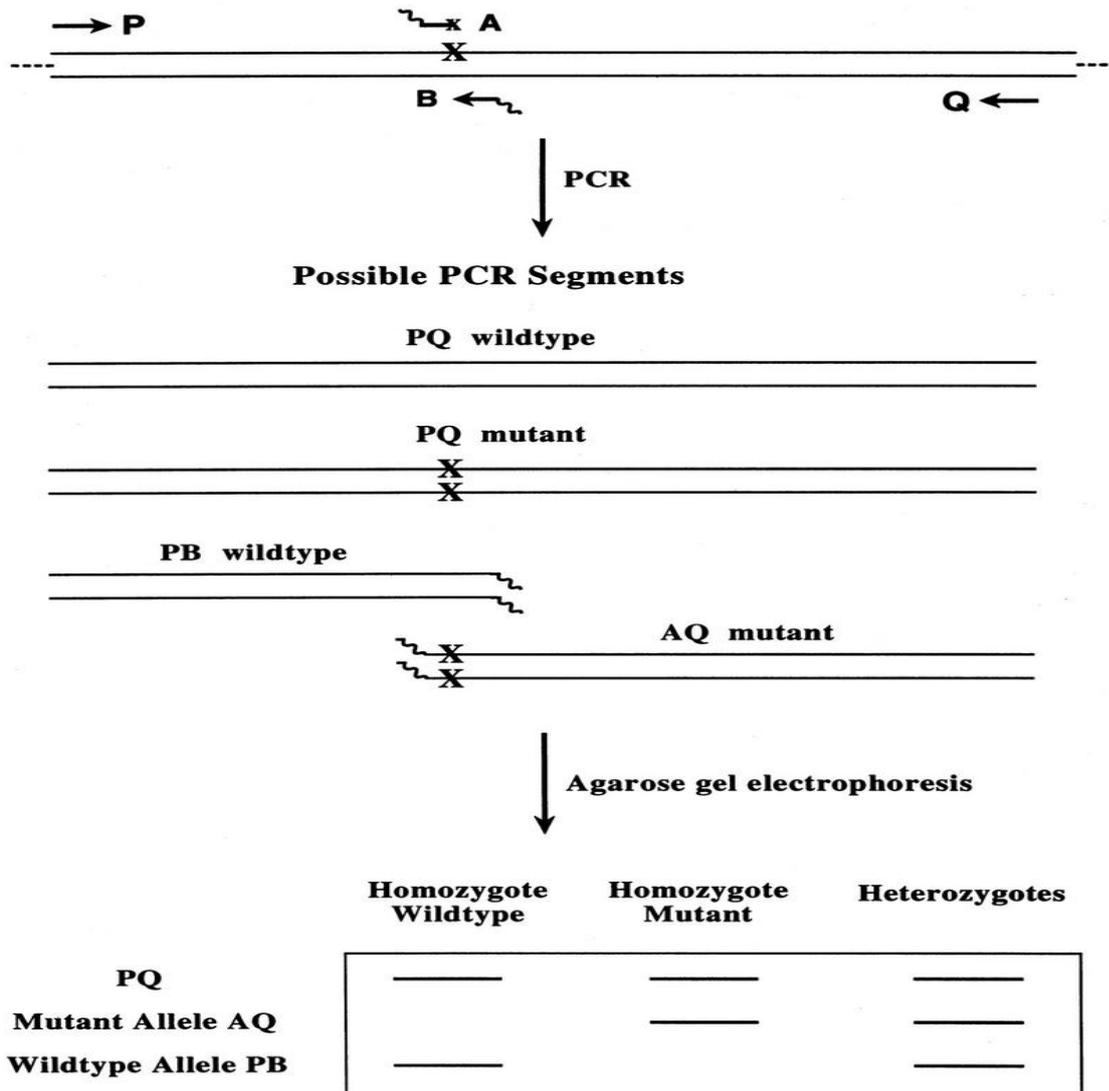


Figura 3. Esquema de Bi-PASA. Os quatro primers (P, Q, A e B) são representados por setas. X representa a mudança de sequência em relação ao outro alelo. Linhas onduladas nos primers internos representam as sequências de cauda 5' não complementares.

6

1 A análise do polimorfismo T-1237C (rs5743836) do gene *TLR9* foi realizada por
2 amplificação por PCR de alelos específicos bidireccionais (figura 2), Bi-PASA, sendo os
3 iniciadores primários como segue: P, 5-TCATTCAGCCTTCACTCAGA-3; Q, 5-
4 CACATTCAGCCCCTAGAGGG-3; M, 5-ggcggcggggGTGCTGTTCCCTCTGCCTGA-3 e
5 W, 5-gggccgggggATGAGACTTGGGGGAGTTTC-3 (CARVALHO et al., 2007).

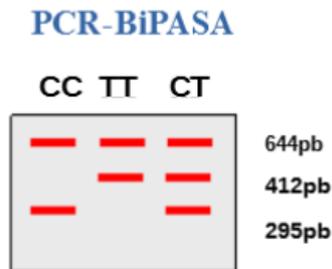


Figura 4. Esquema do padrão de corte do PCR-BiPASA para o polimorfismo -1237T/C do gene *TLR9*. Pb, pares de bases.

7 A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi composta por tampão de PCR 1x, 1,5
8 mmol de MgCl₂, 0,25 mmol de mistura de dNTP, 0,45 pmol do iniciador P (iniciador externo
9 para a frente), 0,4 pmol do iniciador Q (iniciador externo reverso), 0,05 pmol do iniciador W
10 (iniciador interno selvagem) e 0,1 pmol do iniciador M (iniciador mutante interno), 1U Taq
11 DNA Polimerase Platinum (QIAGEN Diagnostics GmbH, Hamburgo, Alemanha) e 50-100 ng
12 de DNA genômico em um volume total de reação de 20 µL.

13

14 As condições de PCR foi como segue: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos,
15 desnaturação intermediária a 94° por 15 segundos, anelamento a 57° por 30 segundos,
16 extensão intermediária a 65° por 45 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos, em um
17 total de 37 ciclos e resfriamento até 10 °C em Termociclador Mastercycler Nexus Gradient
18 (Eppendorf).

19

20 A eficiência da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2%, Brometo de
21 Etídio e visualizados por luz UV em sistema de fotodocumentação EDAS Kodak após
22 banhado em brometo de etídio (10 mg / mL).

1

2 **4.5. Análise dos resultados**

3 As frequências alélicas e genótípicas foram determinadas por contagem direta. O
4 equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi calculado para o grupo controle, o que afirma que, em uma
5 população mendeliana, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas
6 permanecerão constantes ao passar das gerações, No caso mais simples de um único locus
7 com dois alelos A e a com frequências alélicas p e q, respectivamente, o princípio de H-W
8 prediz que a frequência genotípica para o homocigoto AA será p^2 , para o heterocigoto Aa será
9 $2pq$ e os outros homocigotos aa será de q^2 .

10

11 A significância estatística das diferenças de frequência alélica entre os grupos foi
12 estimada pelo teste de X^2 Mantel-Haenszel usando tabelas de contingência 2x2. O risco
13 relativo com os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foi calculado como odds
14 ratios (OR).

15

16 Como cada indivíduo possui um par de alelos, o risco associado a cada genótipo pode
17 depender do número de cópias de C, o que permite definir vários modelos de herança: o
18 modelo dominante. Supõe que uma única cópia de C é suficiente para modificar o risco e que
19 ser portadora de 2 cópias modifica-a na mesma magnitude; isto é, heterocigotos TC e
20 homocigotos CC têm o mesmo risco, ou modelo recessivo. Assume que 2 cópias de C são
21 necessárias para modificar o risco; portanto, heterocigotos CT e homocigotos do alelo TT
22 mais frequente apresentam o mesmo risco, ou modelo codominante. É o mais geral. Cada
23 genótipo fornece um risco de doença diferente e não aditivo. Heterocigotos (He) e variantes
24 homocigotes (Va) são comparados separadamente dos homocigotos do alelo mais frequente
25 (INIESTA; GUINÓ; MORENO, 2005).

26

27 Todos os cálculos estatísticos foram concluídos com ambiente de software para
28 computação estatística e gráficos R (versão 3.5.2). Para investigar os efeitos dos genes
29 estudados, os modelos de herança de SNPs se encaixam (codominantes, dominantes e
30 recessivos) para genótipos no desfecho gestacional, foi utilizado o modelo de regressão
31 logística múltipla para binários, valores Z foram calculados por usando o teste de Wald.5.

1 Referências

- AAGAARD, K. et al. The placenta harbors a unique microbiome. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 237, p. 237ra65, 21 maio 2014.
- ABRAHAMS, V. M. et al. TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 9, p. 6035–6043, 1 maio 2008.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, jul. 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.
- ASKAR, E.; RAMADORI, G.; MIHM, S. Toll-like receptor 7 rs179008/Gln11Leu gene variants in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 11, p. 1859–1868, nov. 2010.
- AURELIUS, E. et al. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8735, p. 189–192, 26 jan. 1991.
- BORDIGNON, M. et al. TLR7 Gln11Leu single nucleotide polymorphism in patients with sarcoidosis. **Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases: official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders**, v. 30, n. 2, p. 157–161, jul. 2013.
- BUJKO, M. et al. Herpes simplex virus infection in women with previous spontaneous abortion. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 16, n. 3, p. 193–196, 1988.
- CARVALHO, A. et al. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, n. 4, p. 316–320, ago. 2007.
- CHATTERJEE, P. et al. Placental Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 7/8 activation contributes to preeclampsia in humans and mice. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41884, 2012.
- COX, S. M.; CASEY, M. L.; MACDONALD, P. C. Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 517–527, out. 1997.
- CRAWFORD, C. L. Comment on “TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia”. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 190, n. 12, p. 5909, 15 jun. 2013.
- DOS SANTOS, B. P. et al. TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from southern Brazil. **Lupus**, v. 21, n. 3, p. 302–309, mar. 2012.

DOWLING, J. K.; MANSELL, A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 5, p. e85, maio 2016.

GAO, W. et al. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 19 jul. 2017.

GOLDENBERG, R. L. et al. Epidemiology and causes of preterm birth. **Lancet (London, England)**, v. 371, n. 9606, p. 75–84, 5 jan. 2008.

GOLDENBERG, R. L.; HAUTH, J. C.; ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 20, p. 1500–1507, 18 maio 2000a.

GOLDENBERG, R. L.; HAUTH, J. C.; ANDREWS, W. W. Intrauterine infection and preterm delivery. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 20, p. 1500–1507, 18 maio 2000b.

GONÇALVES, L. F.; CHAIWORAPONGSA, T.; ROMERO, R. Intrauterine infection and prematurity. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 8, n. 1, p. 3–13, 2002.

GRIFFITHS, P. D.; BABOONIAN, C. Intra-uterine transmission of cytomegalovirus in women known to be immune before conception. **The Journal of Hygiene**, v. 92, n. 1, p. 89–95, fev. 1984.

GÜLMEZOĞLU, A. M. et al. Interventions to Reduce Maternal and Newborn Morbidity and Mortality. In: BLACK, R. E. et al. (Eds.). . **Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2)**. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, 2016.

HUNTINGTON, M. K.; SHAFER, C. W. Managing H*V in Pregnancy. **South Dakota Medicine: The Journal of the South Dakota State Medical Association**, v. 69, n. 1, p. 15–21, jan. 2016.

ILIEVSKI, V.; HIRSCH, E. Synergy between viral and bacterial toll-like receptors leads to amplification of inflammatory responses and preterm labor in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 767–773, nov. 2010.

ILIEVSKI, V.; LU, S.-J.; HIRSCH, E. Activation of toll-like receptors 2 or 3 and preterm delivery in the mouse. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 14, n. 4, p. 315–320, maio 2007.

INIESTA, R.; GUINÓ, E.; MORENO, V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. **Gaceta Sanitaria**, v. 19, p. 333–341, ago. 2005.

ISHIHARA, N. et al. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 186, n. 1, p. 158–166, jan. 2002.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.

KANG, X. et al. Excessive TLR9 signaling contributes to the pathogenesis of spontaneous abortion through impairment of Treg cell survival by activation of Caspase 8/3. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 285–292, dez. 2015.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749–759, out. 2005.

KARODY, V. et al. A toll-like receptor 9 (rs352140) variant is associated with placental inflammation in newborn infants. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, p. 1–7, 15 set. 2015.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 816–825, maio 2006.

KELLY, R. W.; KING, A. E.; CRITCHLEY, H. O. Cytokine control in human endometrium. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 121, n. 1, p. 3–19, jan. 2001.

KOGA, K. et al. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 72, n. 2, p. 192–205, ago. 2014.

KOI, H.; ZHANG, J.; PARRY, S. The mechanisms of placental viral infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 943, p. 148–156, set. 2001.

KREDIET, T. G. et al. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. **Pediatric Research**, v. 62, n. 4, p. 474–476, out. 2007.

KUMAZAKI, K. et al. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. **Human Pathology**, v. 35, n. 1, p. 47–54, jan. 2004.

LI, H. et al. Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. **Immunology**, v. 117, n. 2, p. 167–176, fev. 2006.

LIMA-COSTA, M. F.; BARRETO, S. M. Tipos de estudos epidemiológicos: conceitos básicos e aplicações na área do envelhecimento. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 4, p. 189–201, dez. 2003.

LIU, Q. et al. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. **Genome Research**, v. 7, n. 4, p. 389–398, abr. 1997.

LORENZ, E. et al. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. **Pediatric Research**, v. 52, n. 3, p. 373–376, set. 2002.

MA, Y.; HE, B. Recognition of herpes simplex viruses: toll-like receptors and beyond. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 6, p. 1133–1147, 20 mar. 2014.

MAHEASWARI, R.; SIVASANKAR, K.; SUBBARAYAN, S. Toll gates: An emerging therapeutic target. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 686–692, 2014.

MEDVEDEV, A. E. Toll-Like Receptor Polymorphisms, Inflammatory and Infectious Diseases, Allergies, and Cancer. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 33, n. 9, p. 467–484, set. 2013.

MOR, G. Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1127, p. 121–128, abr. 2008.

MURPHY, S. P. et al. Uterine NK cells mediate inflammation-induced fetal demise in IL-10-null mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 175, n. 6, p. 4084–4090, 15 set. 2005.

MURPHY, S. P. et al. Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 200, n. 3, p. 308.e1–9, mar. 2009.

NG, M. T. H. et al. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1345–1352, mar. 2010.

OH, D.-Y. et al. A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. **AIDS (London, England)**, v. 23, n. 3, p. 297–307, 28 jan. 2009.

OLIVEIRA, L. B. et al. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. **The Journal of General Virology**, v. 94, n. Pt 8, p. 1858–1864, ago. 2013.

ONU. **Objetivo 3: Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.** Disponível em: <<http://www.un.org/sustainabledevelopment/es/health/>>. Acesso em: 8 ago. 2016.

PACHATHUNDIKANDI, S. K. et al. Interplay of the Gastric Pathogen Helicobacter pylori with Toll-Like Receptors. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 192420, 2015.

PERAÇOLI, J. C.; RUDGE, M. V. C.; PERAÇOLI, M. T. S. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 57, n. 3, p. 177–185, mar. 2007.

QIAN, L. et al. Vitamin D3 alters Toll-like receptor 4 signaling in monocytes of pregnant women at risk for preeclampsia. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 18041–18049, 2015.

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

REDDY, U. M. et al. Detection of viral deoxyribonucleic acid in amniotic fluid: association with fetal malformation and pregnancy abnormalities. **Fetal Diagnosis and Therapy**, v. 20, n. 3, p. 203–207, jun. 2005.

REY, G. et al. Toll receptor 4 Asp299Gly polymorphism and its association with preterm birth and premature rupture of membranes in a South American population. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 9, p. 555–559, set. 2008.

RILEY, J. K.; NELSON, D. M. Toll-like receptors in pregnancy disorders and placental dysfunction. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 39, n. 3, p. 185–193, dez. 2010.

ROBB, J. A. et al. Intrauterine latent herpes simplex virus infection: II. Latent neonatal infection. **Human Pathology**, v. 17, n. 12, p. 1210–1217, dez. 1986.

SALAUN, B.; ROMERO, P.; LEBECQUE, S. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 12, p. 3311–3318, dez. 2007.

SCHARFE-NUGENT, A. et al. TLR9 provokes inflammation in response to fetal DNA: mechanism for fetal loss in preterm birth and preeclampsia. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 188, n. 11, p. 5706–5712, 1 jun. 2012.

SCHMUTZHARD, J. et al. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 29, n. 2, p. 120–126, fev. 2004.

TEIXEIRA, L. O. et al. Frequência do Papilomavírus Humano na placenta, no colostro e no sangue do cordão umbilical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 5, p. 203–207, maio 2015.

THAXTON, J. E.; NEVERS, T. A.; SHARMA, S. TLR-mediated preterm birth in response to pathogenic agents. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2010, 2010.

THAXTON, J. E.; ROMERO, R.; SHARMA, S. TLR9 activation coupled to IL-10 deficiency induces adverse pregnancy outcomes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 2, p. 1144–1154, 15 jul. 2009.

WENSTROM, K. D. et al. Intrauterine viral infection at the time of second trimester genetic amniocentesis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 92, n. 3, p. 420–424, set. 1998.

WHO et al. **WHO | Trends in maternal mortality: 1990 to 2015**. Geneva, Switzerland: World Health Organization 2015, 2015.

WIFI, M.-N. A. et al. Toll-like receptors-2 and -9 (TLR2 and TLR9) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes and diabetic foot. **Medicine**, v. 96, n. 17, 28 abr. 2017.

YASUDA, H. et al. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 294, n. 5, p. F1050-1058, maio 2008.

YEW, K.-H.; CARSTEN, B.; HARRISON, C. Scavenger receptor A1 is required for sensing HCMV by endosomal TLR-3/-9 in monocytic THP-1 cells. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 4, p. 883–893, jan. 2010.

1 **6. Artigo pronto para publicação**

2 **Nome do periódico:**

3 Journal of Reproductive Immunology F.I.: 2.3

1 7. Conclusões

2

3 Este trabalho é o primeiro estudo complexo em dois importantes SNPs dos genes
4 *TLRs7* e *9* que desempenham papéis críticos na gravidez e várias complicações da gravidez,
5 além de incluir também a detecção molecular do vírus do herpes na placenta, sendo um
6 trabalho de dados emparelhados. Descrevendo-se epidemiologicamente a ocorrência das
7 principais alterações durante a gestação presentes no grupo de estudo e evidenciando a
8 presença de comorbidades, principalmente relacionadas com a presença de infecção pelo vírus
9 da herpes na placenta.

10

11 Foi sugerido que o TLR7 está envolvido no reconhecimento da infecção pelo HSV-1,
12 como um sensor em células imunes para infecção viral (LI et al., 2006). O genótipo TT do
13 rs79008, duplica significativamente (OR = 2,23) a suscetibilidade à infecção pelo HSV1,
14 considerando que o alelo da variante T é responsável por codificar uma proteína
15 funcionalmente comprometida (ASKAR; RAMADORI; MIHM, 2010), nossos resultados são
16 compatíveis com a ideia de que, na presença do duplo mutante, o risco de infecção por HSV1
17 aumenta.

18

19 No caso do TLR9 (rs5743836), a presença do alelo C variante, em sua configuração
20 heterozigótica ou homozigótica, diminui a chance de sofrer infecção pelos agentes
21 patogênicos considerados neste estudo, principalmente HSV2 e HCMV. Infecções por HSV-2
22 podem estimular a produção de IFN- α em células dendríticas plasmocitoides (pDCs) (MA;
23 HE, 2014). O TLR9 foi determinado para induzir a expressão do TNF- α 1h após a infecção
24 pelo HCMV (YEW; CARSTEN; HARRISON, 2010). Essa tendência de diminuir o risco de
25 infecção também foi confirmada pela presença do alelo C, reduzindo o risco de hospitalização
26 por infecção do trato urinário em pacientes com cor da pele branca. O TLR9 é um receptor
27 intracelular que reconhece motivos CpG hipometilados, que são abundantes no DNA de
28 origem bacteriana, viral ou sintética (PACHATHUNDIKANDI et al., 2015). A análise da
29 sequência promotora do gene de TLR9 mostrou que o transporte do alelo variante "C" -1237
30 cria um potencial local de ligação a NF-kappaB que teoricamente aumentaria a actividade

1 transcricional do gene (NG et al., 2010). Nesse sentido, é consonante com nossos resultados, a
2 presença do alelo C, em codominância ou modelo recessivo, aumenta a expressão de TLR9 e,
3 portanto, poderia conferir maior proteção à infecção.

4
5 A presença do genótipo TT para TLR7 aumentou 3 vezes mais o risco de sofrer algum
6 distúrbio de hipertensão durante a gestação em mulheres com história de hipertensão arterial
7 sistêmica, síndrome hipertensiva caracterizada por ativação excessiva do sistema imunológico
8 materno, inflamação e disfunção endotelial. TLR7 tem sido associado com alta expressão em
9 mulheres com pré-eclâmpsia (CHATTERJEE et al., 2012). O alelo variante T é responsável
10 por codificar uma proteína funcionalmente comprometida (ASKAR; RAMADORI; MIHM,
11 2010), sugerimos que serão necessários mais estudos para esclarecer essa associação.

12
13 A presença do alelo C no TLR9 (sugerindo aumento da atividade transcricional do
14 gene), em condição homozigótica ou heterozigótica, parece aumentar a chance de parto
15 natural ou vaginal. O TLR9 provoca inflamação em resposta ao DNA fetal e tem sido
16 proposto como um mecanismo para a perda fetal no parto prematuro (CRAWFORD, 2013).
17 As expressões dos genes TLR9 foram significativamente superexpressas em pacientes de
18 aborto espontâneo (KANG et al., 2015). Nossos resultados no TLR9 sugerem que a super
19 expressão desse receptor pode estar envolvida no controle e equilíbrio de citocinas pró-
20 inflamatórias, favorecendo o sucesso da gravidez.

21
22 Os SNPs avaliados (rs179008, rs5743836) mostraram participação na ocorrência de
23 morbidades durante a gestação, validando nossa hipótese de que essas variantes estão ligadas
24 ao risco de ocorrência de sofrer complicações infecciosas e não infecciosas durante a
25 gravidez. No entanto, consideramos importante aprofundar mais no estudo da tríade, infecção
26 placentária, polimorfismos nos genes TLR e alterações na gravidez.

27
28 Como principal perspectiva futura, seria melhorar os modelos de regressão, talvez se
29 ajustando com outros ou um maior número de variáveis, a fim de tornar o poder preditivo
30 deste estudo mais robusto, e também aprofundar mais no estudo do uso potencial de agonistas
31 ou antagonistas destes receptores no tratamento de algumas alterações durante a gravidez.

1 8. Apêndice 1: Instrumento para coleta de dados.

Prevalência de distúrbios de gravidez em gestantes atendidas no Hospital Universitário (HU-FURG) do Rio Grande – RS, estudo de fatores genéticos de risco associados.

Nome : _____

GRAVIDEZ E DOENÇAS DO SEXO

86 Quantos partos você teve (parto normal mais cesárea)? ____

87 Resultado da detecção positivo de DNA para:

- a. Treponema pallidum (1) Sim (2) Não (3) Não feito
- b. Neisseria gonorrhoeae (1) Sim (2) Não (3) Não feito
- c. Chlamydia trachomatis (1) Sim (2) Não (3) Não feito
- d. Trichomonas vaginalis (1) Sim (2) Não (3) Não feito

88 Resultado da detecção de DNA de algum agente de IST

(1) Sim (2) Não (10) Dado não disponível

89 Normotensas:

Mulheres normotensas antes da gravidez e antes de 20 semanas de gestação

(1) Sim, tratado (2) Sim, não tratado (3) Não (9) Não lembro (10) Dado não disponível

90 Hipertensão gestacional:

Definido como pressão arterial (PA) sistólica de pelo menos 140 mm Hg e / ou PA diastólica de pelo menos 90 mm Hg em pelo menos duas ocasiões, após a 20ª semana de gestação.

(1) Sim, tratado (2) Sim, não tratado (3) Não (9) Não lembro (10) Dado não disponível

PAS: _____

PAD: _____

91 Proteinúria:

Defined as 300 mg or more per 24-hour period

(1) Sim (2) Sim, tratado (3) Não (4) Não feito (5) Sim, não tratado (10) Dado não disponível

Proteinúria valor: _____

92 Pré-eclampsia:

Defined as gestational hypertension plus proteinuria

(1) Sim, tratado (2) Sim, não tratado (3) Não (4) Não feito (10) Dado não disponível

(5) creatinúria _____

(6) Relação proteinúria/creatinúria _____

93 Internações hospitalares :

(1) Sim, Qual motivo? _____ (2) Não

94 Testes obstétricos de rotina Anormal, ultrassom : () RCIU, () Oligidramnio () Doppler:

(1) Sim, Qual? _____ (2) Não

Otro: _____

95 Restrição de crescimento intrauterino

(1) Sim (2) Não (10) Dado não disponível

96 Tamanho Recém-nascido: _____ cm

(1) Normal (2) Anormal (10) Dado não disponível

97 Baixo peso

(1) Sim (2) Não (10) Dado não disponível

98 Parto a termo (> 37 sem):

(1) Sim (2) Não

99 . Idade Gestacional:

(1) Idade Gestacional DUM _____ sem _____ dias

(2) Idade Gestacional ECO (de quando) _____ sem _____ dias

(3) Idade gestacional capurro _____ sem _____ dias

100 Tipo de parto:

(1) vaginal (2) vaginal + forceps

(10) Dado não disponível

(3) cesariana : qual a indicação, motivo : _____

101 Seleção dos distintos blocos

(1) Bloco I (2) Bloco II

102 Testagem de Rotina:

HCV (1) Positivo (2) Negativo (3) Não feito

HIV (1) Positivo (2) Negativo (3) Não feito

HBsAg (1) Positivo (2) Negativo (3) Não feito

Otro, Qual?: _____ (1) Positivo (2) Negativo

(10) Dado não disponível

1
2
3

9. Apêndice 2: padronização do polimorfismo do gene *TLR7*

Resultado da padronização do polimorfismo do gen *TLR7* por PCR-RFLP.

1. Confirmação “in silico”:

>Produto de 368pb a partir da sequência de amostra do modelo linear *TLR7*.

```
AACAACGAATAGGAAAATGCTGCTTCTACCTCTCGAAAAGCTATTTTGCTAAAAGAGCTAAGATGCTAAAAGCTAAATATGTA  
AAATAGTTGCAAATCTCAGTAACTGACAAATACAGTCATGGGGTTGGGGATGCTGTTTAGACAGCTGAAAATAAGACCTGAATT  
GTTATTTTAAAAATGTTGCAAAAAGAGAGGCAGCAAATGGGAATTTTAATTCTGATTCTTGGTATGTTTTAGAACAATGATTGT  
TCTTTCTTATACTTTCAGGTGTTTCCAATGTGGACACTGAAGAGAC(A/T)AATTCTTATCCTTTTAAACATAATCCTAATTTCCAA  
CTCCTTGGGGCTAGATGGTTTCCTAAAAC
```

Sequência de corte enzima *ApoI*

```
5'...R^AATTY...3'  
3'...YTTAAR...5'
```

2. Confirmação molecular:

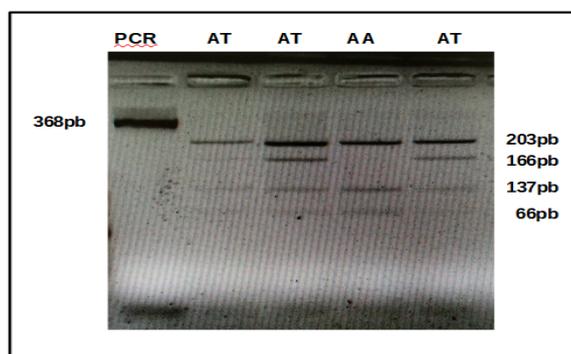


Figura 2a: Foto de Gel do PCR-RFLP do gen *TLR7*, em gel de agarose 2%, visualizados com Diamond™ Nucleic Acid Dye, por luz UV. AA: genótipo homocigoto, AT: genótipo heterocigótico. Pb, pares de bases.

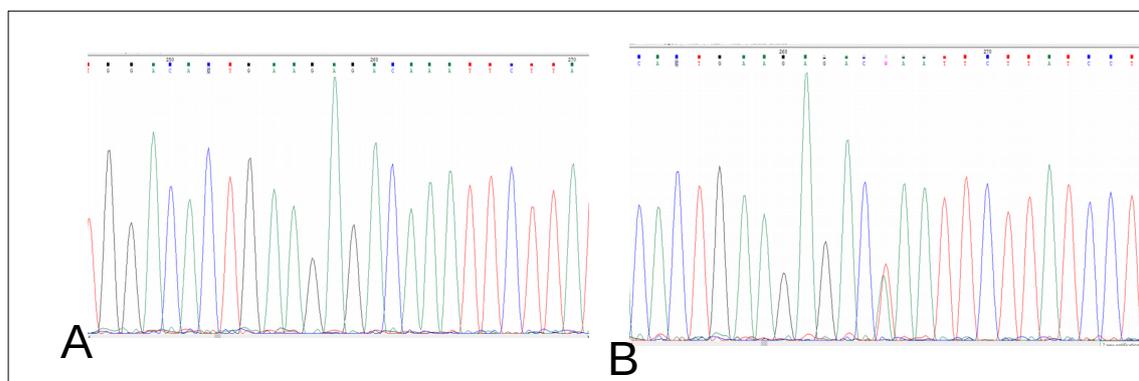


Figura 2b: Electroferograma de sequenciamento do gen *TLR7*, obtido em Applied Biosystems™ 3130/3130xl Genetic Analyzer. A: genótipo homocigoto, B: genótipo heterocigótico.

1 **10. Apêndice 3: padronização do polimorfismo do gene *TLR9***

2 Resultado da padronização do polimorfismo do gene *TLR9* por PCR-Bi-PASA.

3 **1.Confirmação “in sílico”:**

4 >Produto de 644 pb a partir da sequência de amostra do modelo linear *TLR9*, base 57 até base
5 700 (Q - P).

```
6 CACATTCAGCCCCTAGAGGGAAGTGTTCAAACCTAAGTCACACTAGGTCCTCCTCTGCTCAGACCCCTCCCTGGCTGACTCTG
7 GAGTCAAAGCCACAGTCCACAGATGGCCAACAAGGCCCTATGGGACCTGCCACCCGCTGTTCCCTGAGTGCTCTCCAGGCC
8 ACTGGCCTGCTTGCACTTGACTGTGTAGCCCCTGGGCATTCTCCTGCCTCAGGGCCTTGGGATGTGCTGTTCCCTCTGCCTGAA
9 AACTCCCCCAAGTCTCATATGACCCCTCCTTGCCTCCATTATGTCTCTGCTCCCATGTACCCCTCTCAACAGGGCCATCCAGCCT
10 TCTTACAAACCTCCACCCCAGATCTGGCACTCCTGAGCTCCTTGCCTGGTCTATGTTTCTCTTTGCCTAACATTTTTTAACTG
11 CTAGCACACCGGATCATTGATCTTTTCATGGTTTATTGTATATCGTCTTATCCCTGCTGGAATGTACAGCTCTTAAGGGCAGTGAT
12 CTTTTATCTGCATCCCCAGGATCCAGTACAGTGCCACAGCACATAGTAAGTGCTTGATATCTGCTGAATTATGTACACCCAGCAGTC
13 AGCTCTGGGCAGGCACAGAGAGGGTATTTCTGAGTGAAGGCTGAATGA
```

14

15 Resultados dos produtos de PCR primers W-P:

16 >Produto de 414 pb a partir da sequência de amostra do modelo linear *TLR9*, base 287 até
17 base 700 (W - P).

```
18 GTGCTGTTCCCTCTGCCTGAAAACCTCCCCAAGTCTCATATGACCCCTCCTTTCCTCCATTATGTCTCTGCTCCCATGTACCCCT
19 CTC AACAGGGCCATCCAGCCTTCTTACAAACCTCCACCCCAGATCTGGCACTCCTGAGCTCCTTTCCTGGTCTATGTTTCTCT
20 TTGCTTAAACATTTTTTAACTGCTAGCACACCGGATCATTGATCTTTTCATGGTTTATTGTATATCGTCTTATCCCTGCTGGAATGT
21 CAGCTTCTTAAGGGCAGTGATCTTTTATCTGCATCCCCAGGATCCAGTACAGTGCCACAGCACATAGTAAGTGCTTGATATCTGCT
22 GAATTATGTACACCCAGCAGTCAGCTCTGGGCAGGCACAGAGAGGGTATTTCTGAGTGAAGGCTGAATGA
```

23

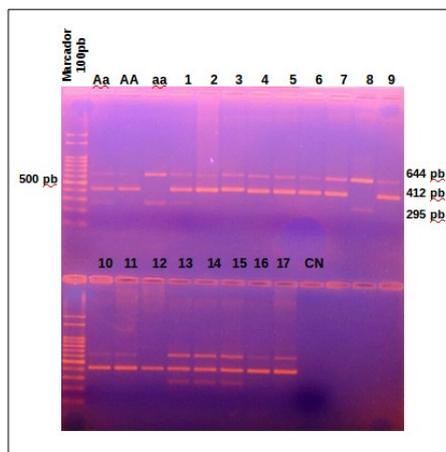
24 Resultados dos produtos de PCR primers Q-M:

25 >Produto de 269 pb a partir da sequência de amostra do modelo linear *TLR9*, base 57 até base
26 325 (Q - M).

```
27 CACATTCAGCCCCTAGAGGGAAGTGTTCAAACCTAAGTCACACTAGGTCCTCCTCTGCTCAGACCCCTCCCTGGCTGACTCTG
28 GAGTCAAAGCCACAGTCCACAGATGGCCAACAAGGCCCTATGGGACCTGCCACCCGCTGTTCCCTGAGTGCTCTCCAGGCC
29 ACTGGCCTGCTTGCACTTGACTGTGTAGCCCCTGGGCATTCTCCTGCCTCAGGGCCTTGGGATGTGCTGTTCCCTCTGCCTGAA
30 AACTCCCCCAAGTCTAT.
```

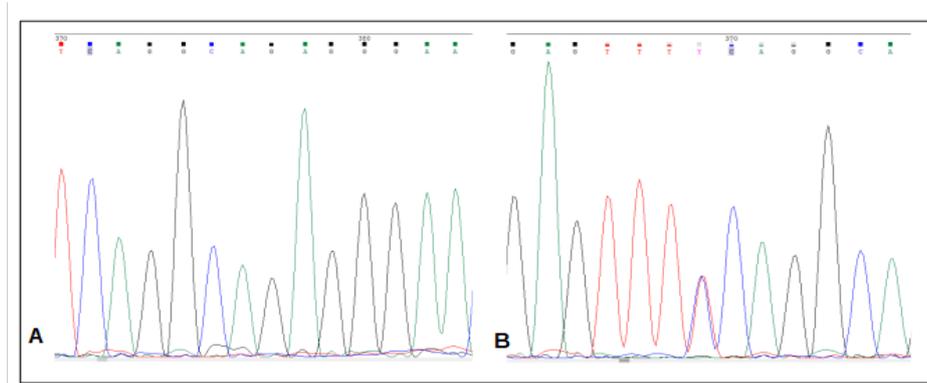
31

32 **2. Confirmação molecular:**



34

35 **Figura 3a:** Foto de Gel do PCR-BiPASA do fragmento do gen *TLR9*, em gel de agarose 2%,
36 em brometo de etídio visualizados por luz UV. AA: genótipo homocigoto, Aa: genótipo
37 heterocigótico, aa: genótipo mutante heterocigotos. Pb, pares de bases.



2 **Figura 3b:** Electroferograma de sequenciamento do fragmento do gen *TLR9*, obtido em
 3 Applied Biosystems™ 3130/3130xl Genetic Analyzer. **A:** genótipo homocigoto, **B:** genótipo
 4 heterocigótico.

5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26

1 11. Apêndice 4: código R de um arquivo “.Rmd”

2 O seguinte é o código R de um arquivo “.Rmd”, usado para gerar os resultados de regressão
3 logística para o gen *TLR9* modelo dominante, como exemplo.

```
4 ---
5 title: "Analysis from genetic SNP's data"
6 author: "Karen Yumaira Sánchez Luquez"
7 date: "February 1, 2019"
8 output:
9   html_document:
10     df_print: paged
11     toc: yes
12 ---
13
14 ```{r setup, include=FALSE}
15 knitr::opts_chunk$set(echo = TRUE)
16 ```
17
18 Load packages
19
20 ```{r message=FALSE}
21 library("pegas")
22 library("knitr")
23 ```
24
25 # Genotypic and allelics frequencies
26
27 ```{r message=FALSE}
28 dna<-read.csv("k_data_rd.csv") #read the data
29 x <- as.loci(dna, allele.sep = "/", col.loci = 3:4) #convert dataframe to
30 loci format
31 summary(x) #view allele and genotype frequencies of all data
32 ```
33
34 # Logistic regressions
35
36 ##Heritage ***dominant*** model
37
38 ###Recodification of genotypes for mach the logistic regression with the
39 heritage model
40
41 ```{r}
42 dnak<-dna
43 #dominant model for TLR9 SNP
44 #conditions for dominant model
45 #-----
46 dnak$tlr9<-as.character(dnak$tlr9) #back to character
47 dnak$tlr9[which(dnak$tlr9=="T/T")]<- 0 #new priority heritage order
48 dnak$tlr9[which(dnak$tlr9=="C/T")]<- 1 #new priority heritage order
49 dnak$tlr9[which(dnak$tlr9=="C/C")]<- 1 #new priority heritage order
50 dnak$tlr9<-as.factor(dnak$tlr9) #back to factor
51 #for TLR7 SNP
52 dnak$tlr7<-as.character(dnak$tlr7) #back to character
53 dnak$tlr7[which(dnak$tlr7=="A/A")]<- 0 #new priority heritage order
54 dnak$tlr7[which(dnak$tlr7=="T/A")]<- 1 #new priority heritage order
```

```

1  dnak$tlr7[which(dnak$tlr7=="T/T")]<- 1 #new priority heritage order
2  dnak$tlr7<-as.factor(dnak$tlr7) #back to factor
3  #-----
4  ```
5
6  ###Code and results for *dominant* heritage model for TLR9 genotype
7
8  ```{r eval=TRUE}
9  dd<-list()
10 tab<-list()
11 out1<-list()
12 out0<-list()
13 outcome_1<-list()
14 outcome_0<-list()
15 formula<-list()
16 modelo_glm<-list()
17 logist_reg_mod<-list()
18 heritage_model<-list()
19 genotype<-list()
20 model_asig<-list()
21 coeff<-list()
22 odd<-list()
23 p_value<-list()
24 p_model<-list()
25 result<-list()
26
27 for (i in 7:ncol(dnak)){
28   #frequencies
29   dd[[i]]<-data.frame(exposure=dnak[,i], outcome=dnak$tlr9)
30   tab[[i]]<-round(((table(dd[[i]]),2:3)/sum(table(dd[[i]]),2:3))*100),1)
31   tab[[i]]<-tab[[i]][2:1, 2:1]
32   out1[[i]]<-tab[[i]][1,1]
33   out0[[i]]<-tab[[i]][1,2]
34
35   #Dominant model for *TLR9* SNP
36
37   #-----
38   ---
39   formula[[i]]<-as.formula(paste(colnames(dnak[i]),"~ tlr9"))
40   modelo_glm [[i]] <- glm(formula[[i]], data = subset(dnak, tlr9!=""),
41 family = "binomial")
42   print(paste(colnames(dnak[i])," ~ TLR9"))
43   print(summary(modelo_glm[[i]]))#va bien
44   logist_reg_mod[[i]]<-c(paste(colnames(dnak[i])," ~ tlr9"),"", "")
45   heritage_model[[i]]<-c("Dominant", "", "")
46   outcome_1[[i]]<-c(out1[[i]], "", "")
47   outcome_0[[i]]<-c(out0[[i]], "", "")
48   genotype[[i]]<-c("T/T", "C/T", "C/C")
49   model_asig[[i]]<-c(0,1,1) #change with the heritage model
50   coeff[[i]]<-c(round(modelo_glm[[i]]$coefficients[[1]],3),
51 round(modelo_glm[[i]]$coefficients[[2]],3), "")
52   odd[[i]]<-c(round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[1]]),3),
53 round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[2]]),3), "")
54   p_value[[i]] <- c(round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[1]],4),
55 round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[2]],4), "")

```

```

1   p_model[[i]]<-c(round(anova(modelo_glm[[i]], test = "Chisq")
2   `$Pr(>Chi)`[2],3), "", "")
3   result[[i]]<-data.frame(logist_reg_mod[[i]], heritage_model[[i]],
4   outcome_1[[i]], outcome_0[[i]], genotype[[i]], model_asig[[i]], coeff[[i]],
5   odd[[i]], p_value[[i]], p_model[[i]])
6   names(result[[i]])<-c("log_mod", "herit_mod",
7   "outcome=1", "outcome=0", "genotype", "mod_asig", "coeff", "odd",
8   "p_value", "p_mod")
9   print(kable(result[[i]]))
10
11  print("_____")
12  print("")
13  print("")
14  print("")
15  }
16  kable(do.call(rbind.data.frame, result), caption = "Summary table for
17  dominant heritage model of TLR9 SNP's")
18  ```
19
20  ###Code and results for *dominant* heritage model for TLR9 adjust to skin
21  color
22
23  ```{r eval=TRUE}
24  dd<-list()
25  tab<-list()
26  out1<-list()
27  out0<-list()
28  outcome_1<-list()
29  outcome_0<-list()
30  formula<-list()
31  modelo_glm<-list()
32  logist_reg_mod<-list()
33  heritage_model<-list()
34  ind_var<-list()
35  genotype<-list()
36  model_asig<-list()
37  coeff<-list()
38  odd<-list()
39  p_value<-list()
40  p_model<-list()
41  result<-list()
42
43  for (i in 7:ncol(dnak)){
44
45    #frequencies
46    dd[[i]]<-data.frame(exposure=dnak[,i], outcome=dnak$tlr9)
47    tab[[i]]<-round(((table(dd[[i]])[,2:3]/sum(table(dd[[i]])[,2:3]))*100),1)
48    tab[[i]]<-tab[[i]][2:1, 2:1]
49    out1[[i]]<-tab[[i]][1,1]
50    out0[[i]]<-tab[[i]][1,2]
51
52    #Dominant model for *TLR9* SNP's ajusted for skin color
53
54    #-----
55    ---
56    formula[[i]]<-as.formula(paste(colnames(dnak[i]), "~ tlr9 + cor"))

```

```

1  modelo_glm [[i]] <- glm(formula[[i]], data = subset(dnak, tlr9!=""),
2  family = "binomial")
3  print(paste(colnames(dnak[i]), " ~ TLR9 + cor"))
4  print(summary(modelo_glm[[i]]))#va bien
5  logist_reg_mod[[i]]<-c(paste(colnames(dnak[i]), " ~ tlr9 + cor"), "", "", "")
6  heritage_model[[i]]<-c("Dominant", "", "", "")
7  outcome_1[[i]]<-c(out1[[i]], "", "", "")
8  outcome_0[[i]]<-c(out0[[i]], "", "", "")
9  ind_var[[i]]<-c("TLR9", "", "", "Skin color")
10 genotype[[i]]<-c("T/T", "C/T", "C/C", "")
11 model_asig[[i]]<-c(0,1,1,1) #change with the heritage model
12 coeff[[i]]<-c(round(modelo_glm[[i]]$coefficients[[1]],3),
13 round(modelo_glm[[i]]$coefficients[[2]],3), "", round(modelo_glm[[i]]
14 $coefficients[[3]],3))
15 odd[[i]]<-c(round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[1]]),3),
16 round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[2]]),3), "",
17 round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[3]]),3))
18 p_value[[i]] <- c(round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[1]],4),
19 round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[2]],4), "",
20 round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[3]],4))
21 p_model[[i]]<-c(round(anova(modelo_glm[[i]], test = "Chisq")
22 `$Pr(>Chi)`[2],3), "", "", "")
23 result[[i]]<-data.frame(logist_reg_mod[[i]],heritage_model[[i]],
24 outcome_1[[i]], outcome_0[[i]],ind_var[[i]], genotype[[i]],
25 model_asig[[i]], coeff[[i]], odd[[i]], p_value[[i]] ,p_model[[i]])
26 names(result[[i]])<-
27 c("log_mod","herit_mod","outcome=1","outcome=0","var", "genotype",
28 "mod_asig", "coeff", "odd", "p_value","p_mod")
29 print(kable(result[[i]]))
30
31 print("_____")
32 print("")
33 print("")
34 print("")
35 }
36 kable(do.call(rbind.data.frame, result), caption = "Summary table for
37 dominant heritage model of TLR9 SNP's adjusted to skin color")
38 ```
39
40 ####Code and results for *dominant* heritage model for TLR9 adjust to infect
41 herpes placent
42
43 ```{r eval=TRUE}
44 dd<-list()
45 tab<-list()
46 out1<-list()
47 out0<-list()
48 outcome_1<-list()
49 outcome_0<-list()
50 formula<-list()
51 modelo_glm<-list()
52 logist_reg_mod<-list()
53 heritage_model<-list()
54 ind_var<-list()
55 genotype<-list()
56 model_asig<-list()

```

```

1  coeff<-list()
2  odd<-list()
3  p_value<-list()
4  p_model<-list()
5  result<-list()
6
7  for (i in c(7:9,11:23)){
8
9    #frequencies
10   dd[[i]]<-data.frame(exposure=dnak[,i], outcome=dnak$tlr9)
11   tab[[i]]<-round(((table(dd[[i]]),2:3)/sum(table(dd[[i]]),2:3))*100),1)
12   tab[[i]]<-tab[[i]][2:1, 2:1]
13   out1[[i]]<-tab[[i]][1,1]
14   out0[[i]]<-tab[[i]][1,2]
15
16   #Dominant model for *TLR9* SNP's ajusted for infec herpes placent
17
18   #-----
19   ---
20   formula[[i]]<-as.formula(paste(colnames(dnak[i]),"~ tlr9 +
21   inf_her_plac"))
22   modelo_glm [[i]] <- glm(formula[[i]], data = subset(dnak, tlr9!=""),
23   family = "binomial")
24   print(paste(colnames(dnak[i])," ~ TLR9 + inf_her_plac"))
25   print(summary(modelo_glm[[i]]))#va bien
26   logist_reg_mod[[i]]<-c(paste(colnames(dnak[i])," ~ tlr9 +
27   inf_her_plac"), "", "", "")
28   heritage_model[[i]]<-c("Dominant", "", "", "")
29   outcome_1[[i]]<-c(out1[[i]], "", "", "")
30   outcome_0[[i]]<-c(out0[[i]], "", "", "")
31   ind_var[[i]]<-c("TLR9", "", "", "Infect herpes placenta")
32   genotype[[i]]<-c("T/T", "C/T", "C/C", "")
33   model_asig[[i]]<-c(0,1,1,1) #change with the heritage model
34   coeff[[i]]<-c(round(modelo_glm[[i]]$coefficients[[1]],3),
35   round(modelo_glm[[i]]$coefficients[[2]],3), "", round(modelo_glm[[i]]
36   $coefficients[[3]],3))
37   odd[[i]]<-c(round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[1]]),3),
38   round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[2]]),3), "",
39   round(exp(modelo_glm[[i]]$coefficients[[3]]),3))
40   p_value[[i]] <- c(round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[1]],4),
41   round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[2]],4), "",
42   round(summary(modelo_glm[[i]])[13][[1]][,4][[3]],4))
43   p_model[[i]]<-c(round(anova(modelo_glm[[i]], test = "Chisq")
44   `$Pr(>Chi)`[2],3), "", "", "")
45   result[[i]]<-data.frame(logist_reg_mod[[i]], heritage_model[[i]],
46   outcome_1[[i]], outcome_0[[i]], ind_var[[i]], genotype[[i]],
47   model_asig[[i]], coeff[[i]], odd[[i]], p_value[[i]] ,p_model[[i]])
48   names(result[[i]])<-
49   c("log_mod", "herit_mod", "outcome=1", "outcome=0", "var", "genotype",
50   "mod_asig", "coeff", "odd", "p_value", "p_mod")
51   print(kable(result[[i]]))
52
53   print("_____")
54   print("")
55   print("")
56   print("")

```

```
1 }  
2 kable(do.call(rbind.data.frame, result), caption = "Summary table for  
3 dominant heritage model of TLR9 SNP's adjusted to infect herpes placent")
```