



DANIELA PINHEIRO LEONARDO

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE E METALOPROTEINASES DA
MATRIZ EXTRACELULAR COM A PRÉ-ECLÂMPsia

CAMPINAS

2015

DANIELA PINHEIRO LEONARDO

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE E METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR COM A PRÉ-ECLÂMPsia

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de mestra em ciências na área de
concentração em Clínica Médica.

ORIENTADOR: KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN
CO-ORIENTADORES: MARIA LAURA COSTA DO NASCIMENTO
FERNANDO FERREIRA COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
DANIELA PINHEIRO LEONARDO, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN.

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: Não se aplica
Nº processo: Não se aplica

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L553a Leonardo, Daniela Pinheiro, 1984-
Associação dos polimorfismos dos genes da óxido nítrico sintase e metaloproteinases da matriz extracelular com a pré-eclâmpsia / Daniela Pinheiro Leonardo. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Kleber Yotsumoto Fertrin.
Coorientadores: Maria Laura Costa do Nascimento e Fernando Ferreira Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Pré-eclâmpsia. 2. Síndrome HELLP. 3. Eclâmpsia. 4. Óxido nítrico. 5. Metaloproteinases da Matriz. 6. Polimorfismo genético. I. Fertrin, Kleber Yotsumoto, 1980-. II. Nascimento, Maria Laura Costa, 1979-. III. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Association of nitric syntase and matrix metalloprotease single nucleotide polymorphisms with preeclampsia and its complications

Palavras-chave em inglês:

Preeclampsia
HELLP Syndrome
Eclampsia
Nitric oxide
Matrix metalloproteases
Polymorphism, Genetic

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Kleber Yotsumoto Fertrin
Nelson Sass
Fernanda Loureiro de Andrade Orsi

Data de defesa: 31-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DANIELA PINHEIRO LEONARDO

ORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

**COORIENTADOR(A): PROF(A). DR(A). FERNANDO FERREIRA COSTA E PROF(A). DR(A).
MARIA LAURA COSTA NASCIMENTO**

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

2. PROF(A). DR(A). NELSON SASS

3. PROF(A). DR(A). FERNANDA LOUREIRO DE ANDRADE ORSI

**Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 31 de julho de 2015

*Dedico este trabalho à minha Família, ao meu Namorado e à minha Santinha,
Santa Terezinha do Menino Jesus, que sempre cuidam de mim, me protegem e
estão presentes em todas as situações... Deus, o senhor é muito bom comigo,
Obrigada!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser tão bom comigo, por me colocar em uma família tão amorosa, por me permitir trabalhar na área que eu amo, por permitir que eu encontrasse a melhor pessoa do mundo que é meu namorado, e por todos amigos maravilhosos que eu tenho.

Quero agradecer minha família que amo e é a base para eu ser o que sou hoje.

À minha mãe, quero agradecer por tudo, tudo mesmo!!! Por cuidar de mim e por me fazer gostar tanto de estudar. Você é um exemplo para mim, sempre estudiosa, interessada e atualizada. Agradeço por cada vez que sentou comigo até altas horas, me ensinou, foi atrás de estudar e relembrar coisas que muitas vezes não via há tempos. Agradeço por me deixar recortar suas enciclopédias lindas para que eu fizesse as melhores capas para os trabalhos da escola. Obrigada por me amar tanto e sempre estar comigo em tudo que preciso... ah e pela sopa que faz sempre quando percebe que estou doentinha, ou até mesmo triste rs...

Ao meu pai, quero agradecer por ser esse homem que é extremamente correto e trabalhador, tenho muito orgulho de ser sua filha e ver como sempre batalhou para nos dar tudo que precisamos. Sei que é fechadão, muitas vezes de poucas palavras, mas sei e percebo toda sua preocupação comigo e com meus irmãos. Agradeço muito a você por ser sempre tão exigente, pois com certeza me fez não querer te decepcionar e construiu o que sou hoje.

Aos meus irmãos, é até difícil falar... Vocês são maravilhosos, amo tanto vocês, e sou muito feliz em ser a irmã mais velha (rs) e poder acompanhar, desde o começo, a vida de cada um. Quero agradecer vocês por todo o carinho, atenção e preocupação comigo. Á Carol, agradeço por ser sempre minha amiga, por me ouvir, e ser sempre atenciosa e cuidadosa comigo. Além de me dar meus sobrinhos lindos que me inspiram e me dão felicidade nos momentos de desânimo. À Ana, briguenta (rs) e que amooo, agradeço pela amizade e também por ser tão engraçada, por me fazer rir com os filmes horríveis que por sua culpa “aparecem” (rs), e também por todo o carinho e chocolates que buscou para mim para essa tese sair rs....Ao Rodrigo, meu irmãozinho mais novo que já é muito maior que eu há tempos...agradeço por ser sempre meu companheiro, amigo e por todos os

carinhos de urso que me dá ... Tenho muito orgulho de vocês. Obrigada por tudo sempre.

Agradeço também ao meu namorado Fernando... Sou extremamente grata por tudo; Você é meu companheiro, meu amigo, meu amor, meu ouvinte. Quero agradecer à você por ser essa pessoa maravilhosa e me ajudar tanto. Agradeço à você por respeitar e colocar meu estudo em primeiro lugar. Fico muito feliz por me sentir tão apoiada em todos meus projetos e saiba que sou muito realizada em ter você na minha vida. Agradeço também por ter me ajudado no trabalho montando as fórmulas e organizando a planilha gigantee com todos os dados desse trabalho, se não fosse você estava perdida....Amo você.

Agradeço também às minhas amigas que estiveram presentes durante essa fase do mestrado e me deram tantas palavras de apoio e incentivo. Agradeço à Gabi, Cris, Carol, Ju, Telminha, Dil, Marina, Help, Lyfna... Minhas amigas que amo e foram fundamentais nessa etapa. Além dos outros amigos maravilhosos que me acompanham na minha vida, por todas as histórias, risadas, diversões, e apoios nas fases mais difíceis que foram superadas e permitiram chegar ao final dessa etapa.

Ao meu orientador Kléber, agradeço muito por me aceitar como sua primeira aluna e permitir que eu realizasse esse sonho de fazer o mestrado. Agradeço à você pelo voto de confiança, atenção, por suas correções, suporte e incentivo. Desde que me tornei sua aluna, sei que muita coisa mudou em sua vida, e mesmo com toda correria e muito trabalho, não desistiu de mim e sou muito agradecida por isso. Tenho grande admiração por você e orgulho em ser sua aluna!!

À Dra Maria Laura por me proporcionar esse conhecimento lindo que é a patologia da pré-eclâmpsia. Patologia sempre foi uma das disciplinas que mais me encantaram e essa doença é tão complexa e interessante que me apaixonei pelo assunto, e espero que esse trabalho possa colaborar, de alguma forma, para o entendimento e cuidado com essa doença. Agradeço muito a você pela oportunidade de desenvolver esse projeto, e pelo cuidado e atenção em todas as dúvidas.

Ao Dr. Fernando Costa, meu chefe e coorientador, por permitir que eu fizesse esse trabalho simultaneamente às minhas atividades funcionais. Agradeço muito pela oportunidade e toda a sua exigência, que me estimulam a tentar melhorar. Tenho uma grande admiração pelo senhor.

Agradeço também à todos do laboratório que, durante esses 7 anos que estou lá, contribuíram enormemente para meu crescimento profissional e pessoal. Prefiro não citar nomes para não esquecer ninguém, já que muitos que passaram ou que ainda estão lá foram e são muito especiais e importantes para mim. Agradeço pela companhia, ajuda e amizade.

Quero agradecer principalmente à Dulcinéia, por ser a pessoa que mais me estimula dentro do laboratório. Agradeço por todo o incentivo e confiança que sempre teve em mim. Obrigada por sempre me colocar novos desafios, dar broncas quando preciso e todo carinho e atenção que tem comigo sempre. Obrigada por tudo que me ensinou e que permitiu que esse trabalho fosse realizado. Inspiro-me muito em você tanto profissional como pessoalmente.

Agradeço também muito, muitooo às meninas, Dil e Telma que são minhas companheiras, amigas e me ajudam sempre em tudo!! Obrigada pela companhia e conversas no café da manhã, por ouvirem meus desabafos e estarem sempre presentes. Obrigada por tudo!!

Agradeço também à Letícia e à Marina pela ajuda nas extrações de DNA, e à Regiane, por vários conhecimentos que me passou, assim como as músicas super afinadas nas manhãs mais desanimadas.

Por fim, agradeço por tudo à todos que participaram de alguma forma para que eu pudesse chegar aqui finalmente em mais uma etapa das muitas que ainda desejo realizar. Sou muito feliz por estar na área que amo e ter conquistado tantos degraus na minha vida.

A pedra

O distraído, nela tropeçou, o bruto a usou como projétil,

o empreendedor, usando-a, construiu o campônio

Cansado da lida, dela fez assento...

... Para os meninos foi brinquedo,

Drummond a poetizou ... Davi matou Golias...

O artista concebeu a mais bela escultura.

“Por fim”

Em todos os casos, a diferença não era a pedra. .

..Mas o homem.

Antonio Pereira-Apon

RESUMO

A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e neonatal no mundo, porém a sua fisiopatologia ainda não foi totalmente elucidada, sendo considerada uma síndrome com acometimento multisistêmico e etiologia multifatorial. O fator genético tem sido bastante estudado, com associação dos polimorfismos de nucleotídeo único em genes que codificam a óxido nítrico sintase e as metaloproteases de matriz com pré-eclâmpsia, porém os resultados foram inconclusivos em diferentes populações. Investigamos a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *eNOS* (894G>T, -786T>C, e um número variável de repetições em *tandem* VNTR no íntron 4), *MMP2* (-1306C>T) e *MMP9* (-1562C>T) em pacientes com pré-eclâmpsia do sudeste brasileiro. Nesse estudo caso-controle, foram incluídas 77 mulheres com pré-eclâmpsia e, como controles, 266 mulheres grávidas normotensas e sem comorbidades. Os dados clínicos foram coletados para avaliar os fatores de risco e a presença de complicações graves, tais como a eclâmpsia e síndrome HELLP. Encontramos a associação significativa entre o polimorfismo de nucleotídeo único *eNOS* -786T>C e a ocorrência de pré-eclâmpsia, independentemente da idade, altura, peso ou dos outros SNPs estudados, e não foi encontrada associação com os outros polimorfismos. Idade e antecedente de pré-eclâmpsia também foram identificados como fatores de risco. A presença de pelo menos um alelo polimórfico para *eNOS* -786T>C também foi associado com a ocorrência de eclâmpsia ou síndrome HELLP entre as mulheres com pré-eclâmpsia. Nossos dados confirmaram que o SNP *eNOS* -786T>C está associado à pré-eclâmpsia e à gravidade das suas complicações.

Palavras Chave: Pré-eclâmpsia, Síndrome HELLP, Eclâmpsia, Óxido Nítrico, Metaloproteínas da Matriz, Polimorfismo Genético

ABSTRACT

Preeclampsia is one of the leading causes of maternal and neonatal morbidity and mortality in the world, but its pathophysiology has not been entirely elucidated. Genetic studies have associated single nucleotide polymorphisms in genes encoding nitric oxide synthase and matrix metalloproteases with preeclampsia, but the results are largely inconclusive across different populations. The current study aimed to investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *eNOS* (894G>T, -786T>C, and a variable number of tandem repetitions VNTR in intron 4), *MMP2* (-1306C>T), and *MMP9* (-1562C>T) genes with preeclampsia in patients from Southeastern Brazil. This prospective case-control study enrolled 77 women with preeclampsia and 266 control pregnant women. Clinical data were collected to assess risk factors and the presence of severe complications, such as eclampsia and HELLP syndrome. We found a significant association between the single nucleotide polymorphism *eNOS* -786T>C and preeclampsia, independently from age, height, weight, or the other SNPs studied, and no association was found with the other polymorphisms. Age and history of preeclampsia were also identified as risk factors for development of preeclampsia. The presence of at least one polymorphic allele for *eNOS* -786T>C was also associated with the occurrence of eclampsia or HELLP syndrome among preeclamptic women. Our data support that the *eNOS* -786T>C SNP is associated with preeclampsia and the severity of its complications.

Keywords: Preeclampsia, HELLP Syndrome, Eclampsia, Oxide Nitric, Matrix Metalloproteinases, Polymorphism, Genetic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica do eNOS 894G>T.....	46
Figura 2: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica do eNOS-786T>C.....	46
Figura 3: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica da MMP2 -1306C>T.....	47
Figura 4: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica da MMP9 -1562C>T.....	47
Figura 5: Eletroferograma de genotipagem em sequenciador automático com os perfis dos genótipos encontrados, no VNTR do intron 4 do gene da eNOS.....	49
Figura 6: Distribuição genotípica dos polimorfismos no gene da eNOS (-786T>C e 894 G>T).....	52
Figura 7: Distribuição genotípica dos polimorfismos no gene MMP9 -1562C>T e MMP2 -1306C>T.....	52
Figura 8: Gráfico de distribuição do Polimorfismo eNOS -786T>C associado à gravidade.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de Mississippi para subtipos de síndrome HELLP	21
Tabela 2: Sequência dos primers utilizados na identificação dos polimorfismos.....	43
Tabela 3 Tamanhos dos fragmentos obtidos por PCR e após clivagem por enzima de restrição, e enzima utilizada para cada polimorfismo.....	44
Tabela 4 – Frequência dos genótipos para o polimorfismo <i>ENOS</i> - 894G>T, -786T>C, <i>MMP2</i> -790T>G, -1306C>T e <i>MMP9</i> -1562C>T. ND, não determinado.....	51
Tabela 5 – Frequência dos genótipos para o VNTR no íntron 4 do gene da eNOS.....	53
Tabela 6 – Frequência dos alelos maiores e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	53
Tabela 7- Análise de dados maternos (sócio-demográficos e clínicos).....	54
Tabela 8- Comparação dos dados maternos entre gestantes controles e com pré-eclâmpsia.....	56
Tabela 9: Comparação dos dados materno-fetais entre gestantes controles e com pré-eclâmpsia.....	56
Tabela 10 – <i>Odds ratio</i> e intervalos de confiança de 95% para fatores de risco para pré-eclâmpsia na população estudada em análise univariada.....	57
Tabela 11: Comparação entre estudos de associação genética com pré-eclâmpsia para o polimorfismo <i>eNOS 894T>G</i>	61
Tabela 12: Comparação entre estudos de associação genética com pré-eclâmpsia para o polimorfismo <i>eNOS -786T>C</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT- Alanina aminotransferase

AST- Aspartato aminotransferase

CAISM- Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

eNOS- Óxido Nítrico Sintase Endotelial

CIVD - Sangramento e coagulação intravascular disceminada

HELLP- Hemolysis, Elevated Liver Enzymes, and Low Platelets (hemólise, enzimas hepáticas aumentadas e plaquetopenia)

IC- Intervalo de Confiança

IG- Idade Gestacional

IMC- Índice de Massa Corporal

LDH- Lactato Desidrogenase

MMP -Metaloproteinase de Matriz Extracelular

NO- Óxido Nítrico

OR- *Odds ratio* (razões de chance)

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PE- Pré-eclâmpsia

RFLP- Restriction fragment length polymorphism

RPM- rotações por minute

SNP- Polimorfismo de nucleotídeo único

RN- Recém-nascido

ROS- Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)

TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VNTR - Variation Number of Tandem Repeat (Número Variável de Repetições em Tandem)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Pré-Eclâmpsia.....	17
1.2	Eclâmpsia.....	19
1.3	Síndrome HELLP.....	20
1.4	Pré-eclâmpsia superajuntada.....	22
1.5	Fatores de Risco para Pré-eclâmpsia.....	22
1.6	Etiologia da Pré-eclâmpsia.....	24
1.7	Fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	27
1.8	Outras Complicações	30
1.9	Predisposição genética à pré-eclâmpsia.....	31
1.9.1	Óxido nítrico sintase endotelial.....	31
1.9.2	Metaloproteinases de matriz extracelular.....	33
2.	JUSTIFICATIVA.....	35
3.	OBJETIVOS.....	36
3.1.	Objetivo Geral.....	36
3.2.	Objetivos Específicos.....	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1.	Tipo de estudo e planejamento estatístico.....	37
4.2	Seleção de sujeitos para pesquisa.....	37
4.3	Variáveis avaliadas.....	38
4.3.1	Variáveis Independentes.....	38
4.3.2	Variável dependente: Pré-eclâmpsia.....	38
4.3.2	Variáveis de controle.....	39
4.4	Coleta de dados.....	40
4.5	Aspectos éticos.....	41
4.6	Genotipagem.....	41
4.6.1	Extração do DNA genômico.....	41
4.6.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	42
4.6.3	Determinação genotípica.....	43
4.6.4	RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism.....	49

4.6.5	Sequenciamento automático.....	45
4.6.6	Análise de Fragmentos em sequenciador automático.....	48
4.7	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS.....	50
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9	APÊNDICE.....	77
9.1.	Check List.....	77
9.2.	Ficha para coleta de dados.....	78
9.3	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	83
10	ANEXO.....	81
10.1	Aprovação do comitê de ética.....	81
10.2	Artigo Publicado.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pré-eclâmpsia

As complicações decorrentes das síndromes hipertensivas na gestação estão entre as mais significativas causas de morbidade e mortalidade materna e perinatal, em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento(1). A hipertensão arterial acomete cerca de 9% de todas as gestações, sendo a pré-eclâmpsia pura ou superajuntada responsável por 2 a 3% dessas complicações (2-3). Segundo dados de Duley em 2009 (1) acontecem por ano cerca de 76.000 mortes maternas e 500.000 mortes perinatais relacionadas à pré-eclâmpsia em todo o mundo. Já no Brasil a partir de dados do Sistema Único de Saúde (SUS), estima-se o número de uma morte ao dia devido as complicações da pré eclampsia(4).

Segundo uma nova diretriz do Colégio Americano de Ginecologia e Obstetrícia de 2013 (5), define-se pré-eclâmpsia à partir do diagnóstico clínico, em mulheres com 20 ou mais semanas de gestação ou puérperas, com surgimento de hipertensão arterial (níveis pressóricos sistólicos superiores a 140mmHg ou diastólicos superiores a 90mmHg em pacientes previamente normotensas) e proteinúria com valor superior a 300mg em 24 horas ou mais que uma cruz na fita urinária. Segundo essa mesma diretriz, o diagnóstico de pré-eclâmpsia na ausência de proteinúria pode ser feito na presença de hipertensão em conjunto com evidências da pré-eclâmpsia grave, como pressão sistólica acima de 160mmHg ou diastólica acima de 110mmHg, trombocitopenia, disfunção hepática, desenvolvimento de insuficiência renal, edema pulmonar, distúrbios cerebrais ou visuais de início recente.

A maioria dos casos de pré-eclâmpsia ocorre de forma tardia nas últimas semanas de gravidez, no entanto, 10% dos casos ocorrem precocemente, antes de 34 semanas de gestação tendendo a ser mais grave do que a pré-eclâmpsia tardia (6).

A pré-eclampsia pode apresentar evolução para gravidade ou já abrir o quadro clínico com doença grave, como a eclâmpsia e a síndrome HELLP, responsáveis por alta mortalidade. De acordo com o Manual Técnico das Gestações

de Alto Risco do Ministério da Saúde de 2012 (7), considera-se grave o quadro de pré-eclâmpsia quando presente um ou mais dos seguintes critérios:

- Pressão arterial diastólica igual/maior que 110mmHg
- Proteinúria igual/maior que 2,0g em 24 horas ou 2+ em fita urinária
- Oligúria (menor que 500ml/dia, ou 25ml/hora)
- Níveis séricos de creatinina maiores que 1,2mg/dL
- Sinais de encefalopatia hipertensiva (cefaleia e distúrbios visuais)
- Dor epigástrica ou no hipocôndrio direito
- Evidência clínica e/ou laboratorial de coagulopatia
- Plaquetopenia ($<100.000/\text{mm}^3$)
- Aumento de enzimas hepáticas (AST, ALT), LDH e de bilirrubinas
- Presença de esquizócitos em esfregaço de sangue periférico

Outros sinais que podem sugerir o diagnóstico são:

- Acidente vascular cerebral
- Sinais de insuficiência cardíaca ou cianose
- Presença de restrição de crescimento intrauterino e/ou oligoidrânio

Uma das características importantes dessa doença é que causa grande preocupação é a sua imprevisibilidade, já que mesmo em casos leves ou moderados e com proteinúria mínima, a progressão para as formas graves pode ocorrer de maneira súbita.(8)

Considerando o impacto da pré-eclâmpsia e suas complicações, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos na tentativa de caracterizar sua fisiopatologia, fatores de risco, prevenção e tratamento. A pré-eclâmpsia se mantém como uma das principais causas de mortalidade materna, embora a morbidade tenha diminuído sensivelmente, com avanços marcantes quanto ao tratamento e seguimento, em especial nos países de alta renda (9).

A pré-eclâmpsia é conhecida como “doença das teorias”, já que existem diversas hipóteses sobre qual seria seu gatilho desencadeador, além de vários estudos sobre o assunto sem que se tenha conseguido identificar com precisão sua etiologia. Diversas linhas de pesquisas surgiram ao longo do tempo com intuito de entender melhor a pré-eclâmpsia e sua origem, porém, o que se sabe hoje é que cada uma explica parcialmente os eventos dessa tão importante doença, levando a crer que não há apenas um mecanismo envolvido em sua base etiológica e sim vários (10).

1.2 Eclâmpsia

Eclâmpsia é a condição clínica grave caracterizada por uma ou mais convulsões generalizadas e/ou coma em pacientes com diagnóstico prévio de pré-eclâmpsia, na ausência de patologia neurológica diagnosticada (11). É mais frequente em mulheres de origem étnica não caucasiana, nulíparas e idade inferior a 20 anos, com incidência de 4-5 casos por 10.000 nascidos vivos em países desenvolvidos e grande variação entre os países em desenvolvimento, com 6 a 100 casos por 10.000 nascidos vivos (12). No Brasil, a taxa elevada de morbidade e mortalidade materna está associada à eclâmpsia em cerca de 8,1 - 22,0% nas regiões de baixa renda, com cerca de 0,2 - 0,8% comparada com as regiões de renda mais alta (13). Para taxa de letalidade de eclâmpsia (razão entre número de mortes e número de casos) encontramos um intervalo de 0-1,8% em países de alta renda e de até 17,7% na Índia, enfatizando uma enorme lacuna na qualidade da atenção à saúde materna segundo os padrões sociais e econômicos (14).

A etiologia precisa da manifestação clínica de convulsões não está esclarecida, sendo sugerida a ocorrência de vaso-espasmo com isquemia local, encefalopatia hipertensiva, com edema vasogênico e dano endotelial (15).

O reconhecimento das convulsões em gestantes e o termo eclâmpsia precedeu o prefixo "pré" por milênios. Segundo Chesley (2010) a eclâmpsia pode ter sido relatada há cerca de 4.000 anos em tratados da Grécia, Índia e China. Chesley também cita a origem do nome eclâmpsia que é derivado do grego "*eklamps*", que significa "relâmpago", possivelmente aludindo à forma repentina e inesperada das convulsões presentes nessa complicação (16).

Na maioria das vezes, o quadro se instala de maneira súbita sem apresentação de sinais ou sintomas premonitórios. Quando esses ocorrem, a gestante pode apresentar dor de cabeça intensa, embaçamento visual ou epigastria (sinais de alerta que caracterizam iminência de eclâmpsia). A eclâmpsia também pode ocorrer no puerpério imediato ou, mais raramente, nas primeiras 48 horas. (17). Cerca de um terço ou mais dessas pacientes com eclâmpsia pós-parto não havia apresentado sinais ou sintomas da pré-eclâmpsia anteriormente (17-18).

Uma vez instalado o quadro de eclâmpsia, a conduta clínica visa a estabilização do quadro através do tratamento das convulsões, da hipertensão, dos distúrbios metabólicos e, quando ocorre antes do parto, também é realizada a avaliação das condições de bem-estar fetal e antecipação do parto. A terapia para prevenção de convulsões recorrentes nas gestantes com eclâmpsia, assim como para prevenir o surgimento na pré-eclâmpsia, é feita com sulfato de magnésio que, em comparação com os demais anti-convulsivantes, apresenta uma maior efetividade na prevenção de eclâmpsia (7). Diuréticos não são usados rotineiramente porque aumentam a hipovolemia materna e podem piorar a perfusão uteroplacentária (19).

1.3 Síndrome HELLP

O acrônimo HELLP, que dá nome à síndrome inicialmente descrita em 1954 por Pritchard (20), é composto pelas iniciais em inglês dos componentes da síndrome: H corresponde à hemólise, EL correspondem à elevação das enzimas hepáticas (do inglês elevated liver enzymes) e LP correspondem à plaquetopenia (do inglês low platelets).

A triagem laboratorial básica para investigação da gravidade para as gestantes com pré-eclâmpsia é composta por hemograma completo com contagem de plaquetas, urinálise com exame do sedimento urinário, creatinina sérica, lacto desidrogenase (LDH), ácido úrico, bilirrubinas e transaminases (7). Confirma-se o critério de hemólise na síndrome HELLP pela detecção de níveis de enzima LDH superiores a 600U/L e esfregaço de sangue periférico com identificação de esquizócitos. O aumento de enzimas hepáticas se confirma com níveis de aspartato aminotransferase (AST) superiores a 70U/L, e plaquetopenia, com contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³.

Essa síndrome pode ser agrupada laboratorialmente em subtipos de acordo com a classificação de Mississippi, como vemos na tabela abaixo adaptada de Satpathy e colaboradores (21).

Tabela 1. Classificações de Mississippi para subtipos de síndrome HELLP.

Classificação Mississippi
Classe 1: Plaquetas < 50.000/mm³ AST ou ALT > 70 U/L LDH >600 U/L
Classe 2: Plaquetas 50.000 a 100.000/mm³ AST ou ALT >70 U/L LDH >600 U/L
Classe 3 : Plaquetas 100.000 a 150.000/mm³ AST ou ALT >40 U/L LDH > 600 U/L

Diferentemente da eclâmpsia, a síndrome HELLP é mais frequente em mulheres de origem étnica caucasiana, multíparas e com idade superior a 35 anos. É uma emergência hipertensiva que requer, na maioria das vezes, a interrupção imediata da gestação. Sua gravidade é diretamente proporcional à idade gestacional e à gravidade das alterações laboratoriais e clínicas (22). Esse quadro aumenta os riscos de mortalidade perinatal e materna geralmente por sangramento e coagulação intravascular disceminada (CIVD), rotura hepática, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, acidente vascular cerebral e trombose (23).

Cerca de 0,17 - 0,85% de todas as gestações são acometidas por HELLP, sendo que 70% dos casos ocorrem antes do parto e, na maioria das vezes, entre 27 e 37 semanas (24).

A patogênese da síndrome ainda é desconhecida, porém uma série complexa de eventos se inicia no fígado por deposição de fibrina intravascular, com

obstrução e hipovolemia. Posteriormente ocorrem isquemia hepática, infarto, hematomas e/ou hemorragias, podendo resultar na rotura hepática (25).

1.4 Pré-eclâmpsia superajuntada

A hipertensão crônica da gestação acontece quando existe o diagnóstico de níveis pressóricos aumentados antes da gestação, anteriormente à primeira metade da gestação. Nessas gestantes, a pré-eclâmpsia também pode se desenvolver, ao que se dá o nome de pré-eclâmpsia superajuntada, ou sobreposta (22).

A pré-eclâmpsia superajuntada é caracterizada, além da hipertensão, pela presença de proteinúria após a vigésima semana de gestação. Assim como a piora súbita do quadro hipertensivo, o aparecimento de trombocitopenia ou de níveis aumentados de transaminases também podem indicar provável desenvolvimento de pré-eclâmpsia (26).

Cerca de 15 a 25% das gestantes hipertensas podem ser acometidas pela pré-eclâmpsia, e a incidência de complicações fetais, tais como prematuridade, hemorragia intraventricular e morte perinatal, aumentam sensivelmente (22, 26).

1.5 Fatores de Risco para Pré-eclâmpsia

Várias características podem aumentar o risco de pré-eclâmpsia, tais como idade, paridade, histórico familiar, gravidez múltipla, histórico de pré-eclâmpsia em gestação anterior, bem como condições médicas pré-existent.

Mulheres acima dos 40 anos apresentam risco duas vezes maior de desenvolvimento de pré-eclâmpsia do que gestantes mais jovens, sendo que, a partir dos 34 anos, o risco aumenta 30% a cada ano (27). Gestantes adolescentes tem chances maiores de desenvolver algumas intercorrências durante a gestação, incluindo a pré-eclâmpsia, com morbidade maior em menores de quinze anos. Há pesquisadores que argumentam que a exclusão de diversos fatores confundidores na maioria das pesquisas realizadas até hoje pode demonstrar que a idade não esteja diretamente associada com a sua ocorrência. (28).

Estudos epidemiológicos apoiam o conceito de que a má adaptação materna ao antígeno paterno fetal está intimamente relacionada ao desenvolvimento

da pré-eclâmpsia. Essa má adaptação imune poderia determinar a resposta materna inadequada aos antígenos fetais oriundos do DNA paterno, e seria o mecanismo chave do desencadeamento do processo fisiopatológico da doença. O risco seria aumentado em mulheres com exposição limitada à diferentes fontes de espermatozoides antes da concepção, o que justificaria, em parte, o risco aumentado em adolescentes (28).

Carderon & Carbajal (27) demonstraram que mulheres acometidas por pré-eclâmpsia em sua primeira gestação têm sete vezes mais chances de desenvolver a doença na sua segunda gestação. Outro trabalho demonstrou que o risco recorrente de desenvolver pré-eclâmpsia em uma próxima gestação é em torno de 14% (30), dados que são corroborados pela metanálise de Van Oostwaard (31), que calculou o risco de recorrência de síndromes hipertensivas. Nesse estudo, foi demonstrada uma recorrência de 13,8% para pré-eclâmpsia (IC 95%, 13,6-14,1%) e de 0,2% para síndrome de HELLP (95% CI, 0,16-0,25%).

Duckitt & Harrington (28,30) também demonstraram que mulheres que desenvolveram a doença nas duas primeiras gestações tiveram chance de 32% de serem acometidas em sua terceira gestação. O mesmo ocorreu para as gestantes normotensas na primeira gestação e que desenvolveram pré-eclâmpsia na segunda gestação, onde a porcentagem de desenvolvimento da doença aumentou para 16% na terceira gravidez e 29% na quarta gravidez. Já a gestante que não apresentou a doença na primeira gestação, e não trocou de parceiro, o risco diminuiu para cerca de 1%.

A história familiar como risco de pré-eclâmpsia já foi evidenciada em diversos trabalhos (10, 27-29), demonstrando que, possivelmente, existe um forte papel genético atuante. Segundo Junior e colaboradores (2008), o histórico familiar positivo aumenta em três vezes as chances de apresentar a doença.

Para as gestantes filhas ou irmãs de mulheres que também foram acometidas pela doença o risco também aumenta cerca de duas vezes (27).

De acordo com alguns estudos, a origem do risco aumentado para pré-eclâmpsia pode ser tanto materna, quanto paterna. Isso pode ser observado pelo risco aumentado em duas vezes de pré-eclâmpsia na gestação da mulher cujo parceiro também nasceu de uma gestação com pré-eclâmpsia (32). Lie e colaboradores (33) relataram que o cônjuge masculino cuja parceira anterior teve

uma gestação que resultou em pré-eclâmpsia gera um risco 80% maior de desenvolvimento da doença na nova parceira.

Condições médicas pré-existent também favorecem pré-eclâmpsia: insuficiência vascular, *diabetes mellitus*, lúpus eritematoso sistêmico e doença renal aumentam o risco de placentação anormal (34-35). Condições obstétricas que resultam em isquemia relativa também figuram nessa lista, pois cursam com aumento da massa placentária, tais como ocorre na mola hidatiforme, nas gestações múltiplas, e casos de hidropsia fetal (36). Além dessas, a obesidade também tem grande associação com a pré-eclâmpsia que, por sua vez, tem sua incidência duplicada quando a massa corporal pré-gestacional aumenta cerca de 5 a 7 kg/m².

Alguns fatores sócio-ambientais também foram relacionados com o risco de desenvolvimento da doença. No trabalho de Ziegel e Cranley (37), foi relatado que gestantes em condições sócio-econômicas menos favorecidas e má nutrição também têm predisposição ao surgimento da pré-eclâmpsia, apoiando uma base nutricional para a doença.

Contrariando as expectativas, alguns estudos indicaram que o consumo de cigarros durante a gravidez está associado com uma redução na incidência de pré-eclâmpsia. Porém, os mesmos também demonstraram que apesar deste fator indicativo de proteção para as tabagistas, o risco de morbidade e mortalidade perinatal dessas gestantes aumenta significativamente uma vez acometidas pela doença, quando comparadas às não-fumantes (38 -39).

1.6 Etiologia da Pré-eclâmpsia

A compreensão de como a pré-eclâmpsia gera os sintomas maternos e fetais observados na doença ainda não está clara e tem sido alvo de inúmeros estudos. Identificou-se possível associação com fatores angiogênicos (40) e também a hipótese de mediação imunológica é considerada, já que a pré-eclâmpsia é mais prevalente entre primigestas e em mulheres que engravidam de um novo parceiro (41). Existem diversas outras hipóteses abordando má adaptação genética, reação inflamatória, disfunção endotelial, alterações placentárias, estresse oxidativo e predisposição genética. Nenhuma delas pode ser excluída e possivelmente há uma complementação entre elas (40-42).

Wegman e colaboradores (42) demonstraram que na gestação de evolução normal ocorre alteração na resposta inflamatória para que ocorra com sucesso a implantação do embrião, e levantaram a hipótese que uma falha na mudança do perfil da reação inflamatória poderia ser uma das origens das alterações que desencadeiam a pré-eclâmpsia. Outro trabalho da mesma época demonstrou que tanto os granulócitos, quanto os monócitos, estão muito aumentados no plasma das mulheres com pré-eclâmpsia quando comparadas às gestações sem pré-eclâmpsia e às mulheres não grávidas, em uma analogia ao que ocorre em doentes sépticos internados em terapia intensiva. Demonstraram que, mesmo na gestação sem pré-eclâmpsia, a concentração de células inflamatórias é superior ao encontrado em mulheres não grávidas, sugerindo que a gravidez, por si só, já seria um estado inflamatório e que a pré-eclâmpsia poderia ser piora dessa reação inflamatória, contribuindo para disfunção endotelial sistêmica. (43).

Quanto à hipótese da incompatibilidade genética, estudos epidemiológicos mostraram uma possível origem genética da pré-eclâmpsia baseados no aumento de risco em pessoas com história familiar positiva da doença (10).

Também foi descrita associação entre placentação anormal e desenvolvimento de pré-eclâmpsia, em que há déficit na diferenciação do citotrofoblasto e invasão inadequada do sinciciotrofoblasto, impedindo o remodelamento das arteríolas espiraladas de forma apropriada, causando diminuição na perfusão placentária (44).

Os trofoblastos são células que surgem da diferenciação dos blastocistos, entre eles estão os sinciciotrofoblastos, que formam uma massa celular multinucleada, e mais internamente os citotrofoblastos, que se mantêm uninucleados (45). Estas células trofoblásticas são extremamente invasivas e, através de interações envolvendo receptores e integrinas do trofoblasto, eles se ligam aos componentes da matriz extracelular do endométrio, resultando em apoptose das células epiteliais e permitindo a penetração e fixação do embrião no endométrio até atingir glândulas e vasos sanguíneos da porção do miométrio no útero. Na pré-eclâmpsia, as células trofoblásticas têm suas propriedades invasivas alteradas (45).

Existem diversas mudanças fisiológicas da gestação, entre elas, está a modificação da estrutura vascular dentro do útero, com o desenvolvimento de uma

neovascularização com redistribuição do fluxo sanguíneo e aumento do volume sanguíneo (46).

A principal alteração se dá na transformação das artérias espiraladas, que se originam da ramificação artérias radiais provenientes de ramificações das artérias arqueadas. Como o próprio nome diz, as artérias espiraladas, tem um formato de espiral, próprio para acompanhar a distensão do útero durante a gestação e função é fornecer sangue para a camada funcional do endométrio superior. Durante a gestação ocorre a invasão das artérias espiraladas por células trofoblásticas, tanto na porção superficial (decídua), quanto da porção um pouco mais profunda (miométrio) (46).

Os trofoblastos invadem a parede vascular, sofrem pseudovasculogênese e assumem um fenótipo endotelial destruindo o endotélio vascular, convertendo as artérias espiraladas de diâmetro pequeno em vasos de grande calibre, resultando em um aumento no volume de sangue para câmara intervilositária (48). Essa perfusão aumentada se dá pela transformação da túnica muscular lisa arterial, que se torna pouco responsiva e insensível aos elementos vasoativos após a substituição do endotélio vascular materno por citotrofoblastos extravilosos (47). O remodelamento dessas artérias resulta na formação de um sistema local de baixa resistência arteriolar que é essencial para aumentar o suprimento sanguíneo e desenvolvimento e crescimento do feto (49).

De acordo com Bell (50), na década de 60, vários grupos descreveram mudanças significativas na placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia, por meio de análise de biópsias de placenta, verificou-se que as células trofoblásticas não invadiam de forma eficiente as artérias espiraladas maternas. Porém, foi observado em gestantes com pré-eclâmpsia que o segmento do miométrio da artéria espiralada não sofre a transformação fisiológica durante o terceiro trimestre, ocasionando uma placentação superficial, que provavelmente resulta na doença (48). Segundo Cavalli e colaboradores (49), somente cerca de 30 a 50 % das artérias espiraladas do útero sofrem a invasão do trofoblasto na pré-eclâmpsia, tornando o diâmetro das artérias reduzido quando comparado ao encontrado na gravidez normal.

Segundo Meekins (51), 56% das artérias espiraladas são invadidas pelos trofoblastos extravilosos na porção decidual. Na porção do miométrio 76% são invadidas, sendo que essa invasão diminui significativamente para 18% nas

gestações com pré-eclâmpsia, conservando a vasoconstrição comum das artérias e impedindo uma resposta adequada à demanda do fluxo sanguíneo necessário na gestação, resultando na isquemia da placenta.

O fator causador desses eventos ainda não está totalmente elucidado. É possível que a falha da invasão trofoblástica se dê através de algum efeito nocivo sobre os trofoblastos, que falham na transformação arterial, desencadeando os eventos já descritos na fisiopatologia da doença.

Uma nova hipótese foi proposta por Huppertz (52), onde a pré-eclâmpsia seria uma doença de início precoce, anterior à falha da invasão trofoblástica, em que algum insulto resultaria em desenvolvimento e diferenciação aberrante do trofoblasto extraviloso, provocando uma manutenção deficiente da barreira placentária e, posteriormente, levando à liberação de fragmentos de trofoblastos em necrose e apoptose, gerando uma resposta inflamatória sistêmica na mãe. Essa diferenciação aberrante separaria a pré-eclâmpsia da fisiopatologia de outras complicações da gravidez, tais como a restrição de crescimento intrauterino, infartos placentários e descolamento prematuro da placenta, que estariam relacionados diretamente à falha de invasão trofoblástica.

1.7 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

Durante a gestação normal, existe um aumento do volume sanguíneo, para permitir a nutrição da placenta e do feto. Na gestação, o volume plasmático aumenta em relação à massa eritrocitária, ocasionando níveis baixos do hematócrito, ocorrendo também aumento da frequência e débito cardíaco, além de resistência vascular periférica diminuída devido à liberação de vasodilatadores. A diminuição da resistência vascular acarreta, portanto, diminuição da pressão arterial e hipovolemia relativa. Já na pré-eclâmpsia, esses eventos fisiológicos não ocorrem, resultando em hipertensão (53).

A hipertensão arterial é consequência do aumento da resistência vascular periférica e hiperatividade à agentes vasoconstritores, especialmente a angiotensina II, que não permite a vasodilatação e a refratariedade vascular normais da gestação (22).

Apesar da hipertensão ser hoje um dos mais importantes sinais para o diagnóstico da pré-eclâmpsia, ela não foi sempre associada à doença. Inicialmente,

outros distúrbios, tais como convulsões, dores epigástricas e alterações visuais caracterizavam a doença, sintomas esses que estão relacionados às suas formas mais graves.

Mesmo sendo tão importante, a hipertensão durante a gestação só foi relatada como sinal principal para diagnóstico da pré-eclâmpsia a partir de 1896, com a introdução do manômetro de mercúrio de Scipione Riva Rocci, utilizado para medir a pressão arterial, e sua inclusão na prática clínica. Isso possibilitou reconhecer a pré-eclâmpsia como uma doença com importante base hipertensiva (54).

A pré-eclâmpsia parece começar na placenta, porém pode-se dizer que o órgão-alvo é o endotélio materno, em que danos generalizados ao endotélio dos rins, do fígado, e do cérebro provavelmente geram a liberação de fatores vasopressores da placenta doente (55).

Devido à invasão trofoblástica defeituosa, ocorre a diminuição do fluxo sanguíneo, resultando em períodos de isquemia e reperfusão, criando um ambiente hipóxico que favorece o estresse oxidativo, com consequente dano oxidativo e inflamação (56).

Todo evento isquêmico é marcado por produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, gerando um excesso de radicais livres. Fisiologicamente, a sinalização das espécies reativas de oxigênio é diretamente controlada por defesas antioxidantes que as eliminam (57) o que não ocorre de maneira eficaz na pré-eclâmpsia. A produção de ROS é caracterizada pela geração de moléculas superóxido, que, em situações de capacidade tecidual antioxidativa ausente ou insuficiente como ocorre na doença, desencadeiam uma cascata de eventos com maior produção de ROS e peroxidação lipídica, caracterizando o estresse oxidativo (58).

O tecido placentário, principalmente o sinciotrofoblasto, possui pouca capacidade antioxidativa. Isso resulta em maior atividade de apoptose e necrose, liberando, na circulação materna, grande quantidade de material sincicial, fatores angiogênicos e restos celulares. Todas essas moléculas provocam ativação de leucócitos, geram estímulos para maior adesão plaquetária, diminuição do óxido nítrico, vasoconstrição e resposta inflamatória sistêmica (58).

Ao restabelecer o fluxo sanguíneo, citocinas e outros fatores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-

10 (IL-10), proteína C reativa e ânion superóxido são liberados em resposta à esses eventos, resultando em um estado inflamatório capaz de lesar diretamente o endotélio e promover ativação de neutrófilos (57).

Portanto, a pré-eclâmpsia parece ocorrer em duas fases: a primeira com implantação e a placentação inadequadas, induzindo reduzida perfusão útero-placentária com consequente hipóxia tecidual e estresse oxidativo, desencadeando a liberação de fatores antiangiogênicos na circulação materna, acarretando reação inflamatória sistêmica; a segunda fase ocorre a partir de uma disfunção endotelial generalizada, responsável pela síndrome hipertensiva (59).

Os rins são um dos órgãos mais afetados na pré-eclâmpsia, apresentando lesão endotelial grave e endoteliose glomerular com depósitos subendoteliais de fibrina, que diminuem a área de superfície de filtração glomerular (55). O resultado é proteinúria, um dos sinais principais da pré-eclâmpsia, cujos níveis estão diretamente relacionados ao pior prognóstico materno e perinatal e ao maior risco de desenvolver complicações (60-62).

Na maioria das vezes a proteinúria pode ser detectada, em média, de três a quatro semanas antes da piora do quadro clínico, o que pode permitir controle terapêutico e seguimento mais adequado (63).

Young e colaboradores (55) relataram que a análise patológica dos órgãos de mulheres que sofrem de pré-eclâmpsia e eclâmpsia mostraram um quadro de hipoperfusão generalizada, em que o fígado e glândulas adrenais apresentaram com frequência, infarto, necrose e hemorragia intraparenquimatosa, e o coração pode revelar necrose endomiocárdica.

Há também ativação da coagulação e, em especial, um aumento da função plaquetária, com formação de microtrombos que favorecem o aparecimento de hemólise microangiopática característica da síndrome HELLP. Além disso, o volume plasmático encontra-se reduzido devido à perda de fluido para o espaço extravascular, levando ao comprometimento do fluxo sanguíneo nos órgãos (36).

Sabe-se que a pré-eclâmpsia resolve-se somente após a retirada da placenta, porém existem casos de eclâmpsia pós-parto que têm sido associados à expressão tardia de repercussões inflamatórias e vasculares sistêmicas e também, especificamente em certos casos, com fragmentos de placenta retidos (64). Junior e colaboradores (10) afirmaram que, para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia, não é necessário o feto, e sim a presença de trofoblastos, uma vez que se observa pré-

eclâmpsia em gestantes com mola hidatiforme, caracterizada pela proliferação excessiva de tecidos trofoblásticos e ausência ou subdesenvolvimento do embrião. Através do trabalho de Duckitt & Harrington (30), foi possível verificar que, quanto maior a massa placentária, maior o risco, fato que pode ser comprovado pela maior frequência em gestações gemelares, com um aumento de 2,93 vezes no risco de desenvolvimento da doença.

1.8 Outras Complicações

Estudos sugerem que a própria pré-eclâmpsia pode ser um fator de risco para futuros eventos cardiovasculares, possivelmente através de dano sistêmico subclínico persistente ou disfunção endotelial vascular que ocorre em mulheres que eram saudáveis antes do início da pré-eclâmpsia (18).

Foi detectado um risco aumentado de doença cardiovascular e doença renal crônica em pacientes com antecedente de pré-eclâmpsia. Embora a relação causa-efeito ainda não esteja completamente elucidada, sabe-se que essas doenças compartilham os mesmos fatores de risco e estão provavelmente relacionadas à disfunção endotelial (62).

Nisell e colaboradores (65) afirmam que aproximadamente 20% das mulheres com pré-eclâmpsia desenvolverão hipertensão ou microalbuminúria no prazo de sete anos após sua gestação, em comparação com apenas 2% entre as mulheres com gravidez sem complicações, e que o risco de doença cardiovascular e cerebrovascular é duplicado em mulheres com pré-eclâmpsia e hipertensão gestacional em comparação aos controles pareados por idade.

Apesar das complicações maternas da pré-eclâmpsia serem muito significativas, o desenvolvimento do feto também pode ser muito prejudicado, e entre as complicações mais importantes estão: prematuridade, restrição de crescimento fetal, oligoidrânio, e aumento do risco de morte perinatal (66).

Outro trabalho de Valdez e colaboradores (67), relatou que pessoas nascidas de gestações acometidas por pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional possivelmente terão algum comprometimento cardiovascular futuro. Foi relatado também um risco aumentado para AVC hemorrágico e isquêmico após 60 a 70 anos em indivíduos que nasceram de gravidez em que houve pré-eclâmpsia grave. Isso

possivelmente está relacionado à alteração no desenvolvimento dos vasos cerebrais durante a vida intrauterina (62,68-69).

1.9 Predisposição genética à pré-eclâmpsia

Vários genes já foram estudados na tentativa de identificar pacientes com uma suscetibilidade maior ao desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Diversos estudos têm demonstrado a associação entre a doença e polimorfismos em vários genes (70-73). No entanto, a falta de reprodutibilidade dos trabalhos tem levado à incertezas sobre a natureza e o número de genes que podem contribuir para o risco da pré-eclâmpsia (73).

Neste trabalho iremos nos concentrar apenas em polimorfismos dos genes da Óxido Nítrico Sintase Endotelial (*eNOS*) e dos genes das Metaloproteinases de Matriz Extracelular 2 e 9 (*MMP2* e *MMP9*).

1.9.1 Óxido nítrico sintase endotelial

O gene *eNOS* (*NOS3*) está localizado no braço longo do cromossomo 7 (região 7q36) e codifica a enzima óxido nítrico sintase endotelial (*eNOS*) (74), responsável pela produção do óxido nítrico (NO). O NO está envolvido na regulação da pressão arterial, distribuição do fluxo sanguíneo aos órgãos, inibição da adesão e agregação plaquetária e inibição de algumas funções leucocitárias (75-77).

A *eNOS* gera continuamente NO, aumentando a produção de GMPc que medeia a vasodilatação. Uma vez que o NO não pode ser armazenado, a sua produção é controlada por meio da regulação da expressão ou atividade da enzima *eNOS* (76).

Durante a gestação normal, o NO está envolvido em adaptações fisiológicas importantes, como um aumento da biodisponibilidade do NO que causa vasodilatação materna, necessária para favorecer o aumento do volume circulante durante a gravidez, sem a elevação da pressão sanguínea, e favorece também aumento da circulação sanguínea do útero e entre o feto e placenta (78). Na pré-eclâmpsia, essa adaptação falha, e ocorre a disfunção endotelial (79). Tranquilli e colaboradores (80) sugerem que a baixa concentração de NO no fluido amniótico poderia representar um prejuízo na vascularização da placenta e alterar a função

endotelial, induzindo a doença placentária e a pré-eclâmpsia. Portanto, polimorfismos no gene da *eNOS* poderiam contribuir para a predisposição à pré-eclâmpsia

Alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*), incluindo -786T>C (*rs2070744*), 894G>T (*rs1799983*) e um número variável de repetições em tandem (VNTR) no íntron 4 (*rs61722009*) foram identificados no gene *eNOS* e podem influenciar a capacidade de produção de NO pela enzima (81-83).

Sladek e colaboradores (84) afirmaram que a redução da biossíntese de NO favorece o início da pré-eclâmpsia e que alterações no gene da *eNOS* seriam uma possível causa da doença.

O polimorfismo *missense* 894G>T do gene da *eNOS* está localizado no éxon 7 e também é denominado Glu298Asp, indicando a alteração protéica com troca de um resíduo, do aminoácido ácido glutâmico por aspartato (85). Esse SNP foi associado à redução da vasodilatação dependente do endotélio na gravidez (86) ao risco de doenças cardiovasculares isquêmicas (87). No entanto, em relação à pré-eclâmpsia, os resultados são divergentes. Enquanto alguns mostram a associação desse polimorfismo com a doença, outros não identificam a relação (88-94).

O polimorfismo -786T>C da *eNOS* resulta em redução significativa da atividade da *eNOS* (95), e esse SNP pode estar associado à predisposição à hipertensão arterial de forma geral. Foi demonstrado que a variante -786T>C está associada à redução do RNAm da *eNOS* na placenta (95-96). Um estudo propôs que a presença desse polimorfismo pode ser um fator de risco para pré-eclâmpsia, porém os autores sugeriram a necessidade de replicar em uma amostra maior para confirmar essa hipótese (93).

Um número variável de repetições em tandem (VNTR) de 27 pares de bases (pb) foi identificado no íntron 4 do gene da *eNOS*, que é conhecido como polimorfismo 4ab. O alelo selvagem 4b apresenta 5 repetições de 27 pares de bases e é o mais frequente. Já o alelo 4a, menos frequente, possui 4 repetições de 27 pares de bases e tem sido associado à doença cardíaca coronariana, doença renal e hipertensão arterial (97-100). Outras variantes desse polimorfismo também foram descritas como 4c e 4d, com 6 e 7 repetições, respectivamente, porém com frequência muito baixa (101).

1.9.2 Metaloproteínases de matriz extracelular

Além das óxido nítrico sintases, outro grupo de enzimas com papel importante na modulação de fluxo sanguíneo nos vasos são as metaloproteínases de matriz extracelular (MMPs). As MMPs compreendem uma extensa família de enzimas proteolíticas que estão associadas à degradação da matriz extracelular (102).

Além disso, essas enzimas modulam a reatividade vascular, uma vez que reduzem a potência do peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina, reduzindo a vasodilatação, e induzem a clivagem da “big-endotelina”, produzindo a endotelina-1, um peptídeo mais ativo, que causa vasoconstrição (102-103).

Por terem propriedades potencialmente destrutivas, as MMPs são sintetizadas como pró-formas, enzimaticamente inativas, cuja atividade requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação desse domínio por outras proteases (104).

As MMP-2 e MMP-9 são sintetizadas pelos genes presentes nos cromossomos 16q12.2 e 20q13.12, respectivamente, e possuem os mesmos nomes dados às suas proteases. Em um estudo *in vitro* de Rajagopalan e colaboradores (105), demonstrou-se que as espécies reativas de oxigênio podem ativar a MMP-2 e a MMP-9 ao reagirem com o grupo tiol que preserva a latência das MMPs.

Desse modo, o estresse oxidativo pode causar alterações vasculares acentuadas associadas ao significativo aumento da atividade das MMPs, com possível dano cardiovascular e renal (106-109).

Na pré-eclâmpsia, alguns elementos, tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), são capazes de estimular a produção e/ou a liberação das MMPs (104).

Semelhantemente ao papel observado nas doenças cardiovasculares, a ativação dessas proteases na pré-eclâmpsia pode promover a degradação excessiva dos componentes da matriz extracelular e provocar um remodelamento vascular patológico (104).

Estudos demonstraram que o aumento na atividade e nos níveis de MMP-2 pode prejudicar o relaxamento vascular dependente do endotélio e causar hipertrofia arterial, especialmente da camada média, deposição excessiva de colágeno e elastina e, desse modo, contribuir para disfunção e remodelamento

vascular hipertensivo (104). Além disso, os níveis plasmáticos da MMP-2 estão elevados nas pacientes com pré-eclâmpsia (109-110).

Foi demonstrado que o polimorfismo no gene *MMP2* -1306C>T (*rs243865*) reduz a atividade da região promotora e a expressão do gene em células epiteliais, macrófagos e células do músculo liso (111). Esse SNP foi associado à restrição de crescimento intrauterino de acordo com trabalho de Gremlich e colaboradores (112), que demonstrou um aumento de 2 vezes do risco dessa complicação.

Também há evidência da implicação funcional de um polimorfismo genético na região promotora -1562C>T (*rs3918242*) do gene que codifica a MMP-9. Um efeito específico sobre a transcrição do promotor do gene *MMP9* causa aumento na sua expressão em portadores do alelo polimórfico T (113). Esse efeito foi associado com diversas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial (114-116), que está associada à maior incidência de pré-eclâmpsia superajuntada.

2. JUSTIFICATIVA

A pré-eclâmpsia é uma das causas de morbidade e mortalidade materna e perinatal mais importantes em todo o mundo, em especial nos países em desenvolvimento. Apesar de inúmeros estudos publicados sobre esse tema, sua etiologia continua desconhecida, podendo envolver uma interação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. A investigação genética é um campo que pode colaborar para a elucidação de sua fisiopatologia e na identificação de populações mais suscetíveis ao desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

Até o momento, os resultados de estudos desenvolvidos na busca de correlações entre pré-eclâmpsia e os genes da eNOS e MMPs foram contraditórios, e este estudo em uma população brasileira colabora para confirmar dados já encontrados na literatura e tentar definir novos marcadores de predisposição a pré-eclâmpsia.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Investigar a associação dos polimorfismos nos genes que codificam as MMPs e a eNOS com a ocorrência de pré-eclâmpsia.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes *MMP2* (-1306C>T e *MMP9* (-1562C>T) nas populações de gestantes sem e com pré-eclâmpsia e avaliar sua associação com pré-eclâmpsia;
- Determinar a frequência dos polimorfismos -786T>C e 894G>T e VNTR no íntron 4 do gene *eNOS* entre populações de gestantes sem e com pré-eclâmpsia e avaliar sua associação com pré-eclâmpsia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Tipo de estudo e planejamento estatístico

Trata-se de um estudo caso-controle não pareado, com seleção de casos a partir do diagnóstico de pré-eclâmpsia em gestantes em acompanhamento ambulatorial ou internadas em qualquer unidade da instituição. Os controles, na proporção de 3 para cada 1 caso, foram gestantes normotensas e sem comorbidades admitidas para parto na instituição. Utilizando como base os resultados do estudo de Serrano e colaboradores (2004) sobre o polimorfismo 894G>T do gene da eNOS, com uma proporção de 1,1% dos controles, e admitindo um erro tipo I de 5% e erro tipo II de 20%, para um estudo caso-controle, não pareado, com uma proporção 1:3, estimou-se um número mínimo necessário de 148 casos e 444 controles. Assim, foi prevista a inclusão de 600 mulheres, sendo 150 casos com pré-eclâmpsia e 450 de gestantes sem pré-eclâmpsia.

4.2. Seleção de sujeitos para pesquisa

As gestantes que participaram da pesquisa foram selecionadas em atendimentos nos Ambulatórios de Pré-Natal, Enfermaria de Patologia Obstétrica, Centro Obstétrico, Pronto-Atendimento e Unidade de Terapia Intensiva do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP.

Para os casos, foram utilizados como critérios de inclusão todos os abaixo:

- Gestantes entre 20 e 40 semanas ou puérperas, e
- Diagnóstico de pré-eclâmpsia: surgimento de hipertensão arterial (níveis pressóricos superiores a 140/90mmHg em pacientes previamente normotensas) com proteinúria (valores superiores a 300mg/24h ou acima de 1+ em urinálise de pacientes comprovadamente sem infecção urinária) (11); ou, na ausência de proteinúria, critérios de pré-eclâmpsia grave.
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Para os controles, os critérios de inclusão foram:

- Ausência de critérios diagnósticos para pré-eclâmpsia, e
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, e
- Gestante normotensa internada para parto, ou
- Puérpera normotensa.

Para ambos os grupos, os critérios de exclusão foram:

- gestações múltiplas;
- gestantes com diagnóstico de malformações fetais;
- gestações de alto risco (hipertensão arterial crônica, hipertensão gestacional, diabetes, doenças do colágeno, tireoidopatias, ou com doenças infecciosas crônicas).

4.3 Variáveis Avaliadas

4.3.1 Variáveis independentes:

- Polimorfismo –1306C>T do gene da MMP-2
- Polimorfismo –1562C>T do gene da MMP-9
- Polimorfismo Glu298Asp (894G>T) do gene da eNOS
- Polimorfismo –786T>C do gene da eNOS
- VNTR do intron 4 do gene da eNOS

4.3.2 Variável dependente: Pré-eclâmpsia

• Casos: Pré-eclâmpsia: mulheres com 20 ou mais semanas de gestação, com surgimento de hipertensão arterial (níveis pressóricos superiores a 140x90mmHg em pacientes previamente normotensas, em 2 medidas com intervalo de 4 horas ou medida única superior a 160/110mmHg), proteinúria (valores superiores a 300mg/24h ou 2+ em urinálise de pacientes comprovadamente sem infecção urinária) (11).

• Controles: puérperas ou gestantes internadas na instituição para parto e classificadas como normotensas, ou seja, sem pré-eclâmpsia, sem hipertensão gestacional e sem hipertensão arterial crônica.

4.3.3 Variáveis de controle:

- Índice de Massa Corpórea (IMC): critério de avaliação do grau de obesidade de um indivíduo, calculado pelo peso, em quilogramas, mensurado em uma balança antropométrica, dividido pelo quadrado da altura, em metros (OMS, 1995);
- Idade: número de anos completos do sujeito, de acordo com dados cadastrais, obtidos a partir do prontuário médico.
- Paridade: número de gestações, incluindo tanto as que resultaram em partos e abortos, segundo informações fornecidas pelo sujeito;
- Peso materno pré-gestacional: peso pré-gestacional, referido pelo sujeito, em quilogramas.
- Escolaridade: em anos completos, referido pelo sujeito;
- Cor ou raça: cor da pele da mulher, autotclassificada pelo sujeito, segundo as categorias utilizadas no senso demográfico de 2000, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): branca, preta, amarela, indígena ou outra (117).
- Antecedente de pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional em gravidez anterior: sim ou não
- Renda familiar: valor total de renda familiar mensal em reais, referida pelo sujeito;
- Ocupação: trabalho ou negócio principal ou usual de uma pessoa, especialmente aquele que provê seus meios de sustentação, referido pelo sujeito;
- Estado marital: condição marital referida pelo sujeito: solteira, separada, divorciada, viúva, casada ou morando junto. Em caso de pacientes com gestação anterior, informação sobre troca de parceiro.
- Peso do recém-nascido (em gramas);
- Escala de Apgar (de primeiro e quinto minutos);
- Idade gestacional no momento da coleta do exame: idade gestacional conforme dado de maior confiabilidade, amenorreia ou ecografia precoce, no momento da retirada do sangue para o exame do estudo.

4.4 Coleta de dados

A maioria dos controles foram incluídos na internação para o parto ou após, com a certeza do não desenvolvimento de pré-eclâmpsia. Para os casos, a inclusão foi realizada após o diagnóstico de pré-eclâmpsia.

A abordagem da gestante foi realizada pelo obstetra responsável e/ou enfermeiro, encarregado pela obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, vide Anexo 9.4) e responsável pela coleta de dados dos possíveis participantes da pesquisa com a aplicação de questionário com dados de identificação, sócio-demográficos e antecedentes (Anexos 9.1 e 9.2) e responsável também pela coleta de dados clínicos maternos e do recém-nascido.

Todos os dados foram reverificados após alta hospitalar e, quando houve reinternações, com a finalidade de que nenhuma paciente fosse considerada controle erroneamente. Realizamos também a revisão de todos os prontuários dos casos, para verificar os exames laboratoriais em relação a gravidade de doença.

Para as gestantes que aceitaram e estavam aptas para participar da pesquisa, foram coletadas duas amostras de sangue (2 tubos de 4 ml com EDTA) através de punção venosa pela equipe de enfermagem do CAISM, no momento de admissão ao estudo. Na grande maioria dos casos, foi utilizada a mesma punção para a rotina laboratorial de cada paciente (em internação hospitalar ou consulta de Pronto Atendimento), não ocorrendo prejuízo ou desconforto adicional devido ao estudo.

A qualidade foi controlada em todas as etapas do estudo, a começar pela utilização de critérios padronizados para a definição de pré-eclâmpsia e criação de filtros para avaliação de consistência.

Após uma primeira verificação visual, os dados coletados em formulários especificamente desenhados para isso foram digitados e consolidados em um único banco de dados, para diminuir a probabilidade de erros de digitação. Cada sujeito da pesquisa foi identificado por um número e todos os seus dados foram codificados. A numeração sequencial foi fundamental para a realização do teste laboratorial cego, onde o laboratorista não teve acesso aos dados de cada paciente até o final do processamento e obtenção de resultados.

4.5 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP, sob número 502/2010 (Anexo 9.3). Foram cumpridos todos os princípios enunciados na Declaração de Helsinki e na Resolução 2012 do Conselho Nacional de Saúde, segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Além disso, por se tratar de pesquisa com material genético, foram também cumpridas a Resolução 466/12 do CNS. O material coletado será armazenado por um período de cinco anos, mas só será utilizado para outro projeto após nova submissão do projeto ao CEP.

Para inclusão, todos os sujeitos de pesquisa concordaram com o estudo, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, segundo descrição no Anexo 9.3. O TCLE foi entregue ao voluntário de pesquisa, após identificação deste como elegível, para que pudesse ler e assinar, ao concordar. O responsável pela aplicação do TCLE respondeu a todas as dúvidas que surgiram por parte do sujeito da pesquisa.

4.6 Genotipagem

4.6.1 Extração do DNA genômico

Amostras de sangue venoso periférico foram coletadas em tubos com anticoagulante de EDTA, e armazenadas em geladeira até o momento do processamento. Todas as amostras foram submetidas à técnica de fenol-cloroformio modificada (118) para a extração do DNA genômico.

Nessa técnica, o sangue é centrifugado a 3000 rpm por 10 min, o plasma é descartado, e os eritrócitos lisados com uma mistura de soluções contendo NH_4Cl (0.144M) e NH_4HCO_3 (0,01M). Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. A seguir, a solução denominada TKM1 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; KCl 10mM; MgCl_2 10mM; EDTA 20mM) foi adicionada ao precipitado juntamente com 100 μl de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 3000rpm por 20 min e, posteriormente, o sobrenadante descartado, obtendo-se, dessa forma, o precipitado de leucócitos.

Para lisar os leucócitos, foram adicionados 400µl da solução TKM2 (Tris-HCl 10mM pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4 M; EDTA 20mM) e 25µl de SDS 10%, e em seguida cada amostra foi incubada a 55°C durante 30 min. Após esse período, 180µl de NaCl 5M foram adicionados e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 20 min. Cada amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 min e o sobrenadante transferido para outro tubo, adicionando-se um volume igual de fenol e de uma solução clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 24:1), seguido de homogeneização, centrifugação e transferência do sobrenadante para outro tubo. A mistura clorofórmio/álcool isoamílico foi adicionada ao tubo, centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado acetato de sódio 3M a pH 5,3 e etanol absoluto gelado para precipitação do DNA, sendo, então, novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 min; o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” lavado com etanol 70% gelado. O DNA foi solubilizado em água deionizada estéril, quantificado em equipamento NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA) e a análise qualitativa, realizada em gel de agarose 1,0%.

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação do material genético foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), que consiste na amplificação mediada pela enzima *Taq DNA polimerase* de uma sequência de DNA, flanqueada por oligonucleotídeos específicos, resultando na síntese de milhões de cópias de uma determinada sequência.

Para tal reação, foram utilizados os seguintes componentes: 1U Taq DNA Polimerase (Life Technologies), 1X Tampão da enzima, 2mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 160nM de primers (IDT) Sense e Antisense (Tabela 2), cerca de 300ng/µL DNA genômico, e água deionizada para completar o volume de 30µL.

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados na identificação dos polimorfismos. TA, temperatura de anelamento.

	Sequência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	Tamanho	TA
MMP-2 (-1306C>T)	F- CTTCTAGGCTGGTCCTTACTGA R- CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGC	188pb	58°C
MMP-9 (-1562C>T)	F- GCCTGGCACATAGTAGGCCC R- CTTCTAGCCAGCCGGCATC	435pb	60°C
ENOS (Glu298Asp ou 894G>T)	F- AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA R- CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA	248pb	58°C
ENOS (-786T>C)	F- CACCCAGGCCACCCCAACT R- GCCGCAGGTCGACAGAGAGACT	415pb	58°C
ENOS (Intron 4 VNTR)	F- *FAM CTTACTCTCCACTGCTTTTCAGAG R- CGCAGGTCAGCAGAGAGACTAG	390-444pb	58°C

As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) compreendendo uma etapa inicial a 96°C durante 2 minutos para a desnaturação do DNA e consequente ativação da enzima polimerase, seguida por 35 ciclos de desnaturação, anelamento dos primers e extensão do fragmento nas seguintes condições 96°C – 30 segundos, 58°C – 30 segundos e 72°C – 1 minuto e finalmente uma etapa denominada de extensão final a 72°C durante 5 minutos. O aumento exponencial das sequências se dá após vários ciclos de alternância de temperatura. Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio foi utilizado para a verificação da amplificação, cujo produto foi visualizado sob luz ultravioleta.

4.6.3 Determinação genotípica

A determinação dos polimorfismos da *eNOS* (894G>T e -786T>C), *MMP-2* (-1306C>T) e da *MMP-9* (-1562C>T) foram realizadas a partir de PCR seguida de análise de restrição e sequenciamento automático. O polimorfismo do íntron 4 da *eNOS* (VNTR) foi determinado através do PCR marcado com fluoróforo FAM

seguido de genotipagem em sequenciador automático para determinação do número de repetições em cada alelo.

4.6.4 RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

A técnica de RFLP ou, como também é chamada, técnica de digestão enzimática, tem a finalidade de digerir fragmentos de DNA através de enzimas de restrição, permitindo verificar a ausência ou presença de determinado sítio de clivagem em uma sequência de DNA conhecida. Com exceção do VNTR do gene *eNOS*, cada produto da PCR foi digerido a 37°C durante 3 horas com a enzima de restrição apropriada (Tabela 3), previamente identificada para verificação dos sítios polimórficos. Para cada reação, foram utilizados 5 uL do produto de PCR específico para cada polimorfismo, ao qual foi adicionada uma Unidade de Enzima de restrição, volume de tampão necessário para atingir concentração de 1X do Tampão de Enzima, albumina de soro bovino (BSA) quando necessário (segundo a recomendação do fabricante) e água destilada para completar o volume final de 12 uL. Após a incubação, os fragmentos gerados pela digestão enzimática foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 3,0% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Cada amostra foi identificada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição.

Tabela 3. Tamanhos dos fragmentos obtidos por PCR e após clivagem por enzima de restrição, e enzima utilizada para cada polimorfismo.

Gene (polimorfismo)	Tamanho do Fragmento (pb)	Enzima de Restrição	Fragmentos após clivagem do Homozigoto para o Alelo ancestral (pb)	Fragmentos após clivagem do Homozigoto para o Alelo polimórfico (pb)
<i>MMP2</i> (-1306C>T)	193	<i>Xsp I</i>	186+7	162+24+7
<i>MMP9</i> (-1572C>T)	436	<i>Nla3</i>	381+48+7	246+135+48+7
<i>ENOS</i> (894G>T)	248	<i>MboI</i>	248	158+90
<i>ENOS</i> (-786T>C)	394	<i>Msp I</i>	394	352+42

4.6.5 Sequenciamento automático

As reações de sequenciamento foram realizadas no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante e otimizado no laboratório, utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

A estratégia para o sequenciamento está fundamentada na aplicação dos mesmos *primers* utilizados para a amplificação dos fragmentos do gene *eNOS* e *MMPs*. Para essa reação, foram utilizados cerca de 30ng do produto da PCR; 1µl de *BigDye*; 2,0µM de *primer* sense ou antisense; 1X tampão do *BigDye* e água destilada para completar o volume de 10µl. A reação foi distribuída em placa própria para sequenciamento e protegida da luz. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos, seguido do ciclo:

- Desnaturação - 96°C - 20 segundos
 - Anelamento - 57°C - 15 segundos
 - Extensão - 60°C - 4 minutos
- } 25 vezes

Ao término da ciclagem, foram adicionados à reação 2µl de acetato de amônio 7,5M e 50µl de etanol absoluto para precipitação do fragmento marcado. A seguir, as amostras foram incubadas por 15 minutos, em temperatura ambiente protegidos da luz, e centrifugadas a 4.000rpm por 30 minutos, e o sobrenadante removido por inversão. Então, 100µl de etanol 70% foram adicionados e, posteriormente, o material foi centrifugado a 4.000rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e a placa aquecida a 65°C durante 5 minutos para completa evaporação do etanol. Para a eletroforese, foi adicionado a cada amostra, 10µl de formamida deionizada. As amostras foram homogeneizadas, desnaturadas a 95°C por 3 minutos e submetidas à eletroforese capilar no sequenciador automatizado.

Após a eletroforese, as sequências geradas com o auxílio do *Software Sequencing Analysis*, v 5.4 foram alinhadas e comparadas com a sequência do gene depositada no banco de dados público (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os polimorfismos foram identificados. Nas figuras abaixo (1, 2, 3 e 4), é possível observar os padrões de eletroferograma encontrados nas análises de cada

polimorfismo em estudo, ressaltando que os picos únicos representam região com alelos homozigotos, e picos diferentes sobrepostos, a presença de alelo em heterozigose.

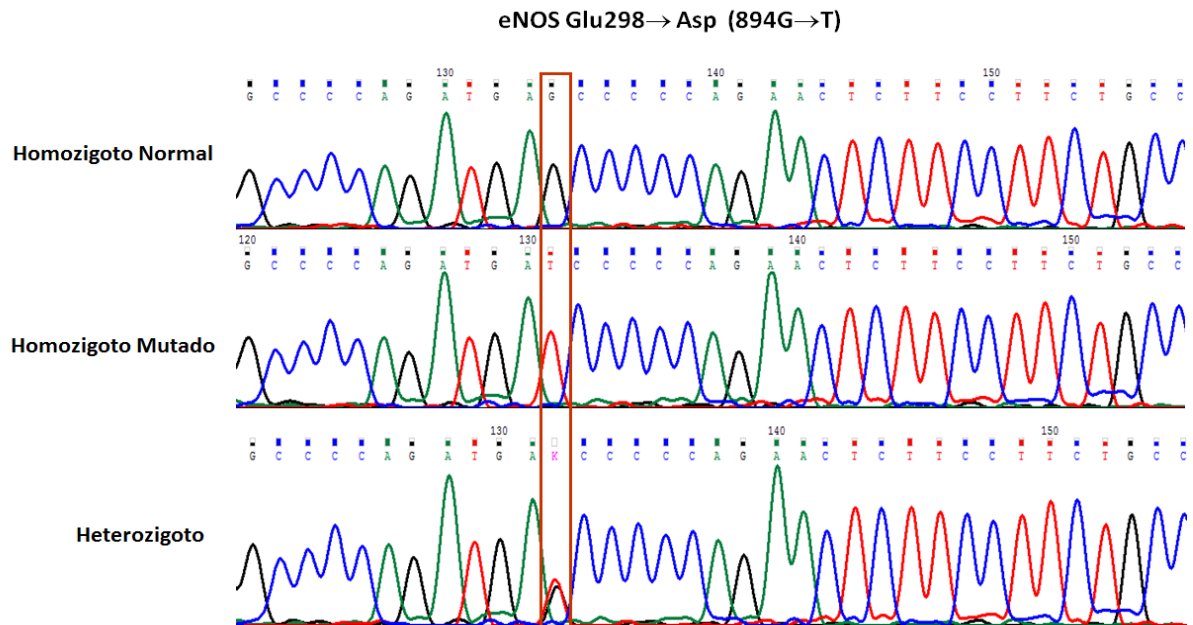


Figura 1: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica do eNOS 894G>T.

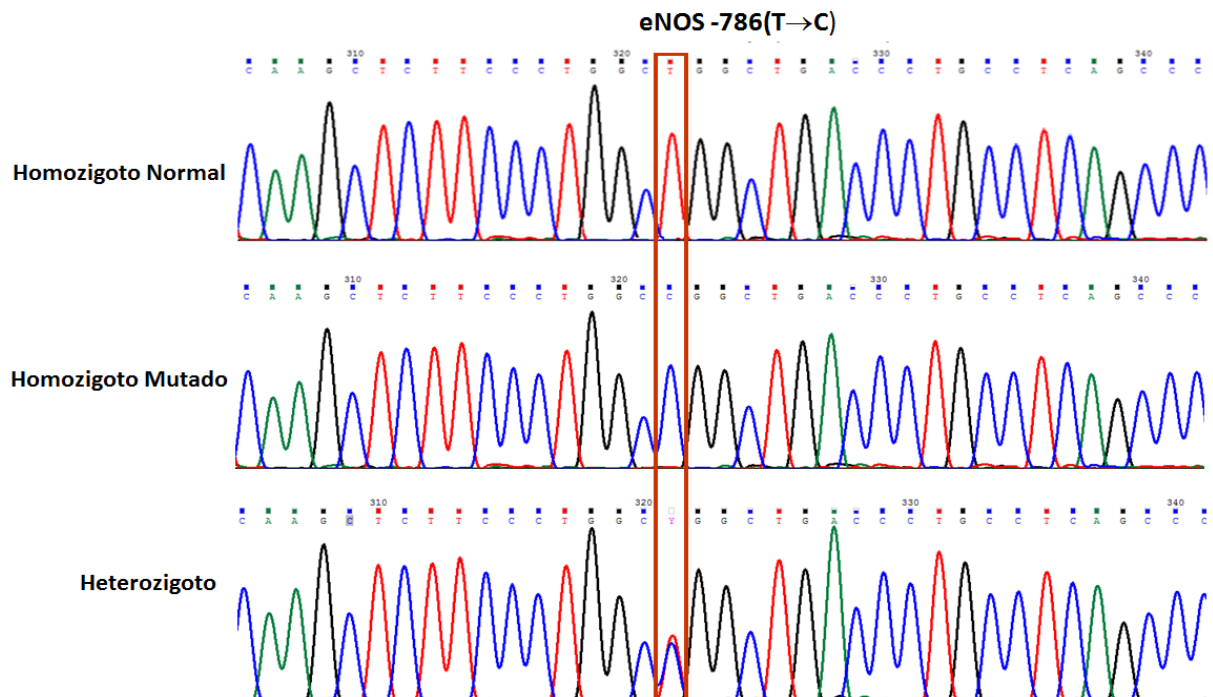


Figura 2: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica do eNOS-786T>C.

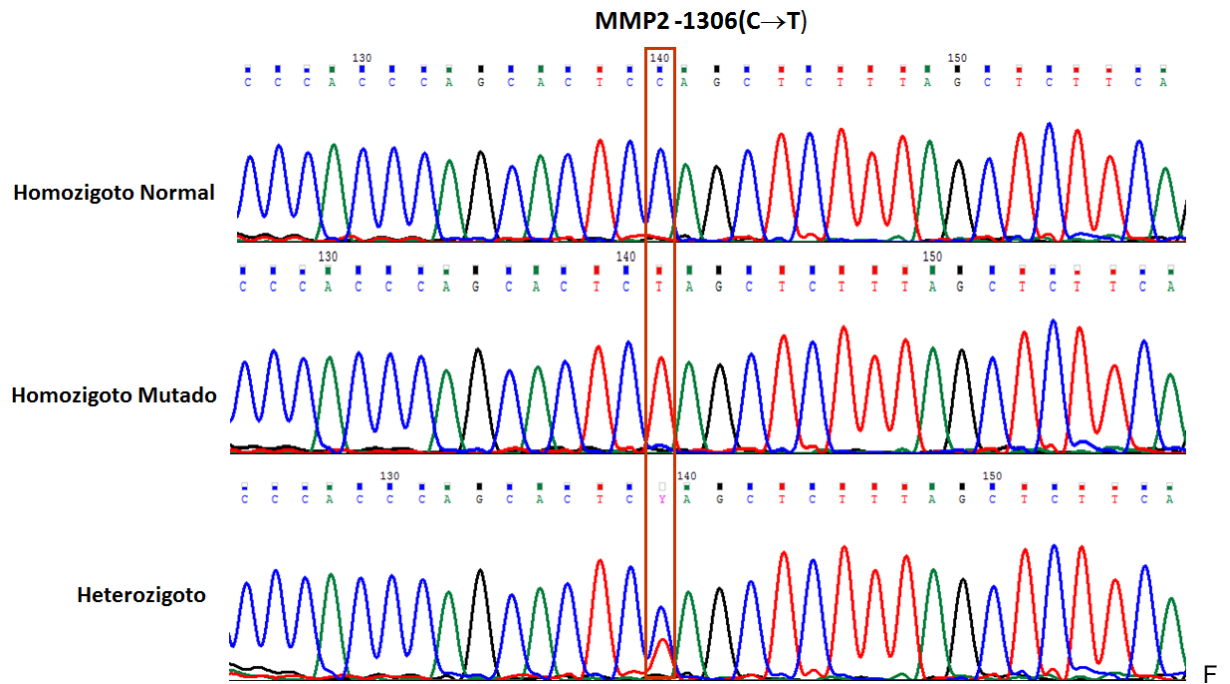


Figura 3: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica da MMP2 -1306C>T.

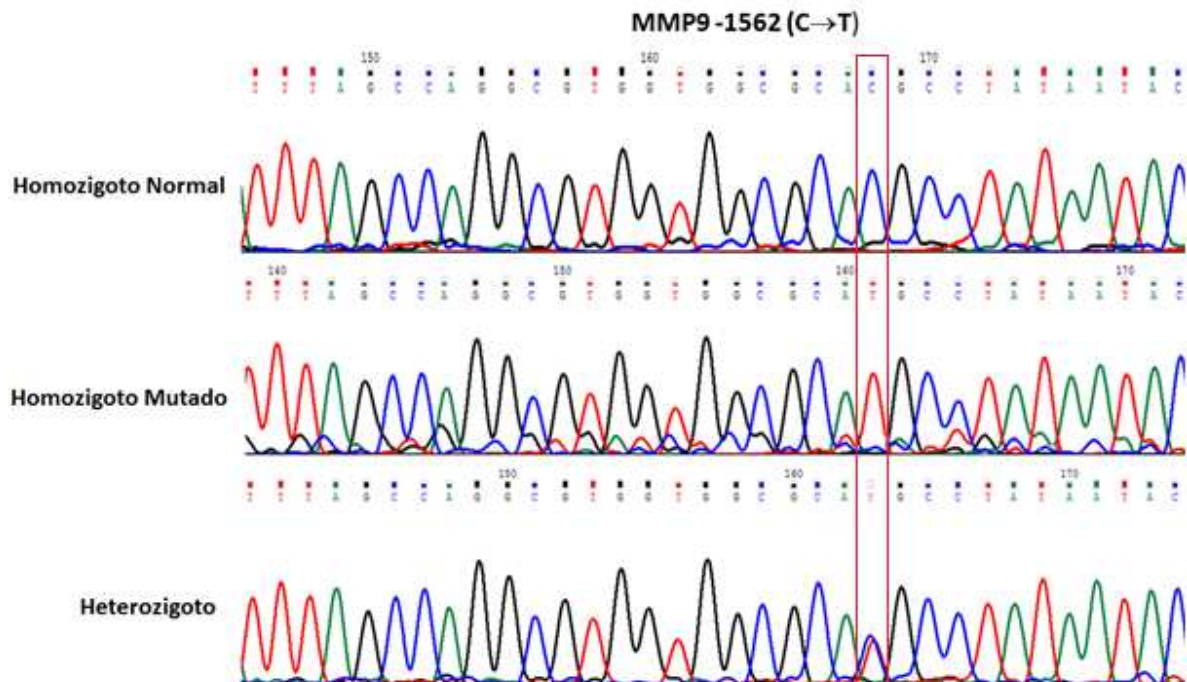


Figura 4: Eletroferograma de sequenciamento automático da região polimórfica da MMP9 -1562C>T.

4.6.6 Análise de Fragmentos em sequenciador automático

Essa técnica permite a visualização e comparação de diferentes tamanhos de fragmentos de DNA analisados com a ajuda de um PCR marcado e leitura posterior através de eletroforese em sequenciador automático.

Após a PCR do íntron 4 do gene *eNOS* com a utilização do *primer* sense marcado (fluoróforo FAM), 1,0 µL do produto derivado da amplificação foi adicionado a uma mistura de formamida deionizada (Hi-Di®, Applied Biosystems, CA, EUA) e marcador de peso molecular (GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard, Life Technologies), totalizando um volume de 10µl. Essa reação foi desnaturada a 95°C durante 5 min e os fragmentos foram visualizados, após eletroforese capilar no equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer, com o auxílio do Software Gene Mapper, v 4.1. Na figura abaixo, estão expostos os cinco perfis de genótipo encontrados no estudo (Fig.5). Os picos em laranja equivalem a fragmentos provenientes do marcador molecular LIZ500 (fragmentos de 35 a 500 pb) e em azul o fragmento de interesse com os tamanhos esperados para cada genótipo. Nessa figura, podemos observar genótipos apresentando 4, 5 e 6 repetições da sequência de 27 pares de bases (GAAGTCTAGACCTGCTGCAGGGGTGAG) em homozigose e/ou heterozigose.

eNOS- Intron 4 - VNTR

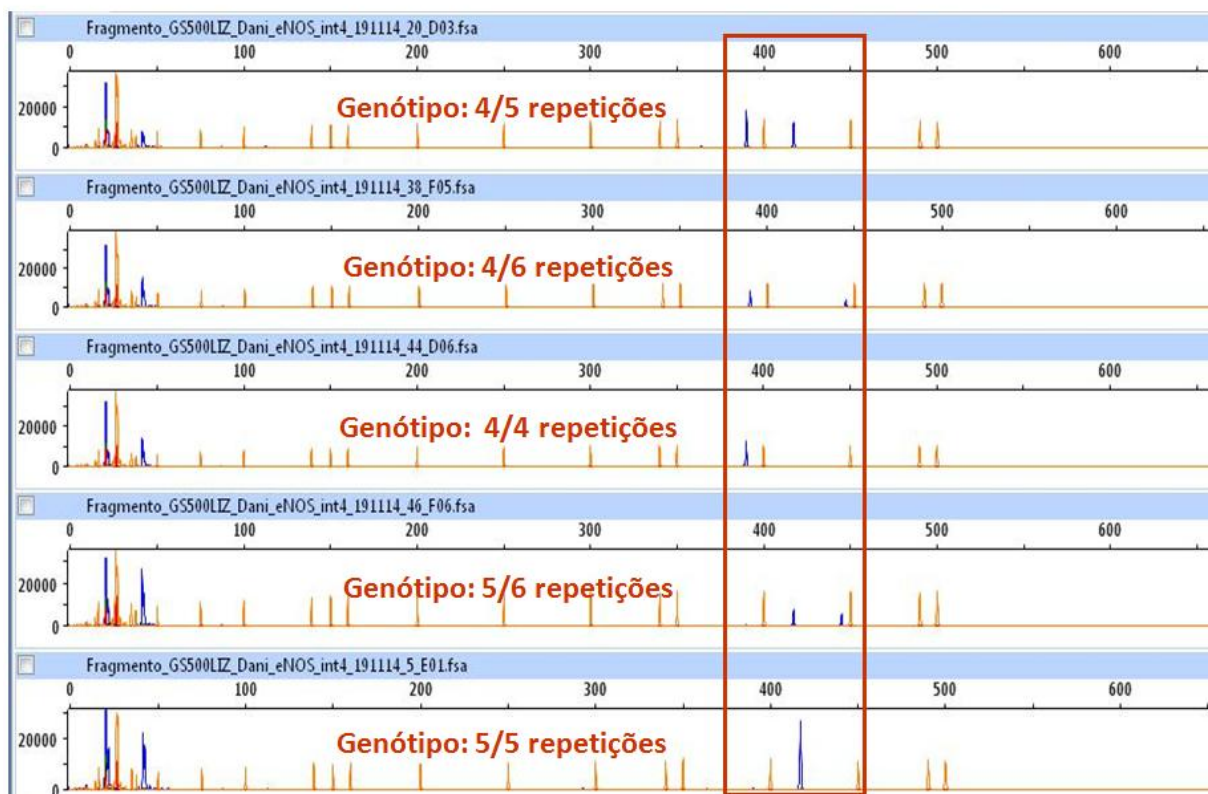


Figura 5: Eletroferograma de genotipagem em sequenciador automático com os perfis dos genótipos encontrados, no VNTR do intron 4 do gene da eNOS.

4.7 Análise estatística

Os dados clínicos e laboratoriais foram tabulados em planilha utilizando Microsoft Excel 2003-2013 (Microsoft, EUA) e posteriormente exportados e analisados com os softwares GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, EUA).

Análise de correlação genotípica e multivariada foram realizadas com software R v3.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, EUA) utilizando-se os pacotes de análise estatística *SNPassoc* e *epicalc*.

5. RESULTADOS

No período de março de 2011 a julho de 2014, foram coletadas 383 amostras de sangue de gestantes que aceitaram participar do estudo. Dentre essas, 40 amostras foram excluídas do estudo. Os motivos de exclusão das amostras foram: más condições de preservação da amostra antes do processamento laboratorial (7 amostras), ou falta de dados clínicos, laboratoriais ou pessoais da gestante para a análise final (33 amostras).

Todas as amostras incluídas foram numeradas sequencialmente sem distinção de grupo para permitir processamento laboratorial cego e foram submetidas à extração de DNA e, posteriormente, à PCR e RFLP.

Para os polimorfismos *MMP2* -1306C>T e *MMP9* -1562C>T, a realização de genotipagem por PCR seguido de digestão por enzima de restrição (RFLP) foi ineficiente, com grande parte das amostras apresentando digestão parcial.

A digestão parcial ocorre quando a enzima não digere todos os fragmentos de PCR, ocorrendo uma fragmentação parcial, mesmo quando existe o sítio de restrição em todos os alelos. Essa digestão parcial é resultante da falta de atividade, ou quantidade de enzima insuficiente para digestão dos sítios específicos. Essa ineficiência da técnica exigiu a escolha do sequenciamento automático para genotipar todas as amostras na pesquisa desses polimorfismos.

Para os polimorfismos do gene *eNOS* 894G>T e -786T>C, a técnica de RFLP foi satisfatória e para validação, utilizamos o sequenciador automático para confirmação dos genótipos de pelo menos 30% de todos PCRs.

Somente após a análise genotípica completa, os subgrupos foram separados de acordo com a classificação de casos e controles, identificados anteriormente pelo obstetra responsável. As amostras se dividiram em 266 gestantes controles e 77 gestantes com pré-eclâmpsia, mantendo a proporção aproximada de 3 controles para cada gestante com pré-eclâmpsia conforme proposto no planejamento estatístico, embora o estudo tenha sido interrompido antes da inclusão das 600 amostras planejadas inicialmente. Após análise de frequência genotípica em cada grupo, foi notada a presença maior dos polimorfismos em homozigose no gene da *eNOS* (894G>T e -786T>C) no grupo das gestantes

com pré-eclâmpsia comparado aos controles, como se pode observar na tabela abaixo (Tabela 4)

Tabela 4 – Frequência dos genótipos para os polimorfismos *eNOS* 894G>T, -786T>C, *MMP2* - 1306C>T e *MMP9* -1562C>T em cada grupo de gestantes. ND, não determinado

Gene (polimorfismo)	Classificação	Homozigoto não polimórfico	Heterozigoto	Homozigoto polimórfico	Não determinado
<i>eNOS</i> (894G>T)	Genótipo	GG	TG	TT	ND
	Pré-eclâmpsia	42 (55%)	25 (32%)	10 (13%)	0 (0%)
	Controle	149 (56%)	101 (38%)	13 (3%)	3 (1%)
<i>eNOS</i> (-786T>C)	Genótipo	TT	CT	CC	ND
	Pré-eclâmpsia	36 (47 %)	29 (38%)	12 (16%)	0 (0%)
	Controle	131 (49%)	118 (44%)	15 (6%)	2 (1%)
<i>MMP2</i> (-1306C>T)	Genótipo	CC	CT	TT	ND
	Pré-eclâmpsia	53 (69%)	23 (30%)	1(1%)	0 (0%)
	Controle	196 (74%)	61 (23%)	4(2%)	5 (2%)
<i>MMP9</i> (-1562C>T)	Genótipo	CC	CT	TT	ND
	Pré-eclâmpsia	60 (78%)	11(14%)	1(1%)	5(6%)
	Controle	217 (82%)	43 (16%)	3(1%)	3(1%)

A análise estatística demonstrou diferença significativa na frequência dos SNPs entre controles e pré-eclâmpsia somente para os polimorfismos do gene *eNOS*, com $P<0,05$ (Figura 6), o que não ocorreu para os polimorfismos nos genes das MMPs (Figura 7).

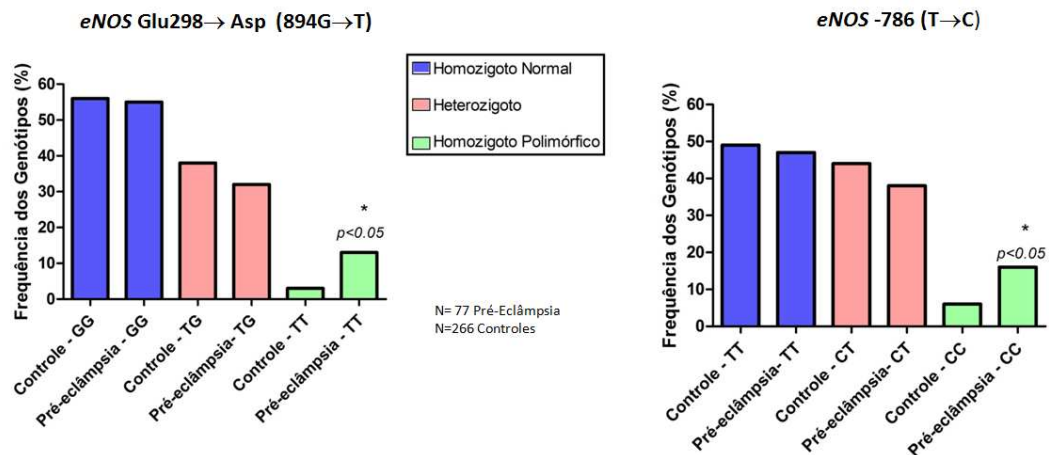


Figura 6: Distribuição genotípica dos polimorfismos no gene da *eNOS* (-786T>C e 894 G>T)

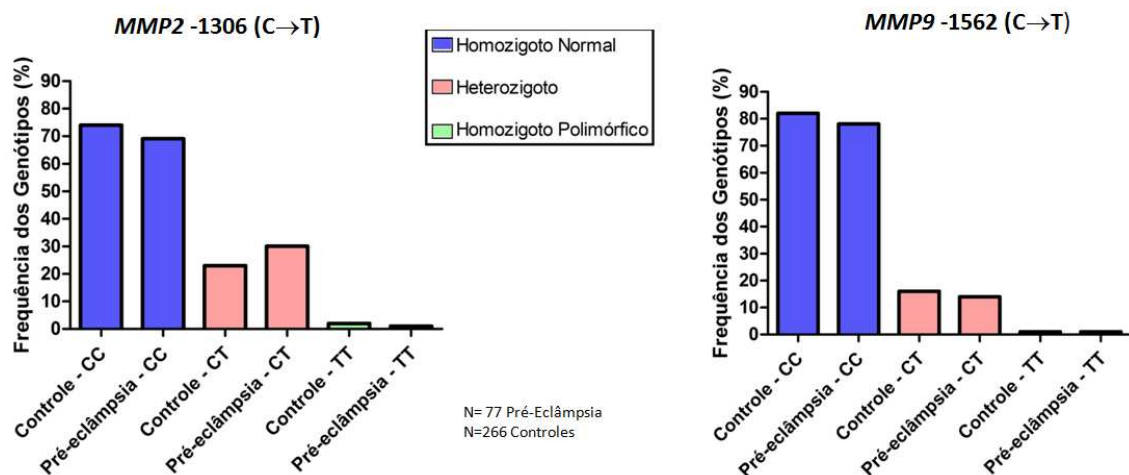


Figura 7: Distribuição genotípica dos polimorfismos *MMP9* -1562C>T e *MMP2* -1306C>T

Em relação ao VNTR do íntron 4 do gene *eNOS*, após PCR e genotipagem em sequenciador automático, notou-se uma maior diversidade de alelos na população de gestantes controle, com aparecimento mais frequente dos alelos mais raros com 4 e 6 repetições. (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência dos genótipos para o polimorfismo VNTR no intron 4 do gene da eNOS. Os genótipos expressam o número de repetições encontradas em cada alelo.

Genótipo	4/4	5/5	4/5	4/6	5/6	ND
Pré-eclâmpsia	0 (0%)	52 (68%)	17 (22%)	1 (1%)	0 (0%)	7 (9%)
Controle	13 (5%)	148 (56%)	78 (29%)	2 (1%)	4 (2%)	21 (8%)

A tabela 6 resume os resultados de frequências alélicas encontrados. Também foi observado que todos os polimorfismos testados se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 6 – Frequência dos alelos maiores e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Gene (polimorfismo)	Frequência do alelo maior (%)	Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de <i>P</i>)
MMP2 (-1306C>T)	86.1	0.65
MMP9 (-1572C>T)	90.7	0.51
eNOS (-894G>T)	74.7	0.77
eNOS (-786T>C)	70.5	0.60
eNOS (VNTR íntron 4)	80.5	0.59

As tabelas 7 e 8 resumem o perfil da população em estudo. Na comparação de gestantes controles e com pré-eclâmpsia, não foi encontrada diferença significativa entre a maioria dos dados obtidos. Houve, no entanto, uma maior frequência de gestantes com pré-eclâmpsia que relataram antecedente pessoal da doença em gestação anterior. Como esperado, também se observou maior

frequência de proteinúria no grupo com pré-eclâmpsia e diferenças no tipo de parto, sendo a maior frequência de gestantes submetidas a parto cesárea nesse grupo.

Tabela 7- Dados maternos (sócio-demográficos e clínicos). NI, não informado; ND, não determinado

Análise de Frequências de Dados Maternos (Sócio-ambientais e Clínicos)			
Controle		Pré-Eclâmpsia	
N= 266	Escolaridade	N=77	
Fundamental Incompleto	14,70%	Fundamental Incompleto	24,70%
Fundamental Completo	16,90%	Fundamental Completo	13,00%
Médio Incompleto	14,70%	Médio Incompleto	9,10%
Médio Completo	48,90%	Médio Completo	48,10%
Superior Incompleto	1,50%	Superior Incompleto	2,60%
Superior Completo	1,90%	Superior Completo	2,60%
Pós Graduação	0,00%	Pós Graduação	0,00%
Analfabeto	0,40%	Analfabeto	0,00%
N.D.	1,10%	N.D.	0,00%
N= 266	Renda	N=77	
1 Salário Mínimo	4,90%	1 Salário Mínimo	19,50%
2 Salários Mínimos	28,20%	2 Salários Mínimos	33,80%
3 Salários Mínimos	41,40%	3 Salários Mínimos	22,10%
>3 Salários Mínimos	24,80%	>3 Salários Mínimos	14,30%
Sem renda	0,40%	Sem renda	0,00%
ND	0,40%	ND	10,40%
N= 266	Ocupação	N=77	
Estudante	14,3%	Estudante	9,1%
Do lar	34,2%	Do lar	32,5%
Empregada doméstica	3,8%	Empregada doméstica	5,2%
Desempregada	6,4%	Desempregada	1,3%
Outras Atividades	41,0%	Outras Atividades	50,6%
ND	0,4%	ND.	1,3%
N= 266	Cor/Raça:	N=77	
Branca	70,30%	Branca	63,6%
Preta	17,29%	Preta	19,5%
Parda	11,65%	Parda	15,6%
Amarela	0,38%	Amarela	1,3%
N.I	0,38%	N. I	0,0%

N=266		Estado Civil	N=77
Solteira	21,4%	Solteira	20,8%
Separada	0,0%	Separada	1,3%
Divorciada	0,0%	Divorciada	0,0%
Viúva	0,0%	Viúva	1,3%
Casada	42,9%	Casada	33,8%
Morando Junto	35,0%	Morando Junto	42,9%
N=141		Troca de Parceiro	N=39
Sim	40,40%	Sim	38,50%
Não	59,60%	Não	61,50%
N=266		Tabagismo	N=77
Sim	9,40%	Sim	9,10%
Não	89,80%	Não	90,90%
N.D.	0,80%	ND	0,00%
N=143		Antecedente de PE ou Hipertensão	N=39
Sim	5,60%	Sim	35,90%
Não	93,70%	Não	64,10%
N=266		Proteinúria	N=77
negativo	97,40%	negativo	14,30%
Traço	0,40%	Traço	2,60%
1 +	1,50%	1 +	14,30%
2+	0,40%	2+	31,20%
3+	0,00%	3+	35,10%
4+	0,40%	4+	2,60%
N=266		Via de Parto	N=77
Normal	59,00%	Normal	16,90%
Fórcipe	4,10%	Fórcipe	1,30%
Cesárea	32,70%	Cesárea	79,20%
N.D	4,10%	ND	0,00%
N=266		Paridade	N=77
1º Gestação	44,40%	1º Gestação	49,40%
2º Gestação	27,10%	2º Gestação	16,90%
3º Gestação	12,00%	3º Gestação	11,70%
4º Gestação	6,80%	4º Gestação	7,80%
5º Gestação	4,50%	5º Gestação	5,20%
6º Gestação	2,30%	6º Gestação	5,20%
N.D	3,00%	ND	0,00%

Tabela 8- Comparação dos dados maternos entre gestantes controles e com pré-eclâmpsia. IC, intervalo de confiança; IMC, índice de massa corporal

	Controles		Pré-eclâmpsia		Valor P
	Média	IC (95%)	Média	IC (95%)	
Idade (anos)	24,5	23,,7 - 25,2	26,4	24,8- 28,0	0,0547
Peso Pré Gestacional (kg)	64,0	62,4 - 65,5	66,3	63,3-69,6	0,2556
Altura (m)	1,602	1,60 - 1,62	1,61	1,59 -1,62	0.4529
IMC (kg/m²)	24,6	24,1- 25,1	25,3	24,0 - 26,6	0,1613

Observamos que, na população estudada, o capurro de bebês nascidos das gestantes diagnosticadas com pré-eclâmpsia (35 semanas) foi menor do que nas pertencentes ao grupo controle (38 semanas). (Tabela 9)

Tabela 9: Comparação de dados materno-fetais entre gestantes controles e com pré-eclâmpsia. IG, idade gestacional; IC, intervalo de confiança; RN, recém-nascido

	Controles		Pré-eclâmpsia		Valor P
	Média	IC (95%)	Média	IC (95%)	
Capurro (semanas)	38,5	38,2- 38,8	35,3	34,5- 36,1	P<0.0001
Peso RN (g)	3138	3071- 3205	2304	2082-2525	P<0.0001

Na análise uni e multivariada, foram calculadas as razões de chance (*odds ratio*, OR) para as variáveis idade, altura, peso, tabagismo, antecedente pessoal de pré-eclâmpsia em gestação anterior, troca de parceiro entre gestação prévia e atual, além dos polimorfismos genéticos estudados. A Tabela 10 resume os valores de OR obtidos mostrando a razão de chance para cada fator avaliado.

Tabela 10 – Odds ratio e intervalos de confiança de 95% para fatores de risco para pré-eclâmpsia na população estudada em análise univariada (Valores em negrito foram estatisticamente significativos).

Fator de risco	OR	Intervalo de confiança 95%
Idade (em anos)	1.04	1.01.-1.08
Altura (em metros)	0.98	0.94-1.02
Peso (em kg)	1.00	1.00-1.00
Tabagismo	0.96	0.33-2.40
Antecedente de pré-eclâmpsia	9.21	3.22-28.26
Troca de parceiro	0.92	0.41-2.01
MMP2 (-1306C>T)	0.85	0.09-7.68
MMP9 (-1572C>T)	1.22	0.13-11.91
eNOS (-894G>T) Modelo recessivo TTxGT+GG	2.87	1.21-6.83
eNOS (-786T>C) Modelo recessivo CC x TC+TT	3.06	1.37-6.87

Em nosso estudo, o principal fator de risco clínico para pré-eclâmpsia foi o antecedente pessoal de pré-eclâmpsia em gestação prévia, com um OR de 9.21 (IC 95%: 3.22-28.26), porém esse dado só é possível obter das gestantes não-primigestas. A idade foi detectada como um fator de risco menor, com OR 1.04 (IC 95% 1.01-1.08) para cada ano de idade.

Para os fatores de risco genéticos, detectou-se que apenas os polimorfismos do gene *eNOS* se associaram significativamente ao risco de desenvolver pré-eclâmpsia. Na análise multivariada, o único polimorfismo que continuou sendo estatisticamente significativo para o risco de pré-eclâmpsia após correção para idade, altura e peso, e que era independente dos demais polimorfismos, foi o *eNOS* -786T>C, com um OR de 3.56 (IC 95%: 1.23-10.31).

A partir desse resultado, foi realizada a análise por subgrupo de gravidade, em que foram analisadas somente as gestantes com pré-eclâmpsia.

De acordo com os dados clínicos e classificações de gravidade, as gestantes foram divididas em 4 subgrupos: Gestante com pré-eclâmpsia sem complicação; Gestante com pré-eclâmpsia com necessidade de terapia de Sulfato de Magnésio; Gestante com síndrome HELLP; e Gestante com eclâmpsia. Na Figura 8, está representada a distribuição dos genótipos em para os subgrupos.

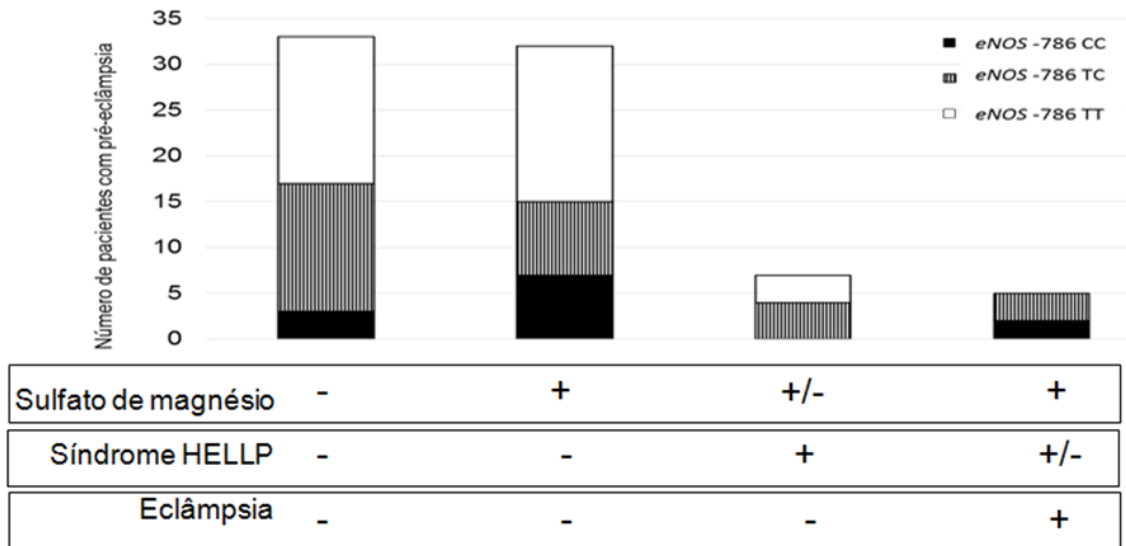


Figura 8: Gráfico de distribuição do Polimorfismo *eNOS* – 786 T<C associado a gravidade.

Foi detectada associação do polimorfismo *eNOS* -786T>C com a ocorrência de HELLP ou eclâmpsia ($P=2,25 \times 10^{-7}$, teste χ^2), com um OR de 12,76 (intervalo de confiança de 95% 1,53- 23,99, $P=0,029$) em um modelo de análise dominante TT x CT+CC. Ou seja, a presença de pelo menos um alelo polimórfico se associou a uma chance 12,76 vezes maior de ocorrer HELLP ou eclâmpsia entre as pacientes já diagnosticadas com pré-eclâmpsia.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo, foram avaliados fatores de risco clínicos e genéticos para a pré-eclâmpsia em uma população brasileira em uma coorte prospectiva.

A coleta de amostras foi irregular durante o tempo do estudo (dependente da presença de financiamento e atuação dos pesquisadores principais envolvidos) e não reflete o total de casos de pré-eclâmpsia diagnosticados no CAISM, mesmo assim, os números confirmam que a pré-eclâmpsia representa uma morbidade materna relevante na população atendida pelo Hospital, tendo sido recrutadas 77 gestantes durante o período do estudo. Em relação ao impacto dessa doença na evolução da gestação, observou-se que a idade gestacional foi menor para mulheres com diagnóstico de pré-eclâmpsia, um maior percentual de pacientes com pré-eclâmpsia foram submetidas ao parto cesárea, e que os neonatos apresentaram-se com maturidade menor e menor peso ao nascimento nas gestantes diagnosticadas com a doença. Isso reforça a importância de se diagnosticar a pré-eclâmpsia, e o potencial de complicações maternas e fetais que a pré-eclâmpsia representa. É importante destacar que, no hospital em que as pacientes foram atendidas, o parto cesárea não é indicado conforme a preferência da paciente, sem que haja indicação médica e, portanto, serve como um marcador indireto de complicações no período perinatal. Esses resultados corroboram que a pré-eclâmpsia precipita nascimentos mais prematuramente e leva ao desenvolvimento de complicações, indicando hospitalização da mãe antes da idade gestacional de termo usual.

O tamanho amostral calculado inicialmente foi maior do que obtido, pois, após 3 anos de recrutamento, optou-se por encerrar o estudo. Entretanto, mesmo com um valor inferior ao calculado, os números de gestantes ainda obedecem a proporcionalidade de 3 controles para um caso. Embora o número reduzido de sujeitos possa interferir no poder estatístico para a identificação dos polimorfismos e sua associação com pré-eclâmpsia, ainda assim esse estudo tem um dos maiores números amostrais dentre os diversos trabalhos publicados no mundo sobre o tema. (119).

Em relação aos fatores de risco clínicos para pré-eclâmpsia, nossa análise mostrou que o principal fator de risco clínico foi a história pessoal de pré-eclâmpsia em gestação anterior, com um OR de 9,21 (95% de confiança intervalo: 3,22-28,26). Isso confirma dados prévios de literatura, mas também destaca a

difficuldade de se identificar gestantes suscetíveis à pré-eclâmpsia logo na primeira gravidez. Uma limitação de nosso estudo é a exclusão de gestantes portadoras de outros fatores clínicos conhecidos por predispor a pré-eclâmpsia, tais como gestação múltipla, hipertensão crônica, doenças autoimunes etc., de forma que nossa população não é adequada para comparar a importância do antecedente pessoal de pré-eclâmpsia com outras comorbidades que também predispoem a essa doença.

Embora a idade tenha sido identificada com um fator de risco, a magnitude dessa influência foi pequena em números absolutos por se tratar de uma variável contínua, com OR de 1.04, porém correspondente a uma chance 4% maior de pré-eclâmpsia por ano de vida. Isso possivelmente se deve à seleção aleatória de mulheres um pouco mais velhas no grupo de pré-eclâmpsia, embora a diferença de idade entre os grupos não tenha sido estatisticamente significativa.

Entre os fatores de risco genéticos, verificou-se que apenas os SNPs que afetam o gene da *eNOS* foram significativamente associados com o risco de desenvolvimento de pré-eclâmpsia. Ao realizar a análise multivariada, o polimorfismo 894G>T perdeu a significância. Nossos dados concordam com encontrados em uma recente meta-análise, que mostra dados de vários trabalhos no mundo. Nessa metanálise, após nova análise estatística com os dados dos trabalhos considerados, foi demonstrada uma associação do polimorfismo -786T>C com a pré-eclâmpsia, particularmente em populações de origem europeia (119).

Nas tabelas 11 e 12 adaptadas dessa mesma metanálise, pode-se observar, em verde, os dados de nosso estudo, e em negrito, os trabalhos com que foi encontrada associação do polimorfismo com a doença. Em ambas tabelas, é possível verificar semelhança entre as frequências dos polimorfismos do gene da *eNOS* obtidas nesse estudo e por outros grupos, embora a distribuição genotípica tenha sido relativamente diferente de dois trabalhos realizados em uma outra população no Brasil (trabalhos de Sandrim e colaboradores).

Tabela 11: Comparação entre estudos de associação genética com pré-eclâmpsia para o polimorfismo *eNOS* 894T>G

eNOS Glu-298→Asp (894G→T)

			Controle					Caso				
			N	GG	TG	TT	Freq Alelo Maior (G)	N	GG	TG	TT	Freq Alelo Maior (G)
Autor	Ano	País										
Leonardo DP	2015	Brasil	263	149	101	13	76%	77	42	25	10	71%
Serrano NC	2004	Colômbia	522	403	113	6	88%	322	217	84	21	80%
Hillermann	2005	África do Sul	42	33	8	1	88%	58	41	16	1	84%
Fatini C	2006	Itália	106	49	48	9	69%	106	42	50	14	63%
Sandrim VC	2008	Brasil	110	62	40	8	75%	113	62	46	5	75%
Yoshimura T	2003	Japão	119	77	38	4	81%	112	72	35	5	80%
Hakli T	2003	Finlândia	113	52	49	12	68%	132	73	51	8	75%
Yu CK	2006	Inglaterra	349	198	125	26	75%	81	60	16	5	84%
Kim YJ	2008	Coreia	225	188	35	2	91%	232	192	31	9	89%
Sandrim VC	2010	Brasil	107	52	46	9	70%	98	55	35	8	74%
Aggarwal PK	2010	Índia	117	74	39	4	80%	120	83	32	5	83%
Zdoukopoulos K	2011	Grécia	186	68	94	24	62%	102	47	38	17	65%

Tabela 12: Comparação entre estudos de associação genética com pré-eclâmpsia para o polimorfismo *eNOS* -786T>C

eNOS -786(T→C)

			Controle					Caso				Freq Alelo Maior (T)
			n	TT	TC	CC	Freq Alelo Maior (T)	n	TT	TC	CC	
Autor	Ano	País										
Leonardo DP	2015	Brasil	264	131	118	15	72%	77	36	29	12	66%
Drews K	2008	Polônia	226	82	112	32	61%	150	42	73	35	52%
Drews K	2011	Polônia	400	153	201	46	63%	218	64	116	38	56%
Sandrim VC	2008	Brasil	110	45	52	13	65%	113	54	49	10	69%
Aggarwal PK	2010	Índia	118	74	40	4	80%	120	80	35	5	81%
Fatini C	2006	Itália	106	45	46	15	64%	106	35	45	26	54%
Kim YJ	2008	Coreia	236	185	46	5	88%	218	176	39	3	90%
Sandrim VC	2010	Brasil	107	43	52	12	64%	98	46	43	9	69%
Zdoukopoulos K	2011	Grécia	176	62	49	65	49%	102	37	51	14	61%
Ozturk E	2011	Turquia	60	42	18	0	85%	108	57	28	23	66%

No presente estudo, não foi detectada associação da ocorrência de pré-eclâmpsia com SNPs nos genes que codificam MMP-2 e MMP-9. Isso confirma observações anteriores (120-123), porém a diferença na expressão de MMP observada em associação com esses SNPs pode ainda assim ser relevante (110-124). É possível que variações nas MMPs sejam importantes mais diretamente no processo de invasão das artérias espiraladas, que é realizado pelos trofoblastos.

Uma vez que o trofoblasto contém DNA fetal, cuja origem é 50% de origem paterna, o genótipo do trofoblasto pode ser diferente do materno. Isso implica que a produção local de MMP possa ser regida pelo genótipo fetal, e não pela produção materna de MMPs. Dessa forma, seria interessante desenhar novos estudos que possam abordar a investigação de uma possível associação de pré-eclâmpsia com SNPs de origem paterna.

Embora a variação dos genótipos para o VNTR no íntron 4 não tenha se associado com pré-eclâmpsia, encontramos uma grande variedade de alelos em nossa população, com o aparecimento do alelo raro com 6 repetições, e uma frequência mais elevada do alelo com 4 repetições entre os controles. Isso corrobora que o Brasil tem uma população com ampla mistura genética (125-126) e a presença dessa variedade de alelos pode ser explicada por uma composição populacional historicamente multiétnica.

Na análise multivariada, o único SNP que permaneceu estatisticamente significativo para chance de pré-eclâmpsia após correção para idade, altura e peso, e que foi independente de outros polimorfismos, foi o *eNOS* -786T>C, com um OR 3.56 (IC 95%: 1,23-10,31). A ausência de associação do SNP 894G>T com pré-eclâmpsia nesse e em outros estudos pode derivar de diferenças de tamanho amostral, antecedentes genéticos mais mistos, ou diferentes critérios de inclusão, embora isso tenha sido confirmado na metanálise de Dai e colaboradores (119). Em relação aos critérios de inclusão, em nosso estudo, incluímos todas as pacientes com pré-eclâmpsia, independentemente da gravidade, enquanto alguns estudos utilizaram apenas o espectro mais grave da doença, com pressão arterial acima de 160/100mmHg.

Outro estudo na população brasileira encontrou uma associação de um haplótipo contendo 894G>T com pré-eclâmpsia que ocorreu após 34 semanas de gestação, mas ambas as análises de haplótipos em relação ao tempo de aparecimento e ocorrência de pré-eclâmpsia incluíram também a co-herança do alelo -786C (127), o que confirma nosso principal achado.

Foi previamente demonstrado que o polimorfismo *eNOS* -786T>C reduz a expressão de RNAm de *eNOS* na placenta (128). Portanto, esse SNP pode resultar em deficiência da enzima *eNOS* com reduzida biodisponibilidade do NO no tecido placentário, aumentando a vasoconstrição local e favorecendo a ocorrência de isquemia e hipóxia tecidual. Associado ao quadro da pré-eclâmpsia já instalado, isso

poderia levar a um ciclo que se retroalimenta, em que uma menor biodisponibilidade de NO ocasionada pela lesão endotelial, juntamente com síntese reduzida devido ao polimorfismo, poderiam resultar num quadro mais grave da doença. Um estudo apóia a hipótese de pré-eclâmpsia mais grave em associação com esse SNP (129), e nossos dados corroboram um aspecto adicional, já que o polimorfismo *eNOS* -786T>C foi particularmente associado com a ocorrência de síndrome HELLP e eclâmpsia, complicações importantes da pré-eclâmpsia.

De acordo com recomendações mais recentes de especialistas em análise de causalidade de variantes genéticas, tomando em conjunto nossos dados de análise genética e evidências anteriores na literatura científica (130), podemos sugerir que esse SNP não estaria apenas associado, mas implicado na patogênese e gravidade da pré-eclâmpsia.

Uma limitação desse estudo foi não ter realizado a medição de NO ou dos seus metabolitos em amostras de sangue para correlacionar com os genótipos e confirmar a hipótese de que há associação de baixa biodisponibilidade de NO com os genótipos determinados.

A deficiência de NO também pode exacerbar a ativação das plaquetas. Isso favoreceria a formação de microtrombos na circulação, gerando a base fisiopatológica para a ocorrência de anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia, componentes típicos da síndrome HELLP. A hemólise intravascular cursa com liberação da hemoglobina livre, que consome rapidamente NO disponível, tornando seus níveis ainda mais baixos, piorando a vasoconstrição e hipóxia tecidual. Assim, a associação do polimorfismo *eNOS* -786T>C com pré-eclâmpsia favorece fisiopatologicamente a ocorrência de síndrome HELLP e aponta para um importante papel do NO na fisiopatologia da doença.

Dessa forma, estratégias terapêuticas farmacológicas que melhorem a biodisponibilidade do NO podem ser úteis no futuro e merecem ser investigadas como possíveis novos tratamentos de formas graves de pré-eclâmpsia, como prevenção de complicações de pré-eclâmpsia instalada, ou ainda, potencialmente, para evitar pré-eclâmpsia em pacientes de maior risco para a doença. O conhecimento de genótipos de maior risco para pré-eclâmpsia pode representar um importante avanço em direção à prevenção e diagnóstico mais precoce dessa doença, e estudos futuros devem levar em consideração a variabilidade genética dessas pacientes.

7. CONCLUSÕES

- Nesse estudo, não foi encontrada associação dos polimorfismos investigados nos genes *MMP-2* e *MMP-9* com a ocorrência de pré-eclâmpsia;
- Dentre os polimorfismos estudados do gene *eNOS*, somente o polimorfismo *eNOS* -786T>C foi associado com a doença, demonstrando ser o fator genético mais importante para a ocorrência da pré-eclâmpsia, independentemente dos demais dados clínicos e SNPs analisados;
- Esse estudo também sugere a associação desse polimorfismo com a gravidade da doença, por sua associação com a ocorrência de síndrome de HELLP ou de eclâmpsia entre as pacientes diagnosticadas com pré-eclâmpsia;
- Essas associações sugerem um papel importante da produção de óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e suas complicações.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin 10. Perinatol.* 2009;33(3):130-7.
2. Villar J, Aleem HÁ, Merialdi M, Mathai M, Ali MM, Zavaleta N, et al. World Health Organization randomized trial of calcium supplementation among low calcium intake pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:639-49
3. Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, Magee LA, de Groot CJ, Hofmeyr GJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2015. doi:10.1016/S0140-6736(15)00070-7
4. Brasil. Ministério da Saúde. DATASUS [Internet]. Informações de 11. Saúde. Estatísticas vitais. Mortalidade e nascidos vivos: óbitos maternos. 2015 [julho 2015]. Disponível em <<http://www2.datasus.gov.br>>
5. Gynecologists ACoOa, Pregnancy TFoHi. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013;122(5):1122-31.
6. Myatt L, Redman CW, Staff AC, Hansson S, Wilson ML, Laivuori H, Poston L, Roberts JM; Strategy for standardization of preeclampsia research study design. Global Pregnancy CoLaboratory .Hypertension. 2014 Jun; 63(6) :1293-301
7. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas: Gestação de alto risco: manual técnico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – 5. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2012.
8. Vega CGB, Calderon JM. Classification de lós transtornos hipertensivos Del embarazo.In: Gardunõ JCB, Fuentes AR. Preeclampsia.México: Alfil S.A de C. V. Academia mexicana de cirurgia.2010,Cap-5.
9. Kurtzman NA. Introduction: New developments in preeclampsia. *Semin Nephrol* 2004; 24(6): 537-39.
10. Junior MDC, Aguiar RALP, Correa MD. Fisiopatologia da pré-eclampsia: aspectos atuais. *Femina.* 2009; 37: 247-253
11. Bulletins-Obstetrics ACoP. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol.* 2002;99(1):159-67

12. World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:80.
13. Giordano JC, Parpinelli MA, Cecatti JG, Haddad SM, Costa ML, Surita FG, Pinto E Silva JL, Sousa MH. The burden of eclampsia: results from a multicenter study on surveillance of severe maternal morbidity in Brazil. *PLoS One*. 2014. May 13;9(5):e97401
14. Ronsmans C, Campbell O (2011) Quantifying the fall in mortality associated with interventions related to hypertensive diseases of pregnancy. *BMC Public Health* 11 Suppl 3: S8.
15. Morriss MC, Twickler DM, Hatab MR, et al. Cerebral blood flow and cranial magnetic resonance imaging in eclampsia and severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1997; 89: 561.
16. Chesley LC. Hypertensive disorders in pregnancy. New York: Appleton- Century-Crofts, 1978 *apud* Bell, MJ. Historical Overview of Preeclampsia-Eclampsia. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2010 Sep; 39(5): 510–518.
17. Sibai BM. 2005. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet. Gynecol*. 105:402–10
18. Young BC, Levine, RJ Karumanchi SA Pathogenesis of Preeclampsia *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2010. 5:173–192
19. Livingston JC, Livingston LW, Ramsey R, Mabie BC, Sibai BM. Magnesium sulfate in women with mild preeclampsia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 217-220.
20. Pritchard JA, Weisman RJ, Rotnoff OD, Vosburgh GJ. Intravascular hemolysis, thrombocytopenia and other hematologic abnormalities associated with severe toxemia of pregnancy. *N Engl J Med* 1954; 250(3): 89-98.
21. Satpathy HK, Satpathy C and Donald F. Hellp syndrome: Review Article. *J Obstet Gynecol India* Vol. 59;1 :2009.
22. Rodrigues CIS, Neto LFS, Almeida FA. Hipertensão Arterial na Gravidez. In: Brandão et al. *Hipertensão*. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Capítulo 14.5
23. Sibai B. Eclampsia. Maternal-perinatal outcome in 254 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(3):1049-54.
24. Rahman TM, Wendon J. Severe hepatic dysfunction in pregnancy. *QJM* 2002; 95: 343-357.

25. Pokharel SM¹, Chattopadhyay SK, Jaiswal R, Shakya P. HELLP syndrome-a pregnancy disorder with poor prognosis. *Nepal Med Coll J.* 2008 Dec;10(4):260-3.
26. Silva FRO, Souza EV, Sass N. Síndromes Hipertensivas na gestação: Classificação e Padronizações. In: Sass N, Camano C, Moron AF. *Hipertensão Arterial na Gravidez.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, Cap 1
27. Calderon JM and Carbajal NPG. Factores de riesgo de la preeclampsia. In: Gardunõ JCB, Fuentes AR. *Preeclampsia.* México: Alfil S.A de C. V. Academia mexicana de cirugía, 2010- Cap. 4
28. Amaral WT and Peraçoli JC. Factores de risco relacionados à pré-eclâmpsia. *Com. Ciências Saúde.* 2011- (22): S153-S160,
29. Carr D, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR Critchlow CW A sister's risk: Family history as a predictor of preeclampsia *American Journal of Obstetrics and Gynecology* . 2005- 193, 965–72
30. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for preeclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.* 2005;330(7491):565-71
31. Van Oostwaard MF, Langenveld J, Schuit E, Papatsonis DN, Brown MA, Byaruhanga RN, et al. Recurrence of hypertensive disorders of pregnancy: an individual patient data metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 May;212 (5):624.e1-17
32. Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J, et al. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med.* 2001;344(12):867-72.
33. Lie RT, Rasmussen S, Brunborg H, Gjessing HK, Lie-Nielsen E, Irgens LM. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. *BMJ.* 1998;316(7141):1343-7.
34. Dekker GA. Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 1999; 42:422.
35. Karumanchi, SA. Kee-Hak L Kee-Hak L Phyllis A. *Preeclampsia: Pathogenesis.* UptoDate. 2014
36. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *The Lancet* 2001; 357: 53-56.
37. Ziegel, E, Cranley, MS. *Enfermagem obstétrica.* 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 1985.
38. Duffus GM, MacGillivray I. The incidence of preeclamptic toxemia in smokers and non-smokers. *Lancet* 1968;1:994-5.

39. Sibai, B.M., Gordon, T., Thom, E., Caritis, S.N., Klebanoff, M., McNellis, D. et al., Risk factors for pré-eclâmpsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal–Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172:642–648.
40. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; 11: 49-658.
41. Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for pré-eclâmpsia in multiparas. *Epidemiology* 1996; 7: 240-44.
42. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today.* 1993;14(7):353-6
43. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308(5728):1592-4.
44. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1974; 4(1 Suppl):S113.
45. Montanari T. Embriologia Texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre: UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial. 2013 cap. 5 Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/livrodeembrio/>>
46. Espinoza J, Romero R, Kim YM, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, Gabor N. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy *J. Perinat. Med.* 34 (2006) 447–458
47. Garcia SL, Longato SE Pasquini T, Ribeiro RG; Cruz, MS; Ribeiro, DG Fisiopatologia da plré-eclâmpsia. *RBM rev. bras. med;*67(1/2), jan.-fev. 2010
48. Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology* 2014. 10,466–480
49. Cavalli RC, Sandrin VC, Santos JET, Duarte G. Predição de pré-eclampsia. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009; 31(1):1-4
50. Bell MJ. A Historical overview of Preeclampsia-Eclampsia. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2010.510-518

51. Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1994 101:669-74.
52. Huppertz B. Placental Origins of Preeclampsia: Challenging the Current Hypothesis Hypertension. 2008;51:970-975;
53. Kahhale, S, Zugaib, M. Síndromes hipertensivas da gravidez. Rio de Janeiro: Ateneu, 1995.
54. Booth JA . A short history of blood pressure measurement. *Proc R Soc Med* 1977;70:793-9 *apud* Lindheimer MD. Historical perspective: The history of Pré-eclâmpsia and Eclampsia as Seen by Nephrologist. *Clinical Review*. 2013.
55. Young BC, Levine, RJ Karumanchi SA Pathogenesis of Pré-eclâmpsia *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2010. 5:173–192
56. Myatt L, and Webster, RP. Vascular biology of preeclampsia. *J. Thromb. Haemost.* 2009. 7, 375–384.
57. Sánchez-Aranguren L, Prada CE, Riaño-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: role of oxidative stress. *Front. Physiol.*, 10 October 2014
58. Oliveira LG; Karumanchi A; Sass N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* vol.32 n.12. Rio de Janeiro. 2010
59. Roberts JM. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin Perinatol* 2000;24:24-8.
60. Coelho TM, Martins MG, Vianna E, Mesquita MR, Camano L, Sass N. Proteinuria in hypertensive syndrome of pregnancy: maternal and perinatal outcome. *Rev Assoc Med Bras* 2004;50:207-13.
61. Holt JL, Mangos GJ, Brown MA. Measuring protein excretion in pregnancy. *Nephrology (Carlton)* 2007;12:425-30.
62. Facca TA, Kirsztajn GM and Sass N. Pré-eclâmpsia (indicador de doença renal crônica): da gênese aos riscos futuros / Pré-eclâmpsia (marker of chronic kidney disease): from genesis to future risks. *J. Bras. Nefrol.*; 34(1); 87-93; 2012-03
63. Spargo BH, Lichtig C, Luger AM, Katz AI, Lindheimer MD. The renal lesion in preeclampsia. *Perspect Nephrol Hypertens* 1976;5:129-37.

64. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, Baschat AA. Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol.* 2007::257-266.
65. Nisell H, Lintu H, Lunell NO, Mollerstrom G, Pettersson E. 1995. Blood pressure and renal function seven years after pregnancy complicated by hypertension. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 102:876–81
66. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785–99
67. Valdés G, Quezada F, Marchant E, et al. Association of remote hypertension in pregnancy with coronary artery disease: a case-control study. *Hypertension* 2009;53:733-8.
68. Wilson BJ, Watson MS, Prescott GJ, Sunderland S, Campbell DM, Hannaford P, et al. Hypertensive diseases of pregnancy and risk of hypertension and stroke in later life: results from cohort study. *BMJ* 2003;326:845-9.
69. Kajantie E, Eriksson JG, Osmond Clive, Thrburn K, Barker DJ. Pre-eclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring. *Stroke* 2009;40:1176-80.
70. Lachmeijer AM, Arngrimsson R, Bastiaans EJ. Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamins status in women with a history of pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:394-402.
71. Morgan L, Crawshaw S, Baker PN. Maternal and fetal angiotensinogen gene allele sharing in preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; 106:244-251.
72. Kosmas IP, Tatsioni A, Ioannidis JP. Association of Leiden mutation in factor V gene with hypertension in pregnancy and preeclampsia: a meta-analysis. *J Hypertens* 2003; 21:1221-8.
73. Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 2003, 361:865-72.
74. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993;268:17478–88.
75. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol.* 1996;51(4):383-94.
76. Salimi S. The Association of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Preeclampsia Susceptibility Gene Cell Tissue. 2015 January; 2(1): e26869.

77. Noris M, Todeschini M, Cassis P, et al. L-Arginine Depletion in Preeclampsia Orients Nitric Oxide Synthase Toward Oxidant Species. *Hypertension* 2004;43:614-622
78. Olarte et al. Participación de factores genéticos en la etiología de La preeclampsia. In: .In: Gardunõ JCB, Fuentes AR. Preeclampsia. México: Alfil S.A de C. V. Academia mexicana de cirugía, 2010. Capítulo 11.
79. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*. 2003; 361:1511–1517.
80. Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 113:17–20.
81. Wang, X.L., Sim, A.S., Badenhop, R.F., McCredie, R.M. & Wilcken, D.E. (1996) A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat. Med.*, 2, 41-45
82. Hingorani, A.D., Liang, C.F., Fatibene, J., Lyon, A., Monteith, S., Parsons, A., Haydock, S., Hopper, R.V., Stephens, N.G., O'Shaughnessy, K.M. & Brown, M.J. (1999) A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 100, 1515-1520.
83. Nakayama, M., Yasue, H., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Ogawa, H., Kugiyama, K., Mizuno, Y., Harada, E., Nakamura, S., Ito, T., Saito, Y., Miyamoto, Y., Ogawa, Y. & Nakao, K. T(-786)→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am. J. Cardiol.* 2000. 86, 628-634.
84. Sladek SM, Magness RR, Corad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272:R441-463.
85. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet*. 1998 Jul;103(1):65-9.

86. Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension* 2001; 38:1289-93.
87. Casas JP, Bautista LE, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Ischemic Heart Disease: Meta-Analysis of 26 Studies Involving 23028 Subjects. *Circulation* 2004; 109:1359-1365.
88. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Okamura H: Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 7:238-41.
89. Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M, Okamura H: Genetic and Environmental Contributions to Severe Preeclampsia: Lack of Association with the Endothelial Nitric Oxide Synthase Glu298Asp Variant in a Developing Country. *Gynecol Obstet Invest* 2003; 56:10-3.
90. Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E, Ebina Y, Fujimoto S. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet* 2001; 103:241-4.
91. Hakli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2003; 10:154-7.
92. Landau R, Xie HG, Dishy V, Wood AJ, Stein CM, Smiley RM: No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens* 2004; 17:391-4.
93. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa M, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, Vallance P, López- Jaramillo P: Endothelial Nitric Oxide Synthase Genotype and Risk of Preeclampsia: a multi-centre case-control study. *Hypertension* 2004; 44:702-707.
94. Yu CKH, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *BMC Preg Childb* 2006, 6:7.
95. Nakayama T, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-C mutation in the 50-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999; 99:2864-2870.

96. Myamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(18):2629-37.
97. Wang Y, Kikuchi S, Suzuki H, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects the progression of renal failure in nondiabetic renal diseases. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:2898–2902.
98. Myamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3–8.
99. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 1998;32:521–526
100. Tantawy AA, Adly AA, Ismail EA, Aly SH. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Intron 4 VNTR Polymorphism in Sickle Cell Disease: Relation to Vasculopathy and Disease Severity. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Mar;62(3):389-94
101. Thomas BN, Thakur TJ, Yi L, Guindo A, Diallo DA, Ott J. Extensive Ethnogenomic Diversity of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Polymorphisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 2013:7
102. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 1999; 85:906-911.
103. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000; 87:670-676.
104. Guimarães D, Rizzi E, Ceron CS1, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Santos JET. Inibição de metaloproteínas da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Rev Bras Hipertens* vol.17(4):226-230, 2010.
105. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996
106. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension.* 1991;17(5):707-19.

107. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med.* 2005;146(3):160-73.
108. Lerman LO, Chade AR. Atherosclerotic process, renovascular disease and outcomes from bench to bedside. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15(6):583-7.
109. Narumiya H, Zhang Y, Fernandez-Patron C, Guilbert LJ, Davidge ST. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. *Hypert Preg* 2001; 20:185-194.
110. Myers JE, Merchant SJ, Macleod M, Mires GJ, Baker PN, Davidge ST. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. *Hypert Preg.* 2005; 24(2):103-15
111. Price, S.J., Greaves, D.R., Watkins, H., 2001. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J.Biol. Chem.* 276, 7549–7558.
112. Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfield P, Vial Y, Witkin SS, Gerber S Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk *Journal of Reproductive Immunology* 74 (2007) 143–151
113. Zhang J, Gruber BL, Marchese MJ, Zucker S, Schwartz LB, Kew RR. Mast cell tryptase does not alter matrix metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts: further evidence that proteolytically-active tryptase is a potent fibrogenic factor. *J Cell Physiol.* 1999; 181(2):312-8.
114. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003; 107(12):1579-85.
115. Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *J Mol Med* 2003; 81(5):321-6.
116. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, Mattila KM, Koivula T, Lehtimäki T. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(9):1446-50.
117. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo demográfico. Pesquisa nacional por amostra de domicílio. Rio de Janeiro, 2000.

118. Davis LG; Dibner MD; Battey JF. Basic Method in Molecular Biology. Londres: Elsevier, 1986. p. 388-338.
119. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene*. 2013;519(1):187-93.
120. Palei AC¹, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Effects of matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms on responsiveness to antihypertensive therapy of women with hypertensive disorders of pregnancy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012.
121. Palei AC², Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Duarte G, et al. Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(2):217-21.
122. Palei AC³, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma MMP-9 levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(6):489-98
123. Luizon MR, Sandrim VC, Palei AC, Lacchini R, Cavalli RC, Duarte G, et al. Epistasis among eNOS, MMP-9 and VEGF maternal genotypes in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res*. 2012;35(9):917-21
124. Rahimi Z, Aghaei A, Vaisi-Raygani A. AT2R -1332 G:A polymorphism and its interaction with AT1R 1166 A:C, ACE I/D and MMP-9 -1562 C:T polymorphisms: risk factors for susceptibility to preeclampsia. *Gene*. 2014;538(1):176-81
125. Rodrigues de Moura R, Coelho AV, de Queiroz Balbino V, Crovella S, Brandão LA. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol*. 2015
126. Bonifaz-Peña V, Contreras AV, Struchiner CJ, Roela RA, Furuya-Mazzotti TK, Chammas R, et al. Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. *PLoS One*. 2014;9(11):e112640
127. Alpoim PN, Gomes KB, Pinheiro MeB, Godoi LC, Jardim LL, Muniz LG, et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2014;42:19-23

- 128.** Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett.* 2000;471(1):45-50
- 129.** Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Sieroszewski P, Grześkowiak E, Mrozikiewicz P. The significance of -786T > C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(3):432-6.
- 130.** MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014;508(7497):469-76.

9 APÊNDICES

9.1. Check List

	SIM	NÃO
Gestante (gestação única)	☐	☐
Idade gestacional ≥ 20 semanas	☐	☐
Nega co-morbididades (hipertensão crônica ou gestacional, diabetes, doenças do colágeno, infecções crônicas, tireoidopatias)	☐	☐
Grau de compreensão adequado frente aos questionamentos do pesquisador	☐	☐

Se todas as questões forem respondidas como “SIM”, o sujeito será incluído no estudo.

9 2. Ficha para coleta de dados

☐ CONTROLE

☐ PRÉ-ECLÂMPsia

Nome:

Ficha Nº [] [] [] []

Idade [] [] anos

HC [] [] [] [] [] [] [] - []

Paridade: G[] PV[] C[] A[]

Ocupação []

Idade Gestacional [] [] semanas e [] dias

Peso pré-gestacional [] [] [] , [] Kg.

Altura [] , [] [] m.

Raça [] branca

Escolaridade _____ anos

[] preta

[] amarela

[] indígena

[] outra

Tabagismo [] Sim

[] Não

Renda familiar R\$ [] [] [] [] [] [] []

Estado Marital [] solteira

[] viúva

[] outro

[] separada

[] casada

[] divorciada

[] morando junto

Se gestação prévia, houve troca de parceiro ☐ Sim ☐ Não

Antecedente de Pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional

☐ Sim ☐ Não ☐ Não se aplica

Exames

Fita urinária ☐ negativa ☐ traços de proteína ☐ 1+ ☐ 2+ ☐ 3+

Proteinúria de 24horas ☐ . ☐ ☐ ☐ g/24h

Dados do parto

Idade Gestacional de admissão para o parto ☐ ☐ semanas e ☐ dias

Via de Parto ☐ Parto Normal ☐ Parto Fórcepe ☐ Parto Cesárea

Peso RN ☐ ☐ ☐ ☐ ☐ gramas

Capurro ☐ ☐ semanas e ☐ dias

Apgar ☐ 1º minuto e ☐ 5º minuto

9.3 – Consentimento Livre e Esclarecido

Associação dos polimorfismos dos genes da óxido nítrico sintase e metaloproteínas da matriz extracelular com a pré-eclâmpsia.

Pesquisador: Maria Laura Botelho Costa

Nome:

Idade: [] [] anos RG:..... HC: [] [] [] [] [] [] – []

Endereço.Rua:..... No

Bairro Cidade

Telefone:.....Contato:.....

Gostaria de convidá-la a participar de um estudo no CAISM - UNICAMP, para conseguir melhores informações a respeito de fatores de risco genéticos e a pré-eclâmpsia, ou seja, o aumento da pressão arterial durante a gestação.

Caso concorde em participar deste estudo, você irá responder um pequeno questionário, terá 8mL de sangue colhido de um dos braços e os dados de seu seguimento e parto serão coletados a partir do seu prontuário médico (pasta de atendimento), com garantia de manutenção do sigilo dos seus dados pessoais. O sangue deve ser utilizado para a realização de exames de detecção daquilo que se chama polimorfismos (–790 T/G e –1306 C/T do gene da MMP-2, –1562 C/T do gene da MMP-9, Glu298Asp e –786 T/C do gene da eNOS). Esse sangue poderá ser guardado por um período de até 5 anos. Se decidirem fazer algum outro exame no seu sangue, você será contatada novamente para poder dar sua autorização.

Você poderá decidir sair do estudo a qualquer momento e isto não vai prejudicar o seu acompanhamento no CAISM. Além disso, sempre que tiver alguma dúvida sobre o estudo, poderá procurar um dos pesquisadores no Tel:3521-9232, em horário comercial. Em caso de reclamações sobre qualquer procedimento da pesquisa, poderá procurar a secretaria do Comitê de Ética da FCM - UNICAMP, Tel: (19) 3521-8936.

.....

.....

Assinatura do sujeito

Assinatura do pesquisador

Campinas,..... / /

10. Anexo

10.1 Aprovação do comitê de ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 20/07/10
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 502/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0385.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE E METALOPROTEINASES DA MATRIZ EXTRACELULAR COM A PRÉ-ECLÂMPsia”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Maria Laura Botelho Costa

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/06/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 20/07/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Determinar a presença do polimorfismo nos genes das MMPs e da eNOS comparativamente entre gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia.

III - SUMÁRIO

Estudo caso-controle, com tamanho amostral de 600 mulheres, sendo 150 casos de pré-eclâmpsia e 450 controles. Análise dos Dados: Inicialmente os casos e controles serão comparados quanto às características gerais pelas variáveis de controle utilizando o teste de qui-quadrado para as variáveis qualitativas e o t de Student para as quantitativas. A ocorrência de polimorfismos dos genes estudados será estudada nos dois grupos, inicialmente por análise bivariada e depois por análise multivariada por regressão logística não condicional, estimando-se os respectivos OR e IC95% para investigar a associação com pré-eclâmpsia.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

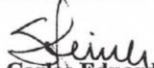
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na VI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de junho de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP

10.2 Artigo publicado



RESEARCH ARTICLE

Association of Nitric Oxide Synthase and Matrix Metalloprotease Single Nucleotide Polymorphisms with Preeclampsia and Its Complications

Daniela P. Leonardo¹, Dulcinéia M. Albuquerque¹, Carolina Lanaro¹, Letícia C. Baptista¹, José G. Cecatti², Fernanda G. Surita², Mary A. Parpinelli², Fernando F. Costa¹, Carla F. Franco-Penteado¹, Kleber Y. Fertrin^{1,3†*}, Maria Laura Costa^{2†}

1 Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil, **2** Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Medicine, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil, **3** Department of Clinical Pathology, School of Medicine, University of Campinas—UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

† Denotes shared last authorship

* fertrin@unicamp.br



Click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Leonardo DP, Albuquerque DM, Lanaro C, Baptista LC, Cecatti JG, Surita FG, et al. (2015) Association of Nitric Oxide Synthase and Matrix Metalloprotease Single Nucleotide Polymorphisms with Preeclampsia and Its Complications. *PLoS ONE* 10(8): e0136693. doi:10.1371/journal.pone.0136693

Editor: Carlos Zaragoza, University Francisco de Vitoria School of Medicine, SPAIN

Received: April 25, 2015

Accepted: August 6, 2015

Published: August 28, 2015

Copyright: © 2015 Leonardo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was financially supported by FAEPEX – PRP/UNICAMP (Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, grant to MLC 699/13), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grants to FFC 2014/00984-3 and 2008/57441-0). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

Preeclampsia is one of the leading causes of maternal and neonatal morbidity and mortality in the world, but its appearance is still unpredictable and its pathophysiology has not been entirely elucidated. Genetic studies have associated single nucleotide polymorphisms in genes encoding nitric oxide synthase and matrix metalloproteases with preeclampsia, but the results are largely inconclusive across different populations.

Objectives

To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *NOS3* (G894T, T-786C, and a variable number of tandem repetitions VNTR in intron 4), *MMP2* (C-1306T), and *MMP9* (C-1562T) genes with preeclampsia in patients from Southeastern Brazil.

Methods

This prospective case-control study enrolled 77 women with preeclampsia and 266 control pregnant women. Clinical data were collected to assess risk factors and the presence of severe complications, such as eclampsia and HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome.

Results

We found a significant association between the single nucleotide polymorphism *NOS3* T-786C and preeclampsia, independently from age, height, weight, or the other SNPs

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

studied, and no association was found with the other polymorphisms. Age and history of preeclampsia were also identified as risk factors. The presence of at least one polymorphic allele for NOS3 T-786C was also associated with the occurrence of eclampsia or HELLP syndrome among preeclamptic women.

Conclusions

Our data support that the NOS3 T-786C SNP is associated with preeclampsia and the severity of its complications.

Introduction

Preeclampsia is a multisystem pregnancy-specific disease, with varying clinical features, that affects 2–8% of pregnancies worldwide and is a major cause of maternal morbidity and mortality[1,2], especially in low and middle income countries[3,4], accounting for short and long-term health consequences for mothers and offspring[2,5]. There is a global concern on its rising incidence, mostly due to increasing rates of underlying and predisposing disorders such as chronic hypertension, diabetes and obesity[1,6].

The definition of preeclampsia was recently revised[7] to take into consideration new onset hypertension developing after 20 weeks gestation as well as the coexistence of one or more of the following: proteinuria, other maternal organ dysfunction (renal insufficiency, liver involvement; neurological complications or hematological complications) and/or uteroplacental dysfunction reflected by fetal growth restriction. Severe preeclampsia is considered in the presence of extremely high blood pressure (systolic blood pressure over 160mmHg and diastolic over 110mmHg), symptoms of impending eclampsia, or diagnosis of HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets) syndrome. According to time of onset of preeclampsia, early-onset is characterized when the disease presents before 34 weeks of gestation.

Despite extensive research on this topic, the exact causes of this malady remain largely unknown, with strong hypotheses implicating a disturbance of the placental function early in pregnancy that is associated with impaired spiral arteries remodeling and exacerbated inflammatory response[8]. The role of genetics is still not well defined; however, there is clear evidence of the risk factor played by family history, supported by twin studies, segregation and linkage analyses, as well as genome-wide association studies[9–12].

Several studies have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) that may be associated with preeclampsia. The NOS3 gene is located on the long arm of chromosome 7 (7q35-q36 region) and encodes the enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS)[13], responsible for the production of nitric oxide (NO). NO is involved in the regulation of blood pressure, blood flow distribution to the organs, inhibition of platelet adhesion and aggregation, and inhibition of some leukocyte functions[14]. Some SNPs including T-786C, G894T (Glu298Asp), and a variable number of tandem repeats (VNTR) in intron 4 have been identified[15–17] and can influence NO production.

The G894T polymorphism has been associated with a reduction in endothelium-dependent vasodilation in pregnancy and with the risk for ischemic heart disease[18,19]. However, in preeclampsia, the results have been conflicting: some studies show association of this polymorphism with the disease, while others disagree[20–25].

The T-786C SNP causes significant reduction of eNOS activity, may be associated with a predisposition to hypertension in general, and is also associated with reduced eNOS mRNA in

the placenta[17,26]. One study has suggested the need for replication of their finding of this polymorphism as a risk factor for preeclampsia[24].

Similarly to eNOS, extracellular matrix metalloproteases (MMPs) are another group of enzymes that can modulate blood flow in the vessels. MMPs induce cleavage of calcitonin gene-related peptide, and of "big endothelin" (ET-1), producing its most active form, ET-1 [1–32], favoring vasoconstriction[27,28]. Increased activity of MMPs seems to play a role in preeclampsia, as plasma levels of MMP-2 have been found to be elevated in patients with preeclampsia[29], so SNPs in genes encoding MMPs have been studied as biomarkers of susceptibility to preeclampsia.

SNPs in the *MMP2* gene have been less studied than *NOS3*, and despite their association with increased levels of MMP-2, SNPs C-1306T and C-735T have not been identified as biomarkers of susceptibility in one population and warrant further studies[30].

SNP C-1562T in the gene encoding MMP-9 has been implicated in an increase in gene expression in individuals carrying the polymorphic allele T[31]. This SNP has been associated with hypertension in the general population[32–34] and with gestational hypertension, but susceptibility to preeclampsia has been controversial across different populations[30,35–38].

We aimed at shedding light on the controversial role of these polymorphisms by performing a case-control study of preeclamptic and normotensive pregnant women. We compared the distribution of genotypes for *NOS3* G894T, T-786C, and VNTR in intron 4, as well as *MMP2* C-1306T and *MMP9* C-1562T, and tested their association with preeclampsia and its major complications.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was approved by the local Ethics Board of the Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher–CAISM, a public regional reference hospital for Obstetrics and Gynecology in Campinas, Brazil (approval number 502/2010). Written informed consent was obtained from all subjects.

Patient enrollment

Inclusion criteria for cases were pregnancy between 20 and 40 weeks or post-partum, and preeclampsia as defined by new onset of hypertension with systolic blood pressure (BP) above 140mmHg or diastolic BP above 90mmHg, in association with either proteinuria above 300mg in 24h or a positive urine dipstick test equal to or above 2+ in the absence of urinary infection [39]. Inclusion criteria for controls were pregnancy between 20 and 40 weeks or post-partum and absence of any of the diagnostic criteria for preeclampsia until discharge after delivery, including a negative urine dipstick test or normal 24-hour proteinuria. Exclusion criteria for both groups were multiple gestation, fetal malformations, arterial hypertension, gestational hypertension, diabetes mellitus, autoimmune diseases, thyroid disease, and chronic infectious diseases.

Genotype determination

Peripheral venous blood samples were collected in tubes containing EDTA and stored at 4 degrees Celsius until the time of processing. All samples were numbered upon enrollment and laboratory personnel were blinded to the diagnostic group allocation until the genotyping phase was finished. Genomic DNA was obtained using phenol-chloroform modified technique [40]. *NOS3* G894T and T-786C, *MMP2* C-1306T, and *MMP9* C-1562T genotyping were

Table 1. Sequences of primers, annealing temperatures, and enzymes used in PCR-RFLPs and sizes of the fragments obtained.

SNP	Primer sequences	Fragment size (bp)	Annealing temperature	Restriction enzyme	Fragments in wild-type homozygotes (bp)	Fragments in polymorphic homozygotes (bp)
<i>MMP2</i> T-1306C	F-5'-CTTCCTAGGCTGGTCCTTACTGA-3' R-5'-CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGC-3'	193	58°C	<i>Xsp I</i>	186+7	162+24+7
<i>MMP9</i> C-1562T	F-5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3' R-5'-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC-3'	436	60°C	<i>Nla3</i>	381+48+7	246+135+48+7
<i>NOS3</i> G894T	F-5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' R-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3'	248	58°C	<i>MboI</i>	248	158+90
<i>NOS3</i> T-786C	F-5'-CACCCAGGCCACCCCACT-3' R-5'-GCCGCAGGTCGACAGAGAGACT-3'	394	58°C	<i>Msp I</i>	394	352+42
<i>NOS3</i> VNTR	F-5'-CTTACTCTCCACTGCTTTTCAGAG-3' (Martines <i>et al.</i>) R-5'-CGCAGGTCAGCAGAGAGACTAG-3'	394–448	58°C	NA	NA	NA

SNP, single nucleotide polymorphism; F, forward; R, reverse; bp, base pairs; VNTR, variable number of tandem repeats; NA, not applicable

doi:10.1371/journal.pone.0136693.t001

performed by PCR-RFLP analysis on a Veriti equipment (Applied Biosystems, CA., USA) followed by 3% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide visualized under UV light. Table 1 summarizes primers, annealing temperatures, enzymes used, and fragments obtained. Genotypes for the VNTR of intron 4 of NOS3 were determined by FAM-labeled PCR, subsequently diluted at a ratio of 1 to 10 with distilled water, added to a mixture containing formamide (Hi-Di, Applied Biosystems, CA, USA) and standard marker (LIZ 500, Life Technologies), to a final volume of 10uL. The amplified fragments were denatured at 95°C and separated via capillary electrophoresis performed in an automatic DNA Analyzer (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA, USA). Automatic sequencing was performed for validation of PCR-RFLP using random samples including all genotypes in all three genes using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems, CA, USA) according to the manufacturer's instructions for subsequent electrophoresis in automatic sequencer (ABI 3500 Genetic Analyzer). Sequences obtained were analyzed and compared with public databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Statistical analysis

Clinical and laboratorial data were tabulated in a spreadsheet using Microsoft Excel 2003–2013 (Microsoft, USA) and subsequently exported and analyzed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, USA). Genotypic and association studies were performed using R software v3.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, USA) with the statistical analysis packages *SNPassoc* and *epicalc*.

Results

A total of 383 pregnant women were enrolled in this study from March 2011 to July 2014. Forty samples were excluded due to inadequate storage of blood tubes compromising DNA quality or failure to collect minimum clinical data confirming case or control group allocation. There was a total of 77 cases of preeclampsia and 266 control pregnant women. Both groups did not differ significantly in height, pre-gestational weight, body mass index, the percentage of primigravidas, or of women reporting a smoking habit. Preeclamptic women presented at

Table 2. Clinical characteristics of the study population.

	Controls (n = 266)	Cases (n = 77)	P
Age, y	24,5 (24,8–28,0)	26,4 (25,3–28,0)	0.0547
Pre-gestational weight, kg	64,0 (62,4–65,5)	66,3 (63,0–69,6)	0.2556
Height, m	1,60 (1,60–1,62)	1,61 (1,59–1,62)	0.4529
Body mass index, kg/m ²	24,6 (24,1–25,1)	25,3 (24,0–26,6)	0.1613
Gestational age at admission, weeks	38,7 (38,4–39,0)	35,2 (34,4–36,0)	<0.0001
Neonate weight, g	3138 (3071–3205)	2304 (2082–2525)	<0.0001
Neonate Capurro score, weeks	38,5 (38,2–38,8)	35,3 (34,5–36,1)	<0.0001
Smoking (%)	25/258 (9.4)	7/74 (9.1)	0.4924
Primigravida (%)	117/266 (44.4)	38/77 (49.4)	0.1764
Previous preeclampsia (%)	15/265 (5.6)	28/77 (35.6)	<0.0001
Type of delivery			
Vaginal	157	13	
Forceps	11	1	<0.0001
Cesarean section	87	61	

doi:10.1371/journal.pone.0136693.t002

earlier gestational age for delivery, were more likely to undergo cesarean section, and their offspring was significantly less mature according to Capurro scores, with significantly lower birth weight (Table 2).

Tables 3 and 4 present the data on genotypes according to SNPs and to group allocation, major allele frequencies and Hardy-Weinberg equilibria. We detected a higher frequency of the presence of SNPs in the *NOS3* gene in the group of pregnant women with preeclampsia, but not in the *MMP2* and *MMP9* genes. In regard to the VNTR in intron 4 of the *eNOS* encoding gene, we noticed a greater diversity of alleles in the control population of pregnant women, with a more frequent appearance of the rare alleles bearing 4 and 6 repetitions (Table 5). Since in all polymorphisms the alleles were in Hardy-Weinberg equilibrium, we assumed that our population had no significant inbreeding or specific migration issues that could affect our estimation of genetic frequencies.

Table 6 shows the results of univariate analysis for risk factors for preeclampsia. The most significant clinical risk factor was previous preeclampsia, while amongst genetic risk factors, only SNPs in the *NOS3* gene were associated with preeclampsia. Subsequent multivariate analysis showed that only *NOS3* T-786C was associated with preeclampsia independently from age, height, or weight.

Among preeclamptic women, we also obtained clinical data whether they had to be admitted to receive magnesium sulfate to treat severe preeclampsia, if they developed HELLP syndrome, or eclampsia. Patients were then assigned a severity score according to the

Table 3. Major allele frequencies and Hardy-Weinberg tests for the study population.

SNP	MAF	HWE P
<i>NOS3</i> G894T	0.861	0.65
<i>NOS3</i> T-786C	0.907	0.51
<i>MMP2</i> C-1306T	0.747	0.77
<i>MMP9</i> C-1562T	0.705	0.60
<i>NOS3</i> VNTR in intron 4	0.805	0.59

SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, major allele frequency; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium

doi:10.1371/journal.pone.0136693.t003

Table 4. Genotype frequencies of SNPs for the study population.

	Wild-type homozygote	Heterozygote	Polymorphic homozygote	Not determined
NOS3894 genotype	GG	TG	TT	ND
Cases	42 (55%)	25 (32%)	10 (13%)	0 (0%)
Controls	149 (56%)	101 (38%)	13 (3%)	3 (1%)
NOS3-786 genotype	TT	CT	CC	ND
Cases	36 (47%)	29 (38%)	12 (16%)	0 (0%)
Controls	131 (49%)	118 (44%)	15 (6%)	2 (1%)
MMP2-1306 genotype	CC	CT	TT	ND
Cases	53 (69%)	23 (30%)	1 (1%)	0 (0%)
Controls	196 (74%)	61 (23%)	4 (2%)	5 (2%)
MMP 9-1562 genotype	CC	CT	TT	ND
Cases	60 (78%)	11 (14%)	1 (1%)	5 (6%)
Controls	217 (82%)	43 (16%)	3 (1%)	3 (1%)

ND, not determined

doi:10.1371/journal.pone.0136693.t004

complications reported: baseline score for preeclampsia was zero, adding 1 point if admission to administer magnesium sulfate was indicated, 10 points if HELLP syndrome was diagnosed, and 100 points if eclampsia ensued, resulting in a score ranging from 0 to a maximum 111 points. We analyzed whether the NOS3 T-786C polymorphism was associated with more severe preeclampsia among the cases. Simple severity score analysis showed that wild-type homozygotes TT for this SNP had a mean score of 1.39, while women with either a CT or CC genotype had a mean score of 14.15. A score above 10 meant that the latter genotype was possibly associated with at least HELLP syndrome. Complementary chi-square analysis of the subgroup of preeclamptic women showed that, in a recessive model, NOS3 T-786C was significantly associated with the occurrence of either HELLP syndrome or eclampsia ($P < 0.0001$). (Fig 1)

Discussion

In this study, we have explored some clinical and genetic risk factors for preeclampsia in a Brazilian population. We have confirmed that preeclampsia represents a relevant maternal and neonatal comorbidity, with a lower median gestational age upon admission for delivery in women diagnosed with preeclampsia, as well as less mature neonates, lower birth weight and higher percentage of women undergoing cesarean section, which in our hospital is only performed upon medical indication. These results support that this comorbidity precipitates births more prematurely and leads to the development of complications indicating hospitalization of the mother before the usual term.

Our analysis showed that the main clinical risk factor for preeclampsia was personal history of preeclampsia in a previous pregnancy, with an OR of 9.21 (95% confidence interval: 3.22–

Table 5. Genotype frequencies of NOS3 VNTR in intron 4 for the study population.

NOS3 VNTR intron 4 genotype	4/4	5/5	4/5	4/6	5/6	ND
Cases	0 (0%)	52 (68%)	17 (22%)	1 (1%)	0 (0%)	7 (9%)
Controls	13 (5%)	148 (56%)	78 (29%)	2 (1%)	4 (2%)	21 (8%)

VNTR, variable number of tandem repetitions; ND, not determined

doi:10.1371/journal.pone.0136693.t005

Table 6. Odds ratios for risk factors for preeclampsia.

Risk factor	Odds ratio	95% CI
Age (years)	1.04	1.01–1.08
Height (cm)	0.98	0.94–1.02
Weight (kg)	1.00	1.00–1.00
Smoking	0.96	0.33–2.40
Previous preeclampsia	9.21	3.22–28.26
MMP2 C-1306T	0.85	0.09–7.68
MMP9 C-1562T	1.22	0.13–11.91
NOS3 G894T (recessive model, TT vs. GT+GG)	2.87	1.21–6.83
NOS3 T-786C (recessive model, CC vs. TC+TT)	3.06	1.37–6.87

CI, confidence interval; values in bold were statistically significant.

doi:10.1371/journal.pone.0136693.t006

28.26), but this obviously only applies to the subset of patients in our study that were not primigravidas. Another limitation of this analysis is that we have excluded other clinical factors that are known to predispose patients to preeclampsia, such as multiple gestation, chronic hypertension, autoimmune diseases, etc. Age was detected as a risk factor, however minor, with an OR of only 1.04, possibly due to a bias introduced by enrolling slightly older women in the preeclampsia group, despite not reaching statistical significance.

Among the genetic risk factors, it was found that only the SNPs affecting eNOS were significantly associated with preeclampsia. These data agree with those from a recent meta-analysis reporting on European populations in which this association was found[41]. We did not detect an association with SNPs in genes encoding MMP-2 and MMP-9. While this confirms previous observations[30,36,38,42], the change in MMP expression already observed by other studies in association with these SNPs may still be relevant[29,37]. MMPs may be more important in the process of invasion of the spiral arteries, which is performed by trophoblasts. Since trophoblasts carry fetal DNA, such SNPs may be more important if present in the fetal DNA rather than in maternal DNA, and new studies should be designed to address this possibility. Even though no particular genotype for the VNTR in intron 4 was associated with preeclampsia in our population, we found a great variety of alleles in our population, with the appearance of the rare allele 6, and a higher frequency of the allele with 4 repetitions amongst controls. It has

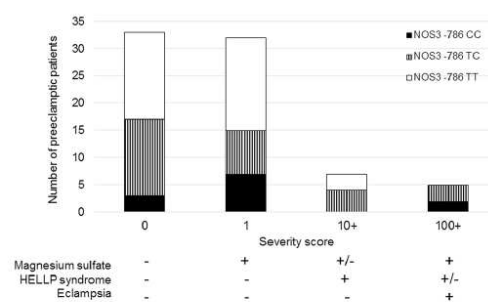


Fig 1. Number of preeclamptic patients according to severity score and genotype distributions for NOS3 T-786C.

doi:10.1371/journal.pone.0136693.g001

been recognized that Brazil has a population with wide genetic admixture[43,44] and the presence of these alleles could be explained by this multiethnic background.

In multivariate analysis, the only SNP that remained statistically significant for the risk of preeclampsia after correction for age, height and weight, and that was independent from other polymorphisms, was NOS3 T-786C, with an OR 3.56 (95% CI: 1.23 to 10.31). The failure to identify the association of the G894T SNP with preeclampsia reported in other studies may derive from differences in sample size, more mixed genetic background, or different inclusion criteria. We have chosen to include all preeclamptic patients regardless of severity, while some studies have used only the most severe spectrum of the disease with blood pressure over 160/100mmHg. A study in a Brazilian population found an association of G894T with preeclampsia occurring after 34 weeks of gestation, but haplotype analyses on time of onset and occurrence of preeclampsia both included the -786C allele[45]. The same group found no association between individual SNPs in the NOS3 gene with the occurrence of preeclampsia[46], and no differences in nitrite levels across different NOS3 genotypes in preeclamptic women[47]. These discrepancies within the same region of Brazil may nonetheless reflect some ethnic differences between the populations studied and, differently from reported by one of the other studies[47], we have included patients with HELLP syndrome, and our preeclamptic group did not differ significantly in BMI from the control population, which may have previously influenced the power to detect the association between preeclampsia and this SNP. It has been demonstrated that NOS3 T-786C polymorphism reduces eNOS mRNA expression in the placenta[48]. Therefore, this SNP may result in enzyme deficiency with reduced bioavailability of NO in the placental tissue, possibly affecting the placentation, trophoblastic invasion of the spiral arteries, and causing ischemia by local vasoconstriction. Thus, placental circulation could be primarily predisposed to an imbalance in favor of a constant reduction of placental blood flow, which can explain the development of placental insufficiency, an important pathophysiological mechanism in the development of preeclampsia. Limitations of this study include not having performed measurement of NO or its metabolites in blood samples to correlate with genotypes and strengthen this hypothesis.

Our data also agree with NOS3 polymorphism being associated with more severe forms of preeclampsia[49], and in the present study, this SNP was particularly associated with the most severe complications (HELLP syndrome and eclampsia). Taken together, our genetic analysis and previous evidence in the scientific literature support that this SNP may not only be associated, but actually be implicated[50] in the pathogenesis of preeclampsia. NO deficiency can also exacerbate platelet activation, which favors the formation of microthrombi, generating microangiopathic hemolytic anemia and thrombocytopenia, typically found in HELLP syndrome. Intravascular hemolysis results in free hemoglobin that readily reacts with available NO, consuming even more of the already low levels of NO, a vicious circle with decreasing NO bioavailability. Therefore, the association of the NOS3 polymorphism with preeclampsia and the occurrence of HELLP and eclampsia indicate an important role of NO in the pathophysiology of this disease. Therapeutic strategies that improve NO bioavailability may be useful approaches to be investigated as novel treatment of severe forms and as preventative measure of complications of preeclampsia.

In summary, our data support that NOS3 T-786C polymorphism is the most important and independent genetic factor in this study associated with the occurrence of preeclampsia in a Brazilian population, and may predispose patients to more severe complications, such as HELLP syndrome and eclampsia.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CFF MLC JGC MAP FGS KYF. Performed the experiments: DPL DMA CL LCB. Analyzed the data: FFC DMA CL KYF DPL CFF MLC. Contributed reagents/materials/analysis tools: DMA FFC CL MLC. Wrote the paper: MLC KYF DPL.

References

1. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010; 376: 631–644. doi: [10.1016/S0140-6736\(10\)60279-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60279-6) PMID: [20598363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20598363/)
2. Von Dadelszen P, Magee LA. Pre-eclampsia: an update. *Curr Hypertens Rep*. 2014; 16: 454. doi: [10.1007/s11906-014-0454-8](https://doi.org/10.1007/s11906-014-0454-8) PMID: [24915961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915961/)
3. Souza JP, Gülmezoglu AM, Vogel J, Carroli G, Lumbiganon P, Qureshi Z, et al. Moving beyond essential interventions for reduction of maternal mortality (the WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health): a cross-sectional study. *Lancet*. 2013; 381: 1747–1755. doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)60686-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60686-8) PMID: [23683641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23683641/)
4. Zanette E, Parpinelli MA, Surita FG, Costa ML, Haddad SM, Sousa MH, et al. Maternal near miss and death among women with severe hypertensive disorders: a Brazilian multicenter surveillance study. *Reprod Heal*. 2014; 11: 4. doi: [10.1186/1742-4755-11-4](https://doi.org/10.1186/1742-4755-11-4)
5. Ahmed R, Dunford J, Mehran R, Robson S, Kunadian V. Pre-eclampsia and future cardiovascular risk among women: a review. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63: 1815–1822. doi: [10.1016/j.jacc.2014.02.529](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.02.529) PMID: [24613324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24613324/)
6. Creanga AA, Berg CJ, Ko JY, Farr SL, Tong VT, Bruce FC, et al. Maternal mortality and morbidity in the United States: where are we now? *J Womens Heal*. 2014; 23: 3–9. doi: [10.1089/jwh.2013.4617](https://doi.org/10.1089/jwh.2013.4617)
7. Gynecologists AC of O and, Pregnancy TF on H in. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obs Gynecol*. 2013; 122: 1122–1131. doi: [10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88](https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88)
8. Hsu P, Nanan RK. Innate and adaptive immune interactions at the fetal-maternal interface in healthy human pregnancy and pre-eclampsia. *Front Immunol*. 2014; 5: 125. doi: [10.3389/fimmu.2014.00125](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00125) PMID: [24734032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24734032/)
9. Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, Lichtenstein P. Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am J Med Genet A*. 2004; 130A: 365–371. doi: [10.1002/ajmg.a.30257](https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30257) PMID: [15384082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15384082/)
10. Fong FM, Sahemey MK, Hamed G, Eytayo R, Yates D, Kuan V, et al. Maternal genotype and severe preeclampsia: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2014; 180: 335–345. doi: [10.1093/aje/kwu151](https://doi.org/10.1093/aje/kwu151) PMID: [25028703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25028703/)
11. Haram K, Mortensen JH, Nagy B. Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *J Pregnancy*. 2014; 2014: 910751. doi: [10.1155/2014/910751](https://doi.org/10.1155/2014/910751) PMID: [24991435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24991435/)
12. Abou El Hassan M, Diamandis EP, Karumanchi SA, Shennan AH, Taylor RN. Preeclampsia: An Old Disease with New Tools for Better Diagnosis and Risk Management. *Clin Chem*. 2015; doi: [10.1373/clinchem.2014.230565](https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230565)
13. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall A V, Shi XM, et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*. 1993; 268: 17478–17488. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688726> PMID: [7688726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7688726/)
14. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*. 1996; 51: 383–394. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8619882> PMID: [8619882](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8619882/)
15. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McCredie RM, Wilcken DE. A smoking-dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*. 1996; 2: 41–45. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564837> PMID: [8564837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8564837/)
16. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999; 100: 1515–1520. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510054> PMID: [10510054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10510054/)
17. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T(-786)→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol*. 2000; 86: 628–634. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980213> PMID: [10980213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10980213/)

18. Savvidou MD, Vailance PJ, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension*. 2001; 38: 1289–1293. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751705> PMID: 11751705
19. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Humphries SE, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2006; 164: 921–935. doi: [10.1093/aje/kwj302](https://doi.org/10.1093/aje/kwj302) PMID: 17018701
20. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*. 2000; 7: 238–241. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964023> PMID: 10964023
21. Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E, Ebina Y, Fujimoto S. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet*. 2001; 103: 241–244. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745998> PMID: 11745998
22. Häkli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*. 2003; 10: 154–157. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12699878> PMID: 12699878
23. Landau R, Xie HG, Dishy V, Wood AJ, Stein CM, Smiley RM. No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2004; 17: 391–394. doi: [10.1016/j.amjhyper.2004.01.006](https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.01.006) PMID: 15110896
24. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Pérez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension*. 2004; 44: 702–707. doi: [10.1161/01.HYP.0000143483.66701.ec](https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000143483.66701.ec) PMID: 15364897
25. Yu CK, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaides KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2006; 6: 7. doi: [10.1186/1471-2393-6-7](https://doi.org/10.1186/1471-2393-6-7) PMID: 16542455
26. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T→C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet*. 2000; 9: 2629–2637. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063722> PMID: 11063722
27. Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999; 85: 906–911. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559137> PMID: 10559137
28. Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y, Koivunen E, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res*. 2000; 87: 670–676. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029402> PMID: 11029402
29. Myers JE, Merchant SJ, Macleod M, Mires GJ, Baker PN, Davidge ST. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2005; 24: 103–115. doi: [10.1081/PRG-200059836](https://doi.org/10.1081/PRG-200059836) PMID: 16036395
30. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Duarte G, et al. Association between matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms and MMP-2 levels in hypertensive disorders of pregnancy. *Exp Mol Pathol*. 2012; 92: 217–221. doi: [10.1016/j.yexmp.2012.01.008](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.01.008) PMID: 22327101
31. Zhang J, Gruber BL, Marchese MJ, Zucker S, Schwartz LB, Kew RR. Mast cell tryptase does not alter matrix metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts: further evidence that proteolytically active tryptase is a potent fibrogenic factor. *J Cell Physiol*. 1999; 181: 312–318. doi: [10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199911\)181:2<312::AID-JCP13>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199911)181:2<312::AID-JCP13>3.0.CO;2-1) PMID: 10497310
32. Pöllänen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, Laippala P, Perola M, Penttilä A, et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 1446–1450. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557670>
33. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation*. 2003; 107: 1579–1585. doi: [10.1161/01.CIR.0000058700.41738.12](https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000058700.41738.12) PMID: 12668489
34. Morgan AR, Zhang B, Tapper W, Collins A, Ye S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. *J Mol Med*. 2003; 81: 321–326. doi: [10.1007/s00109-003-0441-z](https://doi.org/10.1007/s00109-003-0441-z) PMID: 12728308

35. Fraser R, Walker JJ, Ekbote U V, Martin KL, McShane P, Orsi NM. Interleukin-4–590 (C>T), toll-like receptor-2 +2258 (G>A) and matrix metalloproteinase-9–1562 (C>T) polymorphisms in pre-eclampsia. *BJOG*. 2008; 115: 1052–6; discussion 1056. doi: [10.1111/j.1471-0528.2008.01771.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2008.01771.x) PMID: [18651887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18651887/)
36. Luizon MR, Palei AC, Sandrim VC. Polymorphisms and haplotypes in candidate genes related to angiogenesis and endothelial dysfunction in preeclampsia. *J Pregnancy*. 2012; 2012: 914704. doi: [10.1155/2012/914704](https://doi.org/10.1155/2012/914704) PMID: [22570788](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22570788/)
37. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Matrix metalloproteinase-9 polymorphisms affect plasma MMP-9 levels and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. *Pharmacogenomics J*. 2012; 12: 489–498. doi: [10.1038/tj.2011.31](https://doi.org/10.1038/tj.2011.31) PMID: [21769110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21769110/)
38. Rahimi Z, Aghaei A, Vaisi-Raygani A. AT2R -1332 G:A polymorphism and its interaction with AT1R 1166 A:C, ACE I/D and MMP-9–1562 C:T polymorphisms: risk factors for susceptibility to preeclampsia. *Gene*. 2014; 538: 176–181. doi: [10.1016/j.gene.2013.12.013](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.12.013) PMID: [24440243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24440243/)
39. Bulletins—Obstetrics AC on P. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obs Gynecol*. 2002; 99: 159–167. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175681>
40. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. *Basic Method in Molecular Biology*. London: Elsevier; 1986.
41. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene*. 2013; 519: 187–193. doi: [10.1016/j.gene.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.01.004) PMID: [23375994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23375994/)
42. Palei AC, Sandrim VC, Amaral LM, Machado JS, Cavalli RC, Lacchini R, et al. Effects of matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphisms on responsiveness to antihypertensive therapy of women with hypertensive disorders of pregnancy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012; 111: 262–267. doi: [10.1111/j.1742-7843.2012.00905.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00905.x) PMID: [22672240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22672240/)
43. Bonifaz-Peña V, Contreras A V, Struchiner CJ, Roela RA, Furuya-Mazzotti TK, Chammas R, et al. Exploring the distribution of genetic markers of pharmacogenomics relevance in Brazilian and Mexican populations. *PLoS One*. 2014; 9: e112640. doi: [10.1371/journal.pone.0112640](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112640) PMID: [25419701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25419701/)
44. Rodrigues de Moura R, Coelho A V, de Queiroz Balbino V, Crovella S, Brandão LA. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol*. 2015; doi: [10.1002/ajhb.22714](https://doi.org/10.1002/ajhb.22714)
45. Alpoim PN, Gomes KB, Pinheiro M. B, Godoi LC, Jardim LL, Muniz LG, et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2014; 42: 19–23. doi: [10.1016/j.niox.2014.07.006](https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.07.006) PMID: [25106888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25106888/)
46. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araújo FM, Ramos ES, Duarte G, et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics*. 2008; 9: 1467–1473. doi: [10.2217/14622416.9.10.1467](https://doi.org/10.2217/14622416.9.10.1467) PMID: [18855535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18855535/)
47. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16: 506–510. doi: [10.1093/molehr/gaq030](https://doi.org/10.1093/molehr/gaq030) PMID: [20457799](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20457799/)
48. Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B, Wang J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett*. 2000; 471: 45–50. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10760510> PMID: [10760510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10760510/)
49. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Sieroszewski P, Grze kowiak E, Mrozikiewicz P. The significance of -786T > C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011; 24: 432–436. doi: [10.3109/14767058.2010.511329](https://doi.org/10.3109/14767058.2010.511329) PMID: [20822330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20822330/)
50. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*. 2014; 508: 469–476. doi: [10.1038/nature13127](https://doi.org/10.1038/nature13127) PMID: [24759409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24759409/)