

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FATORES GENÉTICOS DE RISCO NA DOENÇA HIPERTENSIVA DA GESTAÇÃO

Caroline Abrão Dalmáz

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Israel Roisenberg

Porto Alegre, agosto de 2006

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemostasia do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Grupo Hospitalar Conceição, em Porto Alegre, sob o apoio financeiro do CNPq, FINEP e PRONEX.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima”.

(Louis Pasteur)

...e então, um dia, já no final da fase de escrever a tese, me vi, como desde o início, completamente emocionada e apaixonada pelo meu tema de escolha no doutorado e senti que tudo valeu a pena, ao escutar da minha querida vizinha, até então uma história desconhecida da vida dela para mim, que ela havia perdido a mãe na ocasião de seu nascimento, em decorrência de eclâmpsia. Ela, por sua vez, nem imaginava, que contava sua história pessoal a uma doutorando no tema, mas provocou em mim o sentimento de ter contribuído, de alguma maneira, para auxiliar na elucidação deste tema, e, principalmente, de que há muito ainda por se fazer.

Dedico esta tese a todas às mulheres que bravamente tem filhos e que, mesmo diante de tantas dificuldades, dão o melhor de si.

A vida de todos nós é movida a desafios, e aqui lhes apresento o meu mais novo trabalho que só foi possível com a ajuda de várias pessoas. Fica o meu carinho e agradecimento a todos que me auxiliaram nesta tarefa, nos mais variados graus, e minha sincera gratidão. Saibam que foi um grande prazer trabalhar com todos vocês.

Agradecimentos mais do que especiais:

A todas às **pacientes e familiares** que me confiaram suas angústias e esperanças, em um momento tão importante de suas vidas que é a maternidade e que, apesar de todas as dificuldades, compreenderam a dimensão do objetivo proposto, incentivando e acreditando na realização deste trabalho. Sem elas, nada disso seria possível.

Ao meu incansável orientador:

Prof. Israel Roisenberg, por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, pela confiança depositada em mim ao longo de todo o trabalho, por me conduzir na carreira científica e ensinar o lado humano da ciência. Um exemplo.

À **Dr^a. Citânia Tedoldi**, pelo dinamismo, por extrema competência, pela energia contagiante, por ter sido responsável pela minha iniciação no mundo da obstetrícia e, especialmente, pela colaboração indispensável ao longo dos últimos quatro anos.

À **Dr^a. Kátia Santos**, por ter auxiliado para a realização do mesmo, pelo apoio e disposição.

À **Mariana Rodrigues Botton**, pela adorável convivência no laboratório, parceria e companheirismo.

À **Ana Maria C. B. Pereira**, pelo companheirismo, pelo apoio constante, por compartilhar as alegrias e as pequenas decepções, por auxiliar a encontrar soluções para os obstáculos cotidianos, e pela amizade desde o início.

À **Prof^a Eliane Bandinelli**, pelos questionamentos, sugestões e esclarecimentos, pelo apoio e pelo delicioso café.

Aos **colegas Alexandre Gard Reimer e Daisy Crispim**, pelo apoio e colaboração.

À **Kátia Gerloff, Ângela Kalil** e profissionais do laboratório de análises clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição, por terem nos recebido de forma alegre, simpática e com disposição para auxiliar no que fosse preciso. A cabeça pensa onde os pés pisam, já dizia Paulo Freire, e é impossível continuar com a mesma após pisar no Hospital Nossa Senhora da Conceição e poder conhecer o serviço prestado por estas profissionais tão capazes e comprometidas.

Ao **Elmo J. A. Cardoso e a Ellén Oliveira**, por demonstrar que é possível descomplicar o que pode ser simplificado, pelo atendimento sempre atencioso.

Aos **professores** do PPGGBM, aos **colegas** em geral e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos **examinadores** desta tese de doutorado pela disposição em abdicar de seus compromissos para compartilhar a realização de um sonho que se constitui em uma etapa fundamental da minha carreira científica.

À **minha família**, maravilhosa, pelo cólo e a quem sou eternamente grata. A eles meu amor e meu carinho.

Ao **Marcelo**, por acreditar nos meus sonhos e neles embarcar, por compartilhar uma longa jornada de desafios, de crescimento pessoal e profissional, por seu amor, paciência e dedicação e por ter feito com que eu me tornasse uma pessoa melhor e mais feliz.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO	19
1.1. Aspectos epidemiológicos.....	20
1.2. Classificação dos distúrbios hipertensivos da gestação.....	22
1.3. Patogênese.....	24
1.4. Fatores de predisposição.....	26
1.5. Fatores genéticos de risco.....	29
1.5.1. Genes candidatos ligados à hemostasia.....	30
1.5.2. Gene candidato ligado ao estresse oxidativo.....	40
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	44
CAPÍTULO III: “Risk factors for hypertensive disorders in pregnancy in Southern Brazil”	47
CAPÍTULO IV: “Relationship between polymorphisms in thrombophilic genes and preeclampsia in a Brazilian women”	65
CAPÍTULO V: “Genotypes and Haplotypes of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (Glu298Asp, intron-4, and -786T→C) and Risk of Preeclampsia in a Brazilian population”	82
CAPÍTULO VI: DISCUSSÃO	106
CAPÍTULO VII: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	116

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ANEXO	135
ANEXO – Ficha clínica de avaliação da paciente e termo de consentimento informado.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS

ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
C677T	substituição do nucleotídeo citosina por timina no nucleotídeo 677 do gene da metilenotetrahidrofolato redutase
DAC	doença arterial coronariana
DHG	distúrbios hipertensivos da gravidez
DPP	descolamento prematuro de placenta
eNOS	óxido nítrico sintetase
FVL	fator V Leiden
F II	protrombina
G20210A	polimorfismo G20210A do gene da Protrombina
Glu298Asp	polimorfismo Glu298Asp do gene da óxido nítrico sintase
HNSC	Hospital Nossa Senhora da Conceição
HG	Hipertensão Gestacional
HAS	hipertensão arterial sistêmica
IAM	infarto agudo do miocárdio
IC	intervalo de confiança
IMC	índice de massa corporal
E	eclâmpsia
MTHFR	metilenotetrahidrofolatoreductase
PA	pressão arterial

PAI-1	inibidor da ativação do plasminogênio tipo 1
PE	pré-eclâmpsia
LDH	lactato desidrogenase
ON	óxido nítrico
OR	“odds ratio”
RC	razão de chances
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
SNP	“single nucleotide polymorphisms”
TGO	transaminase oxalacética
TGP	transaminase pirúvica

RESUMO

Introdução: Os distúrbios hipertensivos da gestação (DHG) abrangem um amplo espectro de doenças, desde hipertensão gestacional até pré-eclâmpsia (PE) severa. A PE é uma doença específica da gestação e é caracterizada pela elevação da pressão arterial e proteinúria, em mulheres previamente normotensas. Há diversos fatores de risco identificados para o desenvolvimento dos DHG - o que é primordial para a detecção precoce, bem como para o tratamento dos DHG. A gestação por si representa um fator de risco ao estado de hipercoagulabilidade associada à mudanças nos fatores hemostáticos e esta condição tem sido descrita como participante da patogênese de algumas doenças obstétricas, incluindo a PE. Ainda, o óxido nítrico que auxilia na regulação da pressão arterial, agregação plaquetária, durante a gestação e parto, tem sido sugerido envolvido na patogênese da PE. A patofisiologia da PE, no entanto, permanece não completamente esclarecida; há evidências da predisposição genética que tem sido bem documentadas e genes envolvidos com trombofilias e polimorfismos do gene do óxido nítrico sintetase (eNOS) têm sido sugeridos como possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da PE.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi identificar a frequência dos fatores de risco nos DHG e analisar a relação entre 7 variantes moleculares de DNA distribuídos em 5 genes relacionados à hemostasia [o polimorfismo C677T do gene da metileno tetra-hidrofolato redutase (MTHFR), a mutação G20210A do gene da protrombina (F II), a mutação G1691A do gene do fator V (FV Leiden) e o polimorfismo de inserção e deleção (4G/5G) no gene do inibidor tipo 1 ativador do plasminogênio (PAI-1)] e ao estresse oxidativo (polimorfismos Glu298Asp, intron-4, -786T→C) do gene da eNOS e a ocorrência e/ou a severidade da PE, independentemente ou em combinações.

Materiais e Métodos: A população de estudo foi composta por 330 participantes (161 pacientes com DHG e 169 controles) pareadas por idade e etnia, oriundas do Hospital Nossa Senhora da Conceição. Todas as pacientes foram submetidas a exame físico, entrevista por meio de questionário padronizado e exames específicos para o diagnóstico dos DHG. A PE foi definida como a presença de hipertensão arterial em mulheres previamente normotensas e proteinúria. A análise dos polimorfismos foi realizada por meio das técnicas de PCR e PCR-RFLP para os produtos de PCR que foram submetidos à digestão enzimática com a enzima *HinfI* para o polimorfismo da MTHFR, *HindIII* para as mutações da F II e FV e com *BanII* para o polimorfismo Glu298Asp e *MspI* para o polimorfismo -786T→C do gene da eNOS. Para a identificação dos fatores de risco foram utilizados teste *t* de student, teste exato de Fisher e Qui-quadrado. A análise de regressão multivariada foi realizada para estimar as variáveis clínicas, sociais e demográficas que foram associadas com a ocorrência de DHG na análise univariada.

Resultados: O grupo das pacientes foi composto de 73% de mulheres caucasianas e a média de idade foi de 29,1 anos (13-48 anos). Na análise multivariada as variáveis significativamente associadas com os DHG foram: a presença de história familiar de preeclampsia [$p=0,02$; razão de chances (RC)=7,05; 95% intervalo de confiança (IC)=1,99-24,92], a presença de diabetes ($p<0,01$; RC=3,87; 95% IC=1,22-12,27) e ocorrência de hipertensão crônica ($p=0,02$; RC=1,70; 95% IC=0,54-5,32). Dos 7 polimorfismos analisados, observou-se que as distribuições genotípicas e as frequências alélicas dos polimorfismos C677T do gene da MTHFR (RC=2,07; 95% IC=0,99-4,30), G20210A do gene da F II (RC=8,11; 95% IC=0,89-73,92), G1691A do gene do FV (RC=3,94; 95% IC=0,35-44,23), 4G/5G do gene do PAI-1 (RC=1,63; 95% IC=0,87-3,05) não parecem estar associadas isoladamente à ocorrência da PE em gestantes com essa complicação

quando comparadas à gestantes normotensas, nem mesmo na forma severa. Entretanto, quando investigada uma possível interação entre os genótipos de risco e a PE, a RC para um genótipo de risco, de um ou dois genótipos de risco e dois genótipos de risco comparado com grupo sem genótipos de risco foi [1,97 (95% IC=1,08-3,59), 2,21 (95% IC=1,25-3,92) e 4,27 (95% IC=1,3-13,9)], respectivamente. Em relação aos polimorfismos do gene da eNOS, a distribuição genotípica do polimorfismo Glu298Asp foi significativamente diferente entre as pacientes com PE e as mulheres normotensas caucasóides ($p=0.040$; Asp/Asp versus Glu/Glu + Glu/Asp: RC=2,65; 95% IC=1,045-6,69), no entanto não foi diferente nas pacientes afro-brasileiras ($p>0,05$). Ainda, as distribuições genotípicas e as frequências alélicas dos polimorfismos intron-4 e -786T→C do gene da eNOS não estão associadas à ocorrência e/ou severidade da PE em gestantes com essa complicação quando comparadas à gestantes normotensas, seja no grupo das caucasóides ou das afro-brasileiras. As frequências dos haplótipos Glu298Asp, intron-4 e -786T→C foram diferentes nas mulheres com PE quando comparadas à gestantes normotensas no grupo de mulheres afro-brasileiras ($<0,001$). O haplótipo Asp298-786T-4b foi mais frequente nos casos do que nos controles. A análise com o grupo das caucasianas não foi significativamente diferente ($p=0,14$).

Conclusões e perspectivas futuras: Os fatores de risco associados aos DHG são similares aos reportados em outros países e o conhecimento dos fatores de risco de nossa população pode auxiliar nas condutas do pré-natal. Na população analisada, a presença dos genótipos de risco nos genes ligados à trombofilias não estiveram associados ao desenvolvimento da PE nem na PE grave, quando analisados independentemente. Entretanto, uma possível interação entre os polimorfismos dos genes MTHFR, F II, FV e PAI-1 e o desenvolvimento de PE foi sugerido. Em relação aos polimorfismos do gene da

eNOS, uma associação entre o polimorfismo Glu298Asp e o desenvolvimento da PE em pacientes caucasóides foi encontrado. O haplótipo Asp298-786T-4b pode estar relacionado com PE em mulheres afro-brasileiras.

ABSTRACT

Background: Hypertensive disorders of pregnancy (HDP) cover a broad spectrum of diseases ranging from gestational hypertension to severe preeclampsia. Preeclampsia (PE), a pregnancy-specific syndrome is characterized by clinically defined as elevated blood pressure and proteinuria, in women previously normotensive. There are several risk factors identified to the development to HDP - this is very important to early detection and treatment of HDP. Pregnancy itself represents a risk factor for a hypercoagulable state associated with acquired changes in hemostatic factors, and a condition of hypercoagulation has been described as a major factor in the pathogenesis of some obstetric pathologies, including PE. In addition, the nitric oxide regulates blood pressure, platelet aggregation, myometrial quiescence during pregnancy and parturition, and may be involved in the pathogenesis of PE. Although the pathophysiology of PE remains unclear, genetic evidences for an inherited predisposition to PE are well known and thrombophilic genes and polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) have been suggested as a risk factor to the development of PE.

Aim: The aim of this study was to identify the frequency of risk factors for hypertensive disorders in pregnancy in Southern Brazil and analyze the relationship between 7 DNA polymorphisms distributed in 5 genes related to the haemostasis (the C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, the G20210A mutation of prothrombin gene (F II), the G1691A mutation of factor V (FV Leiden) and an insertion/deletion polymorphism (4G/5G) in the promoter of the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) gene and to endothelial dysfunction (–Glu298Asp, intron-4 and 786T→C in the eNOS gene) and the occurrence and/or the severity of the preeclampsia, independently or in combination.

Materials and Methods: The study population was composed of 330 individuals (161 patients with HDP and 169 controls) matched by age and ethnicity from Hospital Nossa Senhora da Conceição. All patients underwent a standardized clinical evaluation that consisted of a questionnaire. Preeclampsia was defined as the presence of hypertension associated with proteinuria in women known to be normotensive beforehand. Genotype analysis was performed using the PCR methods and PCR-RFLP method for the PCR products were subjected to digestion with the restriction enzymes *HinfI* for the polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, the *HindIII* for polymorphisms in the prothrombin mutation (F II), and factor V Leiden (FV) genes, the *BanII* for the Glu298Asp polymorphism and *MspI* for -786T→C polymorphism in the eNOS gene. The frequencies of the risk factors were compared between the groups by Fisher's exact test, Chi-square and Student *t* tests. A multivariate logistic regression was performed to assess the independent role of the clinical, social and demographic variables, which were significantly associated with occurrence of the hypertensive disease in pregnancy in the univariate analysis. Student *t* test was employed for comparison of the quantitative variables between the groups. Differences in proportions were tested by Student's *t* test, Fisher's exact test or χ^2 test. Relative risks were estimated by the odds ratio and P – values of < 0.05 were considered to be significant.

Results: We found 73% of Caucasians and the mean age was 29.1 years (13–48 years). In the multivariate analysis, the variables significantly associated with hypertensive disease in pregnancy were the following: family history of preeclampsia [p=0.02; odds ratio (OR) = 7.05; 95% confidence interval (CI)=1.99-24.92], diabetes (p<0.01; OR=3.87; 95% CI=1.22–12.27) and chronic hypertension (p=0.02; OR=1.70; 95% CI=0.54-5.32). When we analyzed the polymorphisms independently and the development of preeclampsia no

association was observed [methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677TT genotype, OR 2.07, 95% CI=0.99-4.30; prothrombin mutation (F II) (GA or AA genotypes) OR 8.11, 95% CI=0.89-73.92; factor V Leiden (FV Leiden) OR 3.94, 95% CI=0.35-44.23; plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/4G genotype, OR 1.63, 95% CI=0.87-3.05] not even with severe preeclampsia subgroup analysis. However, when we investigated a possible interaction among these polymorphisms on the development of the preeclampsia, the OR for having one risk genotype, one or two genotype risk factors and two genotype risk factors compared to those without genotype risk factors were 1.97 (95% CI=1.08-3.59), 2.21 (95% CI=1.25-3.92) and 4.27 (95% CI=1.3-13.9), respectively. Regarding to the polymorphisms in the eNOS gene the genotype distribution was significantly different between preeclamptic and normotensive women for the Glu298Asp polymorphism in Caucasians ($p=0.040$; Asp/Asp versus Glu/Glu + Glu/Asp: OR=2.65; 95% CI=1.045-6.69) but it was not different in African-Brazilians ($p>0.05$). The genotype frequencies for the intron-4 and $-786T\rightarrow C$ polymorphisms did not differ in Caucasians and African-Brazilians ($p>0.05$). The estimated haplotype frequencies considering the eNOS Glu298Asp, the intron-4, and the $-786T\rightarrow C$ polymorphisms were different between women with preeclampsia and control women in African-Brazilians ($p<0.001$). The Asp298-786T-4b haplotype was more frequent in cases than in controls. The analysis with the Caucasian group did not demonstrate significant differences ($p=0.14$).

Conclusions and future perspectives: In conclusion, the risk factors associated with hypertensive disorders in pregnancy appear to be similar to those reported in other countries and our results reflect behavioral factors whereby women may be predisposed to an increased risk of preeclampsia, thus the knowledge of the risk factors could be helpful in a prenatal care. In the population analyzed, the presence of the genotype risk factors in

the thrombophilic genes alone does not seem to be associated with the development of preeclampsia even in the severe presentation form. Nevertheless, a possible interaction among the MTHFR, F II, FV and PAI-1 gene polymorphisms on the development of the preeclampsia was suggested. Regarding to the polymorphisms in the eNOS gene, a possible association between the Glu298Asp polymorphism on the development of the preeclampsia in the Caucasian group was suggested. It was also indicated that the Asp298-786T-4b haplotype may be related to occurrence of preeclampsia in African-Brazilian women.



1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Epidemiológicos

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma complicação comum na gravidez (Brown e Budlle, 1997) e, entre todas as complicações da gestação, é responsável por 15% das internações hospitalares antes do nascimento (Scott *et al.*, 1997). Apesar de ter havido redução na mortalidade materna em gestações (UK, 1999 e Lain e Roberts, 2002), os distúrbios hipertensivos da gravidez (DHG) continuam sendo uma causa freqüente de morte durante a gestação (Duley, 1992; de Swiet, 2000; Sibai *et al.*, 2005). As mulheres que desenvolvem DHG têm risco aumentado de desenvolver descolamento prematuro de placenta (DPP), insuficiência renal, complicações cerebrovasculares, cardiovasculares, hepáticas, coagulopatias e morte materna e/ou perinatal (Abdella *et al.*, 1984; Cuningham *et al.*, 1997; Sibai *et al.*, 2005). Ainda, estudos recentes, têm evidenciado que, no futuro, essas mulheres têm risco de desenvolver doença cardiovascular e doenças metabólicas aumentado se comparado com pacientes que tiveram gestações normais (Ness *et al.*, 2003; Kaaja e Greer, 2005).

Dentre os DHG, a pré-eclâmpsia (PE) é uma forma específica que constitui um problema de saúde em todo o mundo (Lain e Roberts, 2002). Cerca de 5 a 8% das gestações possuem esta complicação e a PE está associada com significativo aumento de morbidade e mortalidade materna e perinatal (Sibai *et al.*, 1997; ACOG, 2002; Walker, 2000). Em países em que o pré-natal não é adequado, a hipertensão gestacional (HG) é responsável por 40 à 80% das mortes maternas. Estima-se que cerca de 50.000 mulheres morrem de PE por ano no mundo (Pipkin, 2001; Lain e Roberts, 2002).

Avanços no entendimento dessa complicação, cujas causas ainda são desconhecidas, são fundamentais para estratégias preventivas e terapêuticas, visando reduzir o impacto dessa doença em todo o mundo.

1.2. Classificação dos Distúrbios Hipertensivos da Gestação

Doenças hipertensivas podem ocorrer antes da gestação e serem específicas da gravidez (Lain e Roberts, 2002). De acordo com o *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG, 2002), podemos sub-dividi-las em: Pré-eclâmpsia, Hipertensão gestacional, Hipertensão crônica com pré-eclâmpsia superposta.

Pré-eclâmpsia

A PE é uma síndrome manifestada por HAS e proteinúria (Report, 2000; ACOG, 2002) – (excreção de proteína urinária $\geq 300\text{mg}/24\text{h}$), evidências de disfunção de múltiplos órgãos (rins, fígado, cérebro e coração) e, geralmente, com início após a 20^a semana de gestação em pacientes que tinham pressão arterial (PA) normal (Sibai *et al.*; 2005). É recomendado que gestantes, mesmo nas quais não foram identificadas alterações nos níveis pressóricos de aumento na PA em 140mmHg (sistólica) ou 90mmHg (diastólica), sejam monitoradas com especial atenção (Report, 2000). Igualmente, pacientes com HAS gestacional sem proteinúria, mas com outras evidências de desordens orgânicas devem ser tratadas como se tivessem PE (Lain e Roberts, 2002). Mesmo com a HAS bem controlada no início, a sobreposição da PE é de 15 a 25%, com aumento do risco materno e fetal (Sibai *et al.*, 1983; Caritis *et al.*, 1998). Complicações da PE incluem falência renal e hepática, eclâmpsia (E), coagulação intravascular disseminada e crescimento intra-uterino restrito (Morrison *et al.*, 2002). É dividida em PE Leve ou Grave. O diagnóstico de PE

Grave se dá quando um ou mais dos fatores descritos abaixo estão presentes, segundo ACOG, 2002:

- ❖ PA sistólica ≥ 160 mmHg ou PA diastólica ≥ 110 mmHg confirmados em duas tomadas com intervalo de 6h com a paciente em repouso;
- ❖ Proteinúria ≥ 5 g em 24h ou $\geq 0,3$ + em duas amostras de urina coletada em até 4h;
- ❖ Oligúria < 500 mL em 24h;
- ❖ Distúrbios cerebrais ou visuais;
- ❖ Edema pulmonar ou cianose;
- ❖ Dor epigástrica;
- ❖ Trombocitopenia (plaquetas < 100.0000 / μ L);
- ❖ Crescimento fetal restrito.

A PE é considerada Leve quando não preencher os critérios de PE Grave em relação à pressão e à proteinúria. Eclâmpsia é a presença de convulsões numa paciente com PE. Devem ser excluídas epilepsia e outras doenças convulsivas.

A chamada síndrome HELLP, um acrônimo de PE grave com hemólise, elevação das enzimas hepáticas e baixa contagem de plaquetas - é uma síndrome definida por três critérios (Sibai *et al.*, 1990):

- ❖ Hemólise – manchas periféricas anormais, bilirrubina $\geq 1,2$ mg/dL, ou lactato desidrogenase (LDH) ≥ 600 IU/L ou 2X o valor máximo normal para o método de aferição;
- ❖ Elevação das enzimas hepáticas (TGO, TGP ≥ 2 x normal);
- ❖ Trombocitopenia (plaquetas $< 100 \times 10^3$ / μ L).

A proteinúria pode ou não estar presente em pacientes com síndrome HELLP.

Hipertensão crônica ocorre em cerca de 3 a 5% das gestações e é a presença de HAS antes da gravidez, antes da 20ª semana de gestação ou persistente após 12 semanas pós-parto (ACOG, 2001).

Hipertensão Gestacional (HG)

É definida pelo aumento da PA sem proteinúria. Aumento da pressão arterial na gestação é PA maior do que 140mmHg (sistólica) ou 90mmHg (diastólica) em mulheres que eram normotensas antes da 20ª semana de gestação. Este é um grupo heterogêneo: pacientes com hipertensão crônica que não conheciam esta situação, HAS transitória da gestação que se normaliza no pós-parto e pacientes que desenvolvem PE (Report, 2000). HG com mínima elevação de PA e sem proteinúria não é um indicador de confiança de morbi-mortalidade materna e fetal mas requer atenção à mãe e ao feto (Brown *et al.*, 1994).

Hipertensão crônica com PE superposta

É diagnosticada pela presença de um aumento da PA acima dos valores basais da paciente, mudança na proteína urinária basal ou alguma evidência de disfunção orgânica. Hipertensão crônica com PE superposta ocorre em aproximadamente 20 a 25% das mulheres com HAS crônica (Caritis *et al.*, 1998; Sibai *et al.*, 1983).

Embora estas definições sejam importantes para pesquisas e estudos epidemiológicos, são menos importantes na clínica, pois todas as mulheres com aumento na pressão arterial devem ser cuidadosamente monitoradas pelo caráter associativo que possam ter com a PE.

1.3. Patogênese

A patogenese dos DHG permanece não elucidada, mas predisposição genética, mal adaptação imunológica resultante em isquemia placentária e conseqüente distúrbio materno vascular endotelial, além de falha na placentação, são aceitos unanimemente (Roberts e Cooper, 2001). Há décadas, inúmeras teorias vêm sendo propostas para explicar a gênese da PE, mas até o momento nenhuma foi aceita de forma definitiva.

A PE não pode ser atribuída somente à redução de perfusão placentária. Atualmente, dois fatores são considerados importantes no mecanismo fisiopatológico da doença: o quadro de peroxidação lipídica e o da resposta inflamatória sistêmica exacerbada (Redman *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001a; 2001b). Sob vários aspectos, estas duas hipóteses se confundem em uma só, visto que podem ser entendidas como processos complementares, em que a primeira é capaz de desencadear a segunda situação clínica (Kim *et al.*, 2001a; 2001b). Parece que gestações com invasão trofoblástica deficiente tendem a desenvolver hipóxia tissular, levando à produção aumentada de peróxido lipídico no tecido placentário e elevação dessa substância na circulação fetoplacentária (Kim *et al.*, 2001a; 2001b). A capacidade de peróxidos lipídicos de lesar células endoteliais é conhecida de longa data, sendo este o ponto de contato entre as duas teorias, já que a resposta inflamatória sistêmica, na maior parte das vezes, se inicia com a lesão endotelial (Redman *et al.*, 1999). Alguns trabalhos experimentais demonstram que a PE constitui uma síndrome típica da exacerbação da resposta inflamatória sistêmica. A lesão endotelial com elevação das endotelinas, o aumento da agregação plaquetária e o depósito de fibrinogênio em diversos órgãos são componentes de um processo inflamatório sistêmico típico (Faas *et al.*, 1997; Faas *et al.*, 2000). Observa-se na gravidez normal a elevação da atividade de granulócitos, monócitos e linfócitos, caracterizando a presença de atividade inflamatória (Faas *et al.*, 1997; Faas *et al.*, 2000). No entanto, na PE a exacerbação desta atividade, caracterizada

laboratorialmente pela elevação destes marcadores, constitui achado bastante sugestivo da participação do processo inflamatório na patogenia da doença (Redman *et al.*, 1999).

Contudo, o mecanismo que desencadeia a resposta inflamatória sistêmica exacerbada nas pacientes portadoras de PE não está bem estabelecido, embora se saiba que o quadro de deportação trofoblástica sistêmica seja capaz de ativar esta resposta (Gervasi *et al.*, 2001).

Vários fatores de predisposição têm sido referidos na patogênese dessa complicação. A prevenção de eclâmpsia pode ser possível a partir de pré-natal muito bem conduzido em que haja identificação das pacientes com maior risco e da intervenção precoce naquelas cujos fatores de predisposição estejam presentes (Ogunyemi *et al.*, 2004). A possível prevenção da PE também tem merecido especial atenção de pesquisadores em todo o mundo, especialmente em estratégias preventivas não farmacológicas (dieta restritiva de sódio, uso suplementar de vitaminas C e E, repouso) e de estratégias preventivas farmacológicas (uso do ácido acetilsalicílico em doses de 100mg, suplementação de cálcio, diuréticos, medicações anti-HAS, uso de heparina) (Norwitz *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2001; Wallenburg, 2001), entretanto, os resultados são dicordantes e novos estudos multicêntricos seriam necessários para auxiliar na elucidação do papel destes possíveis coadjuvantes na prevenção/tratamento da PE. Portanto, até o presente momento a identificação de fatores de predisposição é essencial para que os obstetras monitorem suas pacientes cuidadosamente.

1.4. Fatores de Predisposição

Os fatores de risco para a PE podem ser divididos em Fatores de risco associados à gravidez (tabela 1) e Pré-concepcionais e/ou fatores de risco crônicos (tabela 2) (Dekker, 1999)

Tabela 1. Fatores de risco para a PE associados à gravidez

Fatores de risco para a PE associados à gravidez
Infecção do trato urinário
Anormalidades cromossômicas (trissomia 13, triploidia)
Anormalidades estruturais congênitas
Hidropsia fetal
Mola hidatiforme

Tabela 2. Fatores de risco para a PE pré-concepcionais

Fatores de risco para PE pré-concepcionais
Fatores de risco relacionados ao parceiro: Primeira gestação, limitada exposição ao esperma, inseminação por doador, parceiro que teve, com outra parceira, história de PE
Fatores de risco maternos: PE prévia, idade materna avançada ou precoce, intervalo entre as gestações, história familiar, paciente que recebeu doação de oócitos, raça negra, gestações múltiplas assistidas, Hormônio da Gonadotrofina Coriônica (HCG) elevado
Presença de doenças específicas: Doença renal e HAS prévia, HAS antes de 20 semanas, obesidade, resistência à insulina, Diabetes Melito (DM) gestacional e DM tipo 1, peso materno baixo ao nascer, testosterona elevada, hiperlipidemia. Alterações da hemostasia: mutação Fator V Leiden, deficiência de proteína S, presença de anticorpos anti-fosfolipídeos, hiperhomocisteinemia, aumento do inibidor da ativação do plasminogênio (PAI –1) PAI-2
Fatores exógenos: Fumo, stress oxidativo, sazonalidade, depressão, ansiedade, <i>stress</i> , dieta calórica, rica em ácidos graxos polinsaturados e sucrose

Na população brasileira, somente um estudo sobre a frequência e os fatores de risco dos DHG foi publicado, até o momento (Gaio *et al.*, 2001). Os autores concluíram que os DHG são complicações da gravidez comuns nas mulheres brasileiras e que na região da Amazônia é onde se encontram as menores frequências de todo o país. Além disso, as frequências dos fatores de risco encontrados nessa população foram similares aos

encontrados em mulheres com DHG de outros países (Sibai *et al.*, 2005): idade avançada, estado nutricional (obesidade) e paridade (número de gestações).

1.5. Fatores genéticos de risco

A investigação dos fatores genéticos associados com doenças humanas frequentes e complexas alcança, atualmente, alta prioridade em pesquisas na área de Genética Humana e Médica. Parece haver uma susceptibilidade para que esta doença ocorra, pois têm sido evidenciado que a PE ocorre nas famílias com história desta complicação e que a influência se dá tanto pelos genes maternos quanto pelos genes paternos (Chesley e Cooper, 1986; Arngrimsson *et al.*, 1990; Arngrimsson *et al.*, 1995; Cincotta e Brennecke, 1998; Mogren *et al.*, 1999; Treolar AS *et al.*, 2001; Esplin *et al.*, 2001). O modelo de herança genética que melhor se ajusta à PE tem sido extensivamente discutido, permanecendo controversos os modelos de herança baseados em genes maternos, genes fetais ou a sua interação (Skjaerven *et al.*, 2005). Chesley e Cooper (1986) e Arngrimsson *et al.* (1990) preconizaram o modelo do gene materno recessivo, com penetrância incompleta ou herança multifatorial. Cincotta e Brennecke (1998), de acordo com o modelo do gene materno, relataram que, em primigrávidas, a história familiar (mães, irmãs ou ambas) de PE está associada a um aumento de 4 vezes o risco de PE severa. É sugerido, portanto, por esses pesquisadores que o questionamento sobre história familiar seja incluído na história clínica da paciente. Outros investigadores questionaram o modelo do gene materno e apontaram envolvimento dos genes fetais (Thornton e Onwude, 1991; Thornton e Macdonald, 1999; Treolar *et al.*, 2001), interação entre os genes maternos e fetais (Cooper e Liston, 1979; Liston e Kilpatrick, 1991) ou influência dos genes paternos

(Esplin *et al.*, 2001). Ainda, em recente estudo, em que a recorrência de PE entre as gerações foi investigada, confirmou-se que tanto os fatores maternos quanto paternos contribuem para o risco de PE. Além disso, o estudo acrescentou que o risco é maior pelos genes maternos, presumivelmente porque as mães carregam a suscetibilidade e também por transmitirem fatores de risco genéticos independentes para seus fetos. O risco paterno é menor porque os pais transmitem apenas fatores genéticos de risco ao feto (Skjaerven *et al.*, 2005). A elucidação genética da PE a nível molecular e o encontro de genes candidatos ao desenvolvimento desta doença tem se mostrado um desafio. A maioria das investigações tem sido de polimorfismos e mutações de genes de suscetibilidade materna em estudos de associação casos e controles. Os genes candidatos são muitos e os estudos mostram resultados conflitantes (Lachmeijer *et al.*, 2002, Morrison *et al.*, 2002, GOPEC Consortium, 2005). Ainda, esses estudos estão restritos às populações dos Estados Unidos da América, Europa e Ásia. Até o presente momento, não encontramos publicações completas relacionadas à população brasileira, referentes aos polimorfismos que estudamos. Para desenvolver o presente estudo foram selecionados, por estarem relacionados com a fisiopatologia da PE, alguns sistemas, tais como: genes envolvidos com a hemostasia e estresse oxidativo. Será desenvolvido, a seguir, as razões pelas quais estes sistemas foram escolhidos, bem como a descrição dos polimorfismos.

1.5.1. Genes Candidatos Ligados a Hemostasia

Polimorfismos em vários genes pró-trombóticos têm sido associados com trombose venosa e/ou com a doença arterial: polimorfismo do gene da metilenotetrahidrofoloreductase (MTHFR C677T), polimorfismo do gene do Fator V

Leiden (FVL), mutação do gene da Protrombina G20210A, polimorfismo do gene do Inibidor da Ativação do Plasminogênio –1 4G/5G.

A gestação por si é um estado de hipercoagulabilidade (Lockwood, 1999; Kupferminc, 2005) e complicações obstétricas, incluindo a PE, podem envolver perfusão placentária diminuída. Doenças trombofílicas aumentam o risco de trombose venosa durante a gestação e podem predispor a complicações vasculares neste período (Kujovich, 2004). Além disso, é descrito que a PE e a E são estados que apresentam alterações na coagulação, evidenciado por se ter um aumento na formação de fibrina, na ativação do sistema fibrinolítico e plaquetário e, ainda, de diminuição da contagem de plaquetas (Perry e Martin, 1992).

A ação da trombofilia, a tendência à trombose tem sido estudadas e essas têm sido ligadas a muitos aspectos da gestação. Recentemente, tem sido determinado que complicações graves, como a PE, podem estar associadas com trombofilias. Por isto, é possível que estes polimorfismos pró-trombóticos possam predispor ao desenvolvimento de PE. Além disso, também é possível que a progressão da gravidade da PE possa ser, em parte, determinada pela presença desses polimorfismos citados (Kupferminc, 2005; Kujovich, 2004).

Polimorfismo do gene do MTHFR C677T

O gene da MTHFR tem 77 kb com 11 éxons e 10 íntrons, e está localizado no braço curto do cromossoma 1 região 36 (1p36) (Frosst *et al.*, 1995). A mutação do tipo *missense* no gene da metilenotetrahidrofolato redutase promove a substituição do nucleotídeo citosina por timina (C →T no nucleotídeo 677, exon 4) e resulta em redução da síntese de 5, metilenotetrahidrofolato, doador de metil na conversão de homocisteína para metionina, levando ao aumento dos níveis de homocisteína que, por sua vez, está relacionado com

dano vascular (McCully, 1996) e é fator de risco para trombose venosa e arterial (Frosst *et al.*, 1995; Kluijtmans *et al.*, 1996). Hiperhomocisteïnemia tem sido descrita em pacientes com PE (Dekker *et al.*, 1995; Raikovic *et al.*, 1997). Estudo realizado em Los Angeles (EUA) refere que o genótipo TT foi mais freqüente em hispânicos (15,2%), quando comparados a brancos (10,2%), asiáticos (8,2%) e negros (2,4%) (Levine *et al.*, 2000) em pacientes com adenoma de colo-retal. Estudos feitos em Israel (Kupfermanc *et al.*, 1999; Kupfermanc *et al.*, 2000a), no Japão (Sohda *et al.*, 1997) e na Itália (Grandone *et al.*, 1997) mostraram associação dos genótipo TT com aumento significativo de risco de PE. Em contraste, estudos realizados nos EUA (Powers *et al.*, 1999; Livingston *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001b), Austrália (Kaiser *et al.*, 2000), Grã-Bretanha (O'Shaughnessy *et al.*, 1999), Finlândia (O'Shaughnessy *et al.*, 1999; Laivuori *et al.*, 2000), Países Baixos (Lachmeijer *et al.*, 2001) não mostraram uma associação entre a mutação C677T com PE em amostras maternas (Powers *et al.*, 1999, Kaiser *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 2001b) ou fetais (Livingston *et al.*, 2001).

Polimorfismo do gene do Fator V Leiden – FVL e o Polimorfismo do gene da Protrombina G20210A

O fator V (fV) é uma glicoproteína de 330 kDa, sintetizada nos hepatócitos e megacariócitos, podendo ser encontrado no plasma e grânulos plaquetários. O gene do FV localiza-se no cromossomo 1, apresenta 80 kb de comprimento e está organizado em 25 éxons. O FV é ativado pela trombina e atua como cofator na ativação da protrombina pelo fator X (Tuddenham e Cooper, 1994).

A proteína C ativada (APC) é uma glicoproteína que inibe fisiologicamente o FV através da clivagem específica dos resíduos Arg 306, Arg 506 e Arg 679; além disso, a APC age sobre o sistema fibrinolítico, inativando os inibidores desse sistema. Uma

mutação no gene do FV (conhecida como fator V Leiden - FVL), uma troca de base G/A no nucleotídeo 1691 (G1691A), causa a substituição de uma arginina por uma glutamina na posição 506 da proteína. Essa mutação faz com que o FV seja resistente à ação da proteína C ativada, não sendo apropriadamente inativado (Bertina *et al.*, 1994). Até 1993, somente 5 a 20% dos pacientes com trombose idiopática apresentavam trombofilias hereditárias. A partir dessa data, com a descoberta do controle genético da resistência do fator V à APC, essa situação mudou consideravelmente.

O FVL é a causa genética mais comum para trombose venosa entre causasóides (Burick *et al.*, 1997). A prevalência da mutação varia de 2 a 15% em diferentes populações mundiais (Jeffery *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Gregg *et al.*, 1997; Tamim *et al.*, 2002). A mutação FVL em brasileiros causasóides apresentou uma distribuição similar a de outros trabalhos, ocorrendo em cerca de 20% de pacientes com trombose venosa e em cerca de 3-5% de indivíduos da população em geral (Arruda *et al.*; 1995).

Diversos trabalhos demonstraram uma associação significativa entre a mutação FVL e a incidência de trombose venosa e tromboembolismo (Beauchamp *et al.*, 1994; Svensson *et al.*, 1997; Simioni *et al.*, 1997; Boundel *et al.*, 2002). A presença da mutação fV Leiden tem sido associada com a ocorrência de trombose venosa nas gestações (Hellgren *et al.*, 1995; Hallak *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2000). Segundo Dahlback *et al.*, (1994) a mutação FVL está associada com mais de 60% das complicações tromboembólicas ocorridas durante a gestação.

A protrombina (F II) é uma glicoproteína de 72 kDa sintetizada no sangue em sua forma inativa. O gene da protrombina localiza-se no cromossomo 11, apresenta 21 kb e está organizado em 14 éxons. A protrombina é o precursor da trombina, a enzima responsável pela etapa final da cascata da coagulação. A protrombina é ativada pelo fator X, na

presença do fator V. A ativação da protrombina se dá através da clivagem dos resíduos Arg 271 e Arg 320 (Tuddenham e Cooper, 1994).

A trombina é uma enzima extremamente importante nos processos de hemostasia e trombose, exibindo atividade procoagulantes, anticoagulantes e antifibrinolíticas. A trombina também ativa diversas respostas celulares, que são essenciais no processo aterotrombótico (Maraganore, 1993).

O polimorfismo G20210A, localizado na região 3' não-traduzida do gene da protrombina, foi descrito associado à trombose venosa (Poort *et al.*, 1996). Indivíduos portadores do alelo 20210A apresentariam níveis de protrombina cerca de 20% mais elevados. Diversos estudos têm confirmado a associação do alelo 20210A com trombose venosa (Arruda *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1997; Corral *et al.*, 1997; Cumming *et al.*, 1997; Ferraresi *et al.*, 1997; Hillarp *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1997; Kapur *et al.*, 1997; Bloem *et al.*, 1998; Bucciarelli *et al.*, 1998), entretanto, em relação a trombose arterial, os resultados permanecem controversos.

A freqüência da mutação da protrombina em caucasóides é de aproximadamente 2%, elevações na prevalência dessa variante foram descritas no sul da Europa em comparação ao norte europeu (Rosendaal *et al.*, 1998). Aparentemente, a freqüência da variante G20210A é muito rara em populações não-caucasóides (Dilley *et al.*, 1998; Rosendaal *et al.*, 1998; Mathonnet *et al.*, 2002), não podendo portanto ser considerada com um fator de risco cardiovascular preditivo nessas populações. Franco *et al.* (1998) verificaram que a freqüência do alelo 20210A é extremamente baixa em populações brasileiras não-caucasóides.

As placentas infartadas com trombozes são características comuns em placentas de mulheres com PE (Morgan *et al.*, 1999), por isto a mutação do fator V Leiden e da

protrombina são genes candidatos à susceptibilidade à PE. Entretanto os resultados dos estudos são contraditórios, provavelmente pela diferença entre as populações estudadas, tipo de estudo e, também, pela diferença na classificação dos DHGs (Morrison *et al.*, 2002; Ament, 2003; Kupferminc, 2005). Dados da literatura sugerem que principalmente a forma grave de PE pode estar associada à mutação do fV Leiden (Kupferminc, 2005).

Polimorfismo do gene do Inibidor da ativação do plasminogênio –1 4G/5G

O inibidor tipo 1 ativador do plasminogênio (PAI-1) é uma glicoproteína de 50 kDa, sintetizada no fígado e células endoteliais, que circula no sangue na sua forma inativa. O gene que codifica o PAI-1 localiza-se no cromossomo 7 e apresenta 9 éxons. O PAI-1 é uma proteína de fase aguda e o principal inibidor do t-PA (ativador tissular do plasminogênio) e u-PA (ativador do plasminogênio tipo uroquinase) do sistema fibrinolítico. Os níveis plasmáticos de PAI-1 são de aproximadamente 0,05 mg/L (Tuddenham e Cooper, 1994).

Os níveis de PAI-1 são regulados por citocinas, lipopolissacarídeos, hormônios, VLDL-colesterol e insulina (Green e Humphries, 1994). Idade, tabagismo, ingestão de álcool e dieta também podem aumentar os níveis de PAI-1 (de Maat *et al.*, 1996). Como o PAI-1 é o principal inibidor do sistema fibrinolítico, elevados níveis plasmáticos poderiam ter um efeito protrombótico. Hamsten *et al.* (1985) e Hamsten *et al.* (1987) observaram uma associação positiva entre altos níveis de PAI-1 e o risco de infarto, inclusive recorrente. No entanto, Folsom *et al.* (1998) não observaram diferenças significativas nas concentrações de PAI-1 em um estudo de famílias com alta incidência de doença aterosclerótica coronariana, quando comparadas às famílias em geral.

Já foram descritos diversos polimorfismos de DNA no gene do PAI-1, que parecem estar associados às concentrações plasmáticas desse inibidor; o polimorfismo de

inserção/deleção (4G/5G), localizado na posição -675 da região promotora do gene, é o mais investigado. O alelo de deleção (4G) estaria associado aos níveis mais elevados de PAI-1 (Margaglione *et al.*, 1997; Margaglione *et al.*, 1998)

O polimorfismo de inserção/deleção (4G ou 5G) na região promotora do gene do PAI-1 está envolvido na regulação da síntese deste inibidor (alelo 4G), estando associado com aumento da expressão do gene e de níveis plasmáticos de PAI-1. Glueck *et al.* (2001) investigaram este polimorfismo como um possível fator de contribuição para complicações obstétricas, incluindo pacientes com PE grave, e verificaram que mulheres com complicações obstétricas apresentaram maior frequência do genótipo 4G/4G. Yamada *et al.* (2000) e Fabbro *et al.* (2003), encontraram associação entre o polimorfismo 4G/5G do gene do PAI-1 e PE. Entretanto, este resultado não foi encontrado em outros estudos (Morrisson *et al.*, 2002, Pegoraro *et al.*, 2003, de Maat *et al.*, 2004).

Vários grupos têm estudado as possíveis relações entre os genes referidos anteriormente e os DHG, entretanto os resultados são conflitantes. A Tabela 3 apresenta resultados obtidos por diferentes autores das relações entre 3 mutações pró-coagulantes (FVL, MTHFR, Protrombina) e DHG. É importante observar que:

- (1) Vários destes estudos estão restritos a somente 1 ou dois polimorfismos pró-trombóticos (Dizon-Townson *et al.*, 1996; Grandone *et al.*, 1997; Lindoff *et al.*, 1997; Mimuro *et al.*, 1998., Nagy *et al.*, 1998; van Pampus *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2000; Zusterzeel *et al.*, 2000; Rigo *et al.*, 2000) e a investigação do possível efeito sinérgico destes polimorfismos não pode ser, portanto, investigada.
- (2) A definição de PE e a seleção dos controles também têm sido variada entre estes estudos (Dizon-Townson *et al.*, 1996; Grandone *et al.*, 1997; Lindoff

et al., 1997; Nagy *et al.*, 1998; Mimuro *et al.*, 1998; Kupfermanc *et al.*, 1999; Grandone *et al.*, 1999; Higgins *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2000; Zusterzeel *et al.*, 2000; Rigo *et al.*, 2000; Kupfermanc *et al.*, 2000a).

- (3) Alguns estudos têm um pequeno número de casos estudados e controles (Lindoff *et al.*, 1997; Shoda *et al.*, 1997; Mimuro *et al.*, 1998, Nagy *et al.*, 1998., Von Templehoff *et al.*, 2000., Kupfermanc *et al.*, 2000a., Dávalos *et al.*, 2005), além de outros que não constam na Tabela 3 (D'Elia *et al.*, 2002, Fabbro *et al.*, 2003).

As razões acima descritas, além das diferentes populações estudadas, podem explicar, pelo menos em parte, os resultados controversos. A ausência de estudos na população brasileira sobre este tema nos levou a propor este trabalho a fim de auxiliar e contribuir para a elucidação do papel destes polimorfismos acima citados e a PE.

Tabela 3. Estudos caso-controle de fatores de risco genéticos pró-trombóticos em hipertensões gestacionais com ou sem proteinúria

Autor	N (casos)	FVL* RC (95%IC)**	MTHFR C677T* RC (95%IC)**	Protrombina G2021A* RC (95%IC)**
Van Pampus <i>et al.</i> , 1999	345 (284 PE)	4,2 (0,55-32,15)	-	-
Kupfermanc <i>et al.</i> , 1999	110 (34 PEG)	5,3 (1,8-15,60)	2,9 (1,0-8,5)	2,2 (0,4-13,9)
Kupfermanc <i>et al.</i> , 2000a	63	4,61 (1,83-11,58)	2,97 (1,29-6,81)	2,63 (0,68-10,16)
Nagy <i>et al.</i> , 1998	69	4,26 (1,15-15,76)	-	-
Grandone <i>et al.</i> , 1997	96	4,9 (1,3-18,3)	1,8 (1,0-3,5)	-
Grandone <i>et al.</i> , 1999	70 PE + 70DHG	PE 3,2 (0,78-13,14) DHG 5,96 (1,69-21,0)	PE 2,0 (1,06-3,76) DHG 1,27 (0,64-2,53)	PE 3,83 (1,49-9,87) DHG 2,16 (0,74-6,29)
Lindoff <i>et al.</i> , 1997	50	1,98 (0,61-6,38)	-	-
Von Templehoff <i>et al.</i> , 2000	61	PE 5,0 (1,4-18,5) PE + HELLP 4,73 (1,26-17,74)	-	-
Livingston <i>et al.</i> , 2001	110	1,8 (0,44-7,43)	1,3 (0,46-3,44)	
Mimuro <i>et al.</i> , 1998	50	12,96 (1,41-118,84)		
Powers <i>et al.</i> , 1999	99 PE + 24HG		PE 1,28 (0,58- 2,79) DHG 1,43 (0,43-4,79)	
Kaiser <i>et al.</i> , 2001	40E + 116PE		0,71 (0,39-1,90)	
Kobashi <i>et al.</i> , 2000	101 DHG (73 PE)		PE 0,68 (0,30- 1,55) DHG 0,71 (0,37-1,51)	
Sohda <i>et al.</i> , 1997	67		2,5 (1,3-48,00)	

Kupfermanc <i>et al.</i> , 2000b	55 PEG + 25 PEL			PEG 3,02 (0,84-10,9) PEL 2,9 (0,48-14,3)
O'Saughnessy <i>et al.</i> , 1999	283	0,88 (0,33-2,33)	0,90 (0,44-1,83)	
De Groot <i>et al.</i> , 1999	163	1,07 (0,51-2,25)		0,83 (0,25- 2,77)
Rigo <i>et al.</i> , 2000	120	7,33 (2,13-25,30)	1,13 (0,38-3,37)	
Dizon-Townson <i>et al.</i> , 1996	158	2,21 (1,06-4,59)		
Kim <i>et al.</i> , 2001b	281	1,28 (0,59-2,80)	1,03 (0,64-1,69)	
Zusterzeel <i>et al.</i> , 2000	95 HELLP+ 85 sem HELLP		1,38 (0,78-2,44)	
Lachmeijer <i>et al.</i> , 2001	47 PE + 127 PE familiar		0,92 (0,28-3,1)	0,85 (0,35-2,1)
Laivouri <i>et al.</i> , 2000	113		0,5 (0,14-1,77)	
Kaiser <i>et al.</i> , 2000	33 E + 114 PE		0,71 (0,33-1,57)	
Higgins <i>et al.</i> , 2000	44 E +145 PE			1,53 (0,33-7,01)
Dávalos <i>et al.</i> , 2005	33 PE + E	0,98 (0,94-1,03)	0,97 (0,75-1,24)	

* FVL= Mutação Fator V Leiden do gene do Fator V, MTHFR = Polimorfismo C677T do gene do MTHFR, Mutação G20210A do gene da Protrombina.

E = Eclâmpsia, PE = pré-eclâmpsia, PEG = pré-eclâmpsia grave, PEL = pré-eclâmpsia leve.

** Razão de chances (RC) 95% Intervalo de confiança (95%IC).

1.5.2 Gene candidato para o DHG ligado ao estresse oxidativo

Polimorfismos envolvendo gene do Óxido Nítrico Sintetase (eNOS)

O óxido nítrico (ON) é um metabólito da L-arginina, sintetizado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês: *nitric oxide synthase*) (Moncada e Higgs, 1993). A NOS tem três isoformas (Lowestein, 1994): endotelial (eNOS ou NOS3), induzível (iNOS ou NOS2) e neuronal (nNOS ou NOS1). É um vasodilatador com propriedades antitrombóticas e ateroprotetoras (Hogg *et al.*, 1993; Garg *et al.*, 1989; Kubes *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1996; Radomski *et al.*, 1987) e atua inibindo a contração do músculo liso e a agregação plaquetária.

O ON aumentado no tecido placentário durante a gestação normal, contribui para a vasodilatação, remodelamento vascular e inibição da agregação plaquetária (Forstermann, 1994; Sladek *et al.*, 1997). Além disso, contribui para o sistema de vasodilatação materna, regula o fluxo uterino e feto-placentário (Sladek *et al.*, 1997). Entretanto, a atividade da NOS parece estar diminuída em placenta de mulheres com PE (Brennecke *et al.*, 1997). Sua deficiência têm sido implicada na patogênese da HAS, aterosclerose e PE (Celermajer *et al.*, 1992, Cayatte *et al.*, 1994; Celermajer *et al.*, 1994; Seligman *et al.*, 1994; Cockell *et al.*, 1997; Forte *et al.*, 1997).

O gene da eNOS tem 21kb com 26 éxons e 25 íntrons, localizados no braço longo do cromossoma 7 região 35-36 (7q35-36) (Nadaud *et al.*, 1994) e codifica uma proteína altamente conservada entre várias espécies de mamíferos (Li *et al.*, 2002). Foi sugerido que polimorfismos no gene da eNOS podem alterar os níveis ou a atividade desta enzima, levando à redução ou ao excesso de produção de ON, podendo contribuir para vários processos patológicos (Förstermann *et al.*, 1998; Hingorani, 2000; Wang e Wang, 2000).

Entre os diversos polimorfismos descritos no gene da eNOS, três se destacam: uma substituição de base no exon 7 (Glu298Asp), que leva a uma troca de aminoácido na posição 298 da proteína (E298D) (Hingorani, 2000; Wang e Wang, 2000), uma repetição de 27pb no intron 4 (intron-4) e uma substituição de base na região promotora (-786T→C). Estes polimorfismos têm sido investigados em diversas populações em relação à DAC, à hipertensão e ao IAM, mas os resultados obtidos são inconsistentes (Wang e Wang, 2000). Estudos funcionais têm demonstrado que o alelo -786C reduz a atividade do promotor da eNOS em até 50% (Nakayama *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000).

Polimorfismos Glu298Asp , intron-4 e -786T→C no DHG

Polimorfismo Glu298Asp

Este polimorfismo tem sido associado com o desenvolvimento de desordens nas quais a vasodilatação do endotélio e a bioatividade do ON estão prejudicadas (Miyamoto *et al.*, 1998; Shimasaki *et al.*, 1998; Yoshimura *et al.*, 2000; Savvidou *et al.*, 2001). Em estudos realizados na população japonesa, a presença do alelo T foi mais freqüente entre gestantes com DHG (Kobashi *et al.*, 2001) e em pacientes com PE grave (Yoshimira *et al.*, 2000) quando comparado com gestantes normotensas. Além disso, foi também associado, com DPP (Yoshimira *et al.*, 2001). Hakli *et al.* (2003) observaram, em pacientes da população do oeste da Finlândia, significância marginal, sugerindo que outro(s) polimorfismo(s) devam estar associados à PE. Entretanto, estes resultados não foram confirmados em outras populações (Yoshimira *et al.*, 2003; Landau *et al.*, 2004; Tempfer *et al.*, 2004).

Polimorfismo intron-4

Caracteriza-se pela repetição de uma seqüência consenso de 27 bp. Essa variante genética está relacionada com as diferenças nos níveis plasmáticos de ON (Wang *et al.*, 1997; Tsukada *et al.*, 1998). Tanto a incidência quanto a severidade da PE foram associadas à presença do alelo A em pacientes estudadas por Tempfer *et al.* (2001). Em estudo que comparou a freqüência dos alelos entre gestantes nos EUA com PE e gestantes sem esta complicação, constatou-se que as pacientes com alelo A apresentavam níveis pressóricos maiores no começo da gestação do que as gestantes controles (Bashford *et al.*, 2001). Por outro lado, em estudo realizado na população chinesa, Zhou *et al.* (2003) não encontrou associação quando investigou pacientes com PE comparando-as com gestantes normais.

Polimorfismo -786T→C

A variação T/C na posição 786 suprime a transcrição do gene eNOS, mostrando uma redução maior que 50% na atividade do promotor (Nakayama *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000). Somente dois estudos avaliaram possível associação entre PE e este polimorfismo: Serrano *et al.* (2004) observaram através de estudo, na população Colombiana, com análise de haplótipos (destes três polimorfismos citados) que há associação com a amostra de pacientes com PE quando comparadas a gestantes com níveis pressóricos normais. Além disso, Tempfer *et al.* (2004) encontraram que os níveis de eNOS estão associados com o desenvolvimento e o curso clínico da PE.

Considerando esses dados, é de fundamental importância a identificação dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da hipertensão na gravidez, já que a intervenção precoce nas pacientes em risco poderia contribuir para evitar o surgimento e a progressão da patologia, diminuindo, assim, o risco de morbi-mortalidade materna e perinatal. O

estudo de genes candidatos poderá permitir que a identificação de pacientes em risco possa ser realizada, tornando viável abordagens preventivas com detecção e tratamento precoces, fatores esses importantes para o sucesso do tratamento de DHG. O presente trabalho estudou as relações entre essas variantes moleculares e à PE na população brasileira.



2. OBJETIVOS

Os DHG, especialmente a PE e suas complicações, representam uma questão de saúde pública de grande impacto ao nível mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento por representarem a principal causa de morte materna e fetal.

Os objetivos do presente estudo de caso-controle podem ser resumidos como segue:

↳ Objetivo geral: investigar o papel de polimorfismos de DNA relacionados à hemostasia e ao estresse oxidativo na patogênese da PE.

↳ Objetivos específicos:

(1) Identificar os fatores de risco maternos nas pacientes com DHG em nossa população.

(2) Analisar a associação entre os polimorfismos C677T do gene da MTHFR, FVL do gene do FV, G20210A do gene da protrombina, 4G/5G do gene do PAI-1 e a ocorrência e/ou severidade da PE em gestantes com essa complicação quando comparadas à gestantes normotensas.

(3) Analisar a associação dos polimorfismos Glu298Asp, intron-4 e -786T→C do gene da óxido nítrico sintetase endotelial e a ocorrência e/ou severidade da PE em gestantes com essa complicação quando comparadas à gestantes normotensas.

(4) Analisar a associação através dos haplótipos dos polimorfismos Glu298Asp, intron-4 e -786T→C do gene da óxido nítrico sintetase endotelial e a ocorrência e/ou severidade da PE em gestantes com essa complicação quando comparadas à gestantes normotensas.

CAPÍTULO III

**“FREQUENCY OF RISK FACTORS FOR
HYPERTENSIVE DISORDERS IN PREGNANCY IN
SOUTHERN BRAZIL”**

**Manuscrito a ser submetido ao periódico Revista
Brasileira de Saúde Pública (2006)**

Risk factors for hypertensive disorders in pregnancy in Southern Brazil
Fatores de risco para os distúrbios hipertensivos da gestação no Sul do
Brasil

Caroline Abrão Dalmáz^{a,b}, Kátia Gonçalves dos Santos^a, Citânia Lúcia
Tedoldi^c, Israel Roisenberg^a

^aDepartamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ^bCentro
Universitário La Salle, ^cHospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS,
Brasil

Correspondence to: I. Roisenberg, Departamento de Genética, Instituto de
Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053,
91.501-970 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: + 55 51 3316 6728; fax + 55 51 3316
7311; e-mail: israberger@ufrgs.br

Risk factors for hypertensive disorders in pregnancy

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study was to identify the frequency of risk factors for hypertensive disorders in pregnancy in Southern Brazil.

METHODS: A prospective study was designed and 330 women were included. They were divided in two groups: 161 patients with hypertensive disorders and 169 control subjects matched by age and ethnicity. The frequencies of the risk factors were compared between groups by Fisher's exact test, Chi-square and Student *t* tests. A multivariate logistic regression was performed to assess the independent role of clinical, social and demographic variables, which were significantly associated with occurrence of the hypertensive disease in pregnancy in the univariate analysis.

RESULTS: We found 73% of Caucasians and the mean age was 29.1 years (13–48 years). In the multivariate analysis, the variables significantly associated with hypertensive disease in pregnancy were the following: presence of family history of preeclampsia ($p=0.02$; OR=7.05; 95%CI=1.99-24.92), presence of diabetes ($p<0.01$; OR=3.87; 95%CI=1.22–12.27) and occurrence of chronic hypertension ($p=0.02$; OR=1.70; 95%CI=0.54-5.32).

CONCLUSIONS: The risk factors associated with hypertensive disorders in pregnancy appear to be similar to those reported in other countries and our results reflect behavioral factors whereby women may be predisposed to an increased risk of preeclampsia, thus the knowledge of the risk factors could be helpful in a prenatal care.

KEYWORDS: Hypertensive disorders in pregnancy. Risk factors. Brazil.

RESUMO

OBJETIVO: O objetivo deste estudo foi identificar a freqüência dos fatores de risco nas distúrbios hipertensivos da gestação no Sul do Brasil.

MÉTODOS: Estudo prospectivo em que 330 mulheres foram incluídas. Elas foram divididas em dois grupos: 161 pacientes com distúrbios hipertensivos da gestação e 169 controles pareadas por idade e etnia. A freqüência dos fatores de risco foi comparada entre os dois grupos através dos testes estatísticos: teste exato de Fisher, Qui-quadrado e teste *t* Student. A análise de regressão multivariada foi realizada para estimar as variáveis clínicas, sociais e demográficas que foram associadas com a ocorrência de distúrbios hipertensivos da gestação na análise univariada.

RESULTADOS: O grupo das pacientes foi composto de 73% de mulheres Caucasianas e a média de idade foi de 29,1 anos (13-48 anos). Na análise multivariada, as variáveis significativamente associadas com as distúrbios hipertensivos da gestação foram: história familiar de preeclampsia ($p=0,02$; $OR=7,05$; $95\%IC=1,99-24,92$), diabetes ($p<0,01$; $OR=3,87$; $95\%IC=1,22-12,27$) e hipertensão crônica ($p=0,02$; $OR=1,70$; $95\%IC=0,54-5,32$).

CONCLUSÕES: Em conclusão, os fatores de risco associados aos distúrbios hipertensivos da gestação são similares aos descritos em outros países e o conhecimento desses fatores de risco de nossa população pode auxiliar nas condutas do pré-natal.

DESCRITORES: Distúrbios hipertensivos da gestação. Fatores de risco. Brasil.

INTRODUCTION

The hypertensive disorders of pregnancy affect up to 8% of all gestations and are the second leading cause, after embolism, of maternal mortality in United States, accounting for almost 15% of such deaths.^{20,2} Expectant mothers with hypertension are predisposed toward the development of potentially lethal complications, mainly abruptio placentae, disseminated intravascular coagulation, cerebral hemorrhage, hepatic failure, and acute renal failure.²²

The causes of most cases of hypertension during pregnancy, particularly preeclampsia, remains unknown and is one of the major obstetrical problems in less-developed countries.⁸ The obstetricians are attempting to recognize and diagnose early this complication. However, biophysical and biochemical tests have been suggested to identify women who are at increased risk future development of this complication. Unfortunately, some of these tests are invasive whereas others require expensive techniques or special expertise that preclude their utility in routine screening.^{8,9} In addition, the results of the pooled data for the various tests studied suggest that many of them have poor sensitivity and poor predictive value.^{8,9}

Several risk factors have been described as predisponent to hypertensive disorders in pregnancy worldwide, such as: family history of preeclampsia,⁸ preeclampsia in a previous pregnancy,^{4,15} multifetal gestation,^{4,23,25} obesity,¹⁸ nulliparity,¹⁹ diabetes,¹⁹ chronic hypertension,⁴ and extremes of maternal age.⁸

The knowledge of the most important risk factors in our population could be useful to identify the patients who have higher chances to develop the hypertensive disorders, and, subsequently, adequate prenatal care could contribute to decrease this mortality ratio.

Reports designed to identify risk factors for hypertensive disorders of pregnancy in our country are scarce.¹² Therefore, the aim of the present study was to identify the frequency of risk factors for hypertensive disorders in Southern Brazil.

METHODS

A prospective study was developed considering 161 patients with hypertensive disorders and 169 control subjects matched by age and ethnicity. Subjects were recruited in the Maternity of a tertiary public hospital in Southern Brazil (Hospital Nossa Senhora Conceição) and we classified the hypertensive disorders in pregnancy according to the proposal of the ACOG.¹ At enrollment, a standardized questionnaire provided information on age, weight, height, schooling (divided by levels and if completed or not), ethnicity, smoking habits, and known risk factors for hypertension in pregnancy. Body mass index (BMI) was calculated considering the values of weight and height obtained at the first appointment, and results were described as mean BMI. All subjects gave their written informed consent to be included in the study, and protocol was approved by the ethics committee of Grupo Hospitalar Conceição and by the National Research Committee of Ethics.

The frequencies of risk factors were compared between groups by Fisher's exact test, Chi-square and Student *t* tests. A multivariate logistic regression analysis was performed by a backward procedure to assess the independent role of clinical, social and demographic variables, which were significantly associated with hypertensive disease in pregnancy in the univariate analysis, using the SPSS package. The variables tested in the univariate analysis included the family and the previous history of preeclampsia, obesity, nulliparity, diabetes, chronic hypertension, smoking habits, schooling, multifetal gestation and extremes of maternal age. The continuous variable (BMI) was entered as linear factor after being tested for nonlinearity, using the SPSS package. The P-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

We found 73% of Caucasians and the mean age was 29.1 years (13–48 years). The frequency of hypertensive disorders complicating pregnancy was 58 mild preeclampsia (36.02%), 51 severe preeclampsia (31.68%), 3 eclampsia (1.86%), 7 gestational hypertension (4.34%), and 42 chronic hypertension with preeclampsia superimposed (26.10%).

Table 1 shows demographic and studied risk factors for hypertensive disorders: the family history of PE, previous PE history, high BMI (overweight and obesity), diabetes, and chronic hypertension were demonstrated to be more frequent in hypertensive disorders in pregnancy when compared to normotensive women;

also, schooling and prenatal presented marginal significance. Regarding nulliparity, multifetal gestation (even so higher in the patients group), extremes of maternal age and smoking habits, there were no significant differences between patients and controls.

Table 2 provides the characteristics of women with hypertensive disorders in pregnancy compared to normotensive women (univariate analysis). The family and previous history of preeclampsia, high BMI, diabetes, chronic hypertension, schooling and prenatal were significantly associated with hypertensive disease in pregnancy while multifetal gestation, nulliparity, extremes of maternal age and smoking habits were not associated with this disorder.

In the multivariate analysis, the following variables remained statistically significant: family history of preeclampsia, diabetes, and chronic hypertension (Table 3).

DISCUSSION

The causes of hypertensive diseases in pregnancy are still uncertain, thus the effective primary prevention is not available in this stage.⁸ However, several risk factors have been identified and modification of some of these risk factors might result in the decreasing of its frequency.

The frequency of eclampsia and chronic hypertension with superimposed preeclampsia are according to other reports that investigated women with hypertensive diseases in pregnancy in a Brazilian population.^{12,16}

In our data, family history of preeclampsia, previous preeclampsia history, high BMI, nulliparity, diabetes, and chronic hypertension were significantly more frequent in patients when compared to the control group. In addition, schooling was less frequent in cases than in controls. Our results are similar to other studies in different populations analyzed.^{13,19,22}

Results of multivariate analysis showed that family history of preeclampsia, diabetes and chronic hypertension are independent risk factors for hypertensive diseases in pregnancy.

The family and the previous history of preeclampsia increased the risk for this complication in our patients. These data have been reported in other studies.²⁴ Indeed, the genetic component in pathophysiological abnormalities of preeclampsia has been suggested,^{3,5} preeclampsia was reported to be more common in daughters of preeclamptic women⁷ and in pregnancies fathered by sons of preeclamptic women;¹¹ this data suggest the involvement of both maternal and fetal genes in the syndrome. Pregnant women with this history should be carefully monitored in the prenatal care and postpartum.⁹ To our knowledge, this is the first study which reported this association in Brazil, and is in agreement with other reports that investigated this risk factor in a different populations in the world.^{19,22}

High BMI was prevalent in both groups being even more frequent in hypertensive women, and is a definite risk factor for developing pregnancy-induced hypertensive disorders, including preeclampsia.¹⁸ Risk increases with greater body mass index,^{8,18} and the possible explanation is the increased shear stress due to hyperdynamic circulation associated with obesity.²² The worldwide increase in obesity is likely to raise the frequency of preeclampsia.⁸ Our result is in agreement with other Brazilian reports published: Nucci *et al* (2001) who showed that overweight nutritional status (obesity and pre-obesity) was associated with an increased risk for preeclampsia¹⁷ and Gaio *et al* (2001) who identified obesity as a risk factor for preeclampsia/eclampsia and chronic hypertension.¹² Actions in public health could prevent and/or treat obesity and, consequently, could prevent hypertensive disorders.

In regard to diabetes, Schmidt *et al* (2001) confirmed that gestational diabetes mellitus is independently associated with preeclampsia in Brazilian women²¹ and, preexisting diabetes mellitus, is also a risk factor for preeclampsia.¹⁹ Women with preexisting chronic hypertension also have an increased risk of preeclampsia.^{23,25} In the present study, we found that diabetes and preexisting chronic hypertension were risk factors for preeclampsia in our population, thus actions in the public health to prevent these diseases is so important to also prevent preeclampsia.

On the other hand, there were no significant differences in multifetal gestation, nulliparity, extremes of maternal age and smoking habits described in some reports as risk factors.^{10,14,19,22} Multiple pregnancy doubles the risk of preeclampsia¹⁹; however, in our findings this association was not established.

Frequency of preeclampsia ranges between 2% and 7% in healthy nulliparous women. Generally, preeclampsia is regarded as a disease of first pregnancy. Our results are not in agreement with other reports even so the frequency is higher in patients than in controls and this is well established as a risk factor.²² Extremes of maternal age were not demonstrated as a risk factor in our subjects, nevertheless this is established risk factor for preeclampsia.²² A curious but consistent finding is that women who smoke cigarettes have a lower risk of preeclampsia than women who do not smoke⁶, however, this benefit is cancelled out by the substantial negative effect of smoking on fetal growth, risk of placental abruption, and general health. In our findings we did not observe this “protective” effect.

Regardless of the indicator of social deprivation, we found that low educational level was more frequent in group of patients, but the difference was not statistically significant. Haelterman *et al* (2003) showed that the burden of preeclampsia is concentrated in socially disadvantaged women, thus health services should be more responsive to the specific needs of these women.¹⁴

In our study, we found the protective effect of the prenatal care and its importance cannot be refuted.

In conclusion, the present study confirmed that family and previous history of preeclampsia, high BMI, diabetes and chronic hypertension are more frequent in hypertensive disorders in pregnancy. Their frequencies appear to be similar to those reported in North American²² and European¹⁹ women, and our results reflect behavioral factors whereby women may be predisposed to increased risk of

preeclampsia.

The knowledge of important risk factors in our population could be useful to help the clinician to detect pregnant women who will develop preeclampsia. Prevention of hypertensive diseases in pregnancy would mean a huge step forward in prenatal care and, assuming that effective prenatal is available, it may have greater potential in the treatment of these diseases.

REFERENCES

1. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol.* 2002;99(1):159-67.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in pregnancy. ACOG Technical Bulletin No:219. Washington, DC: The College; 1996.p.1-8.
3. Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Brit J Obstet Gynaecol.* 1990;97:762-69.
4. Caritis S, Sibai BM, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, et al. Low-dose aspirin to prevent pre-eclampsia in women with high risk. *N Engl J Med.* 1998;338(11):701-05.
5. Chesley LC, Cooper DW. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendents of eclamptic women. *Brit J Obstet Gynaecol.* 1986;93(9):898-908.

6. Conde-Agudelo A, Belizan JM. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *Br J Obstet Gynaecol.* 2000;107(1):75-83.
7. Cooper DW, Hill JA, Chesley LC, Bryans CI. Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. *Br J Obstet Gynaecol.*1988;95(7):644-53.
8. Dekker G, Sibai B. Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. *Lancet.* 2001;357(9251):209-15.
9. Dekker GA, Sibai BM. Early detection of preeclampsia. *Am J Obstet.* 1991;165(1):160-72.
10. Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner NO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet.* 2003;188(5):1241-43.
11. 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.
12. Gaio DS, Schmidt MI, Ducan BB, Nucci LB, Matos MC, Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens Pregnancy.* 2001;20(3):269-81.
13. Gonzáles AL, Ulloa GG, Alpuche G, Romero ARF. Risk factors for preeclampsia. Multivariate analysis. *Ginecol Obstet Mex.* 2000;68:357-62.
14. Haelterman E, Qvist R, Barlow P, Alexander S. Social deprivation and poor access to care as risk factors for severe pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;111(1):25-32.

15. Hnat MD, Sibai BM, Caritis S, Hauth J, Lindheimer MD, MacPherson C, et al. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine-Units. Perinatal outcome in women with recurrent preeclampsia compared with women who developed preeclampsia as nulliparous. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(3):422-36. Erratum in: *Am J Obstet Gynecol.* 2003;189(1):244.
16. Kahhale IS, Zugaib M. Síndromes hipertensivas na gravidez. Rio de Janeiro: Atheneu; 1995.p.215-226.
17. Nucci LB, Schmidt MI, Duncan BB, Fuchs SC, Fleck ET, Britto MMS. Nutritional status of pregnant women: prevalence and associated pregnancy outcomes. *Rev Saúde Pública.* 2001;35(6):502-7.
18. O'Brien TE, Ray JG, Chan WS. Maternal body mass index and the risk of: a systematic overview. *Epidemiology.* 2003;14(3):368-74.
19. Pipkin FB. Risk factors for preeclampsia. *N Engl J Med.* 2001;12(344):925-6.
20. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. Summary of the NHLBI working group on research on hypertension during pregnancy. *Hypertension.* 2003;41(3):437-45.
21. Schmidt MI, Duncan BB, Reichelt AJ, Branchtein L, Matos MC, Costa e Forti A, et al; Brazilian Gestational Diabetes Study Group. Gestational diabetes mellitus diagnosed with a 2-5h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care.* 2001;24(7):1151-55.
22. Sibai BM, Dekker G, Kupfermanc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005; 365(9461): 785-99.

23. Sibai BM, Hauth J, Caritis S, Lindheimer MD, MacPherson C, Klebanoff M, et al. Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(4):938-42.
24. Sibai BM. Risk factors, pregnancy complications, and prevention of hypertensive disorders in women with pregravid diabetes mellitus. *J Mater Fetal Med.* 2000;9(1):62-5.
25. Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC. Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(1):254-58.

Table 1 – The studied risk factors for hypertensive disorders in pregnancy

Characteristic	Hypertensive disorders n = 161	Control n = 169	p
Family history of PE	41%	18%	0.004
Previous PE history	57%	7%	<0.001
Multifetal gestation	6%	3%	0.53
BMI*	31.4±3.9	27.9±4.6	<0.001
Nulliparity	27%	22%	0.30
Diabetes	26%	6%	<0.001
Chronic hypertension	31%	5%	<0.001
Extremes of maternal age**	41%	33%	0.15
Smoking habit	19%	24%	0.39
Schooling	34%	55%	0.03
Prenatal	97%	89%	0.05

Data are presented as mean ± SD or %.

* Overweight, defined by BMI > Kg/m² and obesity, defined by BMI > 30 Kg/m², after adjustment for age.

** (<18 yo or >35 yo)

Table 2 - Characteristics of women with hypertensive disorders in pregnancy compared to normotensive women (univariate analysis)

Characteristic	Odds ratio (95%CI)	P
Family history of PE	1.62 (1.07-2.47)	0.02
Previous PE history	1.16 (1.07-1.25)	<0.001
Multifetal gestation	1.67 (0.54-5.32)	0.37
BMI*	1.19 (1.12-1.27)	<0.001
Nulliparity	1.35 (0.81-2.25)	0.25
Diabetes	5.55 (2.39-12.89)	<0.001
Chronic hypertension	8.17(3.69-18.06)	<0.001
Extremes of maternal age**	1.49 (0.91-2.44)	0.12
Smoking habit	0.76 (0.44-1.31)	0.32
Schooling	0.43 (0.21-0.87)	0.02
Prenatal	0.25 (0.09-.070)	0.008

* Overweight, defined by BMI > Kg/m² and obesity, defined by BMI > 30 Kg/m², after adjustment for age.

** (<18 yo or >35 yo)

Table 3 - Characteristics of women with hypertensive disorders in pregnancy compared to normotensive women (multivariate analysis)

Characteristic	Odds ratio (95%CI)	p
Family history of PE	7.05 (1.99-24.92)	0.02
Diabetes	3.87 (1.22 –12.27)	<0.001
Chronic hypertension	1.70 (0.54-5.31)	0.02

CAPÍTULO IV

**“RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISMS
IN THROMBOPHILIC GENES AND
PREECLAMPSIA IN A BRAZILIAN
POPULATION”**

**Manuscrito aceito para publicação no periódico
Blood Cells, Molecules, and Diseases (2006)**

Relationship between polymorphisms in thrombophilic genes and preeclampsia in a Brazilian population

C.A. Dalmáz^{a,b}, K.G. Santos^a, M.R. Botton^a, C.L. Tedoldi^c, I. Roisenberg^{a*}

^aDepartamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^bCentro Universitário La Salle, Canoas, RS, Brasil

^cHospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil

* Corresponding author: Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, 91.501-970 Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: + 55 51 3316 6728; fax + 55 51 3316 7311; e-mail addresses: israberg@ufrgs.br (I. Roisenberg), carolabrao@yahoo.com.br (C.A. Dalmáz).

Relationship between polymorphisms in thrombophilic genes and preeclampsia in a Brazilian population

The purpose of this study was to evaluate the thrombophilic genes in pregnant women with and without preeclampsia independently or in combination. In a prospective case-control study we investigated four polymorphisms in thrombophilic genes in 75 women with mild or severe preeclampsia and 145 women with normal pregnancy. The genotype frequencies were assessed and the odds ratio (OR) calculated. When we analyzed the polymorphisms independently and the development of preeclampsia no association was observed [methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677TT genotype, OR 2.07, 95% confidence interval (CI) 0.99-4.30; prothrombin mutation (F II) (GA or AA genotypes) OR 8.11, 95% CI 0.89-73.92; factor V Leiden (FV Leiden) OR 3.94, 95% CI 0.35-44.23; plasminogen activator inhibitor (PAI-1) 4G/4G genotype, OR 1.63, 95% CI 0.87-3.05] not even with severe preeclampsia subgroup analysis. However, when we investigated a possible interaction among these polymorphisms on the development of the preeclampsia, the OR for having one risk genotype, one or two genotype risk factors and two genotype risk factors compared to those without genotype risk factors were 1.97 (95% CI 1.08-3.59), 2.21 (95% CI 1.25-3.92) and 4.27 (95% CI 1.3-13.9), respectively. In conclusion, in the population analyzed, the presence of the genotype risk factors alone does not seem to be associated with the development of preeclampsia even in the severe presentation form. Nevertheless, a possible interaction among the MTHFR, F II, FV and PAI-1 gene polymorphisms on the development of the preeclampsia was suggested.

Keywords: methylenetetrahydrofolate reductase, prothrombin, factor V Leiden, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), preeclampsia.

Introduction

Preeclampsia, a pregnancy-specific syndrome clinically defined as elevated blood pressure and proteinuria, remains an important cause of maternal and fetal morbidity and mortality despite a intensive research [1,2].

Pregnancy itself represents a risk factor for a hypercoagulable state associated with acquired changes in hemostatic factors [3], and a condition of hypercoagulation has been described as a major factor in the pathogenesis of some obstetric pathologies, including preeclampsia. The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, the G20210A mutation of prothrombin gene (F II), the G1691A mutation of factor V (FV Leiden) and an insertion/deletion polymorphism (4G/5G) in the promoter of the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) gene, have been proposed as possible risk factors for preeclampsia [4-6]. The genetic factors related to the thrombophilias above mentioned appear to have different prevalences in the general population and several studies are contradictory or failed to confirm a significant association with preeclampsia underlying significant differences mainly in the ethnic background of studied patients [3-6].

Furthermore, combinations of several thrombophilic polymorphisms confer a higher risk of thrombosis when compared to the carriage of a single polymorphism. These synergic effects might further increase the risk of preeclampsia, but most studies have evaluated only one or two prothrombotic polymorphisms [4].

Therefore, the aim of this study was to investigate the existence of an association of the homozygosity for C677T polymorphism of the MTHFR gene, expressed as the TT genotype, the F II 20210A allele, FV Leiden and the polymorphism 4G/5G in the PAI-1

gene, expressed as the 4G/4G genotype, with preeclampsia in a group of women from Southern Brazil independently or in combination.

Materials and methods

Preeclampsia population

The subjects were recruited in the reference Maternity of a tertiary public hospital in Southern Brazil (Hospital Nossa Senhora Conceição) and we identified 75 cases of preeclampsia in the High Risk Obstetrical Cardiology Clinic according to the criteria proposed by American College of Obstetricians and Gynecologists [7]. Preeclampsia was defined as the presence of hypertension associated with proteinuria after the 20th week of gestation in women known to be normotensive beforehand. Hypertension was defined as a blood pressure of at least 140 mmHg (systolic) and / or 90 mmHg (diastolic) on two occasions of up to 4-6 h apart. The blood pressure was measured on the right arm, and with the patient always in the seated position. Proteinuria was defined as urinary excretion of 300 mg or more of protein in 24 h. The preeclampsia was classified as severe when there was a blood pressure $\geq 160/110$ mmHg; or urinary protein excretion ≥ 5 g per 24h; a platelet count of $<100\ 000\text{mm}^{-3}$ in at least two samples; the combination of haemolysis, abnormal liver enzymes associated with persistent epigastric or upper right quadrant pain; persistent and severe symptoms as altered mental status, headaches, blurred vision or blindness; presence of multiorgan involvement such as pulmonary edema, oliguria ($<500\text{mL}$ per day) according to previously published classifications [7]. The body mass index (BMI) was calculated considering the values of weight and height obtained at the first appointment.

Control group

The 145 control subjects with uncomplicated pregnancies among in and out patients of the same hospital were enrolled during the same period of the study and the inclusion criteria of the controls were: no rise in blood pressure, no hypertension or proteinuria, similar age (± 2 years), no biological relationship, and a delivery date as close as possible to the delivery date(s) of the patient group and with a follow up for at least three months after delivery.

All women who had chronic hypertension, renal disease, diabetes, collagen vascular diseases, cancer or thrombosis were not included in the study.

All subjects participating in this study gave their written informed consent, and the protocol was approved by the ethics committee of the Grupo Hospitalar Conceição and by the National Research Committee of Ethics.

Genotype determination

DNA was isolated from whole blood using a non-enzymatic technique [8]. DNA samples were genotyped by PCR using specific primers and conditions as those previously described for the C677T polymorphism in the MTHFR gene [9], the G20210A polymorphism in the F II gene [10], the G1691A polymorphism in the factor V gene [11], and the 4G/5G polymorphism in the PAI-1 gene [12]. As previously reported, the PCR products were subjected to digestion with the restriction enzymes HinfI for the polymorphism in the MTHFR gene [9] and HindIII for polymorphisms in the F II [10], and

FV genes [11]. The digested fragments were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis containing ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light. For the PAI-1 polymorphism, the products of PCR were directly subjected to agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light.

Statistical analysis

Student *t* test was employed for comparison of the quantitative variables between the groups. Differences in proportions were tested by Fisher's exact test or χ^2 test. Relative risks were estimated by the odds ratio and P – values of < 0.05 were considered to be significant. All confidence intervals were calculated at the 95% level and all statistical analyses were performed with SPSS software (version 10.0).

Results

Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of the cases and the controls. As expected, the mean gestational age at delivery was lower in cases than in controls, and the family history of preeclampsia was more frequent in patients. Obesity, defined by BMI > 30 Kg/m² after adjustment for age, was prevalent in both groups being even more frequent in preeclamptic women. There were no significant differences in the parity and the smoking habits between patients and controls.

Risk association with preeclampsia using a case-control design

Table 2 shows the frequency of thrombophilia genotypes and alleles in women with preeclampsia and controls. When the analysis for the FV Leiden and F II mutations was restricted to Caucasian group (excluding African-Brazilian women), the results were not significant (FV Leiden $p = 0.66$ and F II $p = 0.05$).

The observed genotype distribution was in agreement with the Hardy-Weinberg proportion for almost cases and controls in all polymorphisms, except the G20210A mutation in the F II gene (patients and controls), the 4G/5G polymorphism in the PAI-1 gene and the C677T polymorphism in the MTHFR gene (patients group).

The cases had a marginally significant higher genotype and allele frequencies when they were compared to the controls for the F II and MTHFR gene polymorphisms. However, the relative risks estimated by the odds ratio did not confirm the relationship between these polymorphisms and the occurrence of preeclampsia.

Risk association with severe preeclampsia using a case-control design

There were no significant differences in the prevalence of the MTHFR C677T, the G20210A prothrombin gene mutation, FV Leiden, and the PAI-1 4G/5G polymorphisms (in any genotype combination) among women with severe preeclampsia compared to control women (MTHFR 677TT genotype, OR 1.45, 95% CI 0.56,3.76; F II mutation (GA or AA genotypes) OR 0.37, 95% CI 0.11,1.24; FV Leiden OR 7.39, 95% CI 0.65,83.58; PAI-1 4G/4G genotype, OR 1.27, 95% CI 0.57,2.82). Furthermore, when we compared severe preeclampsia (n=41) with mild preeclampsia (n=34) no association was observed with the four genetic systems (data not shown).

Risk association of the interaction among the polymorphisms with preeclampsia

When we investigated a possible interaction among these polymorphisms on the development of the preeclampsia, the OR for having one risk genotype, one or two genotype risk factors and two genotype risk factors compared to those without genotype risk factors were 1.97 (95% CI 1.08-3.59), 2.21 (95% CI 1.25-3.92) and 4.27 (95% CI 1.3-13.9), respectively.

Discussion

It has been suggested that several functional genes in the coagulation system contribute to an increased risk of thrombotic events that may eventually result in preeclampsia. A number of case-control studies of affected and unaffected mothers indicate such associations [4], but this relationship is still conflicting [4-6,13,14].

Our findings showed that in this Brazilian population, there was no significant association between preeclampsia and the MTHFR, F II, FV Leiden and PAI-1 polymorphisms; when the genotype and the allele frequencies were isolated compared between cases and controls.

The discrepant results observed in different studies could be due to the differences in the genetic background of the populations. The prevalence of F II 20210A, FV Leiden and T allele in the MTHFR gene is extremely variable in various Mexicans, European, American and Asian populations [13,15-17]. Therefore, those discrepant results may be related to the different genetic backgrounds of the study subjects.

In addition, the frequency of the PAI-1 4G allele in our control group is similar to that has previously been described in European and American populations [18-22]. In contrast to our data, a marginally higher frequency of the 4G allele has been found in some studies [21,22]. It may be partly explained by differences in the study population since Yamada and colleagues [21] included women with a history of thrombosis and women with chronic hypertension.

Moreover, besides the different populations studied, the definition of preeclampsia, the selection of controls and the inclusion criteria varied among the studies. We included almost two controls for each case, matched by age and ethnicity, and the differences in the frequency of polymorphisms between the groups did not reach statistical significance.

An interesting point in our study is that the synergic association of more than one polymorphism and preeclampsia was suggested and an exaggerated effect of the disorder on the haemostatic system can be hypothesized. Moreover, considering that preeclampsia is a multifactor disease and in an attempt to build a polygenetic model of preeclampsia, the combined defects are important to be identified. It is worthwhile to note that the association between preeclampsia and thrombophilias, including MTHFR, F II and FV Leiden polymorphisms by combined defects, was described as established risk association [3]. However, these results were not observed in another report [23].

In conclusion, in the population analyzed, the studied thrombophilic genes do not seem to be associated with the development of preeclampsia even in the severe presentation form. Nevertheless, a possible interaction among the MTHFR, F II, FV and PAI-1 gene polymorphisms on the development of the preeclampsia was suggested.

Acknowledgements

We are grateful to the patients and the individuals for participating in the study and we thank Nurse Katia Gerloff, from Nossa Senhora Conceição Hospital.

References

- [1] M. Geary, The HELLP syndrome, *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 104 (1997) 887-891.
- [2] J.M. Roberts, C.W. Redman, Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension, *Lancet* 341 (1993) 1447-1451.
- [3] M.J. Kupferminc, Thrombophilia and preeclampsia: the evidence so far, *Clin. Obstet. Gynecol.* 48 (2005) 406-415.
- [4] E.R. Morrison, A.Z. Miedzybrodzka, D.M. Campbell, et al; Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: Results from a large population – based study and systematic review, *Thromb. Haemost.* 87 (2002) 779-785.
- [5] J.L. Kujovich, Thrombophilia and pregnancy complications, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 191 (2004) 412-424.
- [6] L. Robertson, O. Wu, P. Langhorne, et al; Thrombophilia in pregnancy: a systematic review, *Br. J. Haematol.* 132 (2006) 171-196.
- [7] American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia, *ACOG Practic Bull* 33 (2002) 1-14.
- [8] D.K. Lahiri, Jr JI Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444.
- [9] P. Frosst, H.J. Blom, R. Milos, et al; A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, *Nat. Genet.* 10 (1995) 111-113.

- [10] S.R. Poort, F.R. Rosendaal, P.H. Reitsma, R.M. Bertina, A common genetic variation in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis, *Blood* 88 (1996) 3698–3703.
- [11] R.M. Bertina, B.P.C. Koeleman, T. Koster, et al; Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C, *Nature* 369 (1994) 64–67.
- [12] M.W. Mansfield, M.H. Stickland, P.J. Grant, Environmental and genetic factors in relation to elevated circulating levels of plasminogen activator inhibitor type 1 in Caucasian patients with Non-insulin-Dependent Diabetes Melitus, *Thromb. Haemost.* 74 (1995) 842-847.
- [13] I.P. Dávalos, M.C. Moran, E. Martínez-Abundis, et al; Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood Cells, Mol. Dis.* 35 (2005) 66-69.
- [14] I. Pabinger, R. Vormittag, Thrombophilia and pregnancy outcomes, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 1603-1610.
- [15] E. Grandone, M. Margaglione, D. Calaizzo, et al; Prothrombotic genetic risk factors and the occurrence of gestational hypertension with or without proteinuria. *Thromb. Haemost.* 81 (1999) 349-352.
- [16] D.C. Rees, M. Cox, J.B. Clegg, World distribution of factor V Leiden, *Lancet* 6 (1995) 74-79.
- [17] S.S. Kang, J. Zhou, P.W.K. Wong, et al; Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary disease, *Am. J. Hum. Genet.* 48 (1991) 536-545.

- [18] C.J. Doggen, R.M. Bertina, V.M. Cats, et al; The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction, *Thromb. Haemost.* 82 (1999) 115-120.
- [19] R. Segui, A. Estelles, Y. Mira, et al; PAI-1 promoter 4G/5G genotype as an additional risk factor for venous thrombosis in subjects with genetic thrombophilic defects, *Br. J. Haematol.* 111 (2000) 122-128.
- [20] M.P.M. de Maat, M.W.J.C. Jansen, E.T.M. Hille, et al; Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes, *J. Thromb. Haemost.* 2 (2004) 1588-1593.
- [21] N. Yamada, T. Arinami, K.Y. Kobayashi, et al; The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor -1 gene is associated with severe preeclampsia, *J. Hum. Genet.* 45 (2000) 138-141.
- [22] D. Fabbro D, A.V. D'Elia, R. Spizzo, et al; Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphisms and preeclampsia, *Gynecol. Obstet. Invest.* 56 (2003) 17-22.
- [23] Y.J. Kim, R.A. Williamson, J.C. Murray, et al; Genetic susceptibility to preeclampsia: roles of cytosine-to-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-basepair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathione β -synthase, and factor V Leiden mutation, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 184 (2001) 1211-1217.

Table 1

Demographic and clinical characteristics of patients with preeclampsia and the control group

	Preeclampsia group n = 75	Control n = 145	P Value
Maternal age at delivery (years)	27.8±7.5	27.3±7.2	0.68
Ethnicity (Caucasians)	68.0%	74.5%	0.18
Gestational age at delivery (weeks)	35.6±3.4	38.3±3.4	<0.001
Family history of PE	37.7%	20.8%	0.03
BMI (Kg/m ²)	31.4±3.9	27.9±4.6	<0.001
Smoking	18.6%	23.9%	0.48
Parity	2.4±1.7	2.8±1.8	0.18

Data are presented as mean ± SD or %.

Table 2

Frequency of thrombophilia genotypes and alleles in women with preeclampsia and controls

Genotype/ Allele	Preeclamptic group n=75	Controls n=145	P	Odds ratio (95% CI) ^a
MTHFR (%)			0.104	2.07 (0.99-4.30)
CC	31 (41.3%)	76 (52.4%)		
CT	27 (36.0%)	51 (35.2%)		
TT	17 (22.7%)	18 (12.4%)		
C	0.594	0.70	0.032	
T	0.406	0.30		
F II (%)				8.11 (0.89 – 73.92)
GG	71 (94.7%)	144 (99.3%)	0.047	
GA	3 (4.0%)	1 (0.7%)		
AA	1 (1.3%)	---		
G	0.97	0.997	0.019	
A	0.03	0.003		
FV Leiden (%)				3.94 (0.35 – 44.23)
GG	73 (97.3%)	144 (99.3%)		
GA	2 (2.7%)	1 (0.7%)	0.268	
AA	---	---		
G	0.987	0.997	0.269	
A	0.013	0.003		

PAI-1 ^b				1.63 (0.87-3.05)
4G/4G	24 (32.0%)	32 (22.4%)	0.242	
4G/5G	26 (34.7%)	63 (44.0%)		
5G/5G	25 (33.3%)	48 (33.6%)		
4G	0.49	0.44	0.379	
5G	0.51	0.56		

MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; F II, prothrombin; FVL, Factor V Leiden and PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1 polymorphisms.

^a Odds ratio (95% CI) for high-risk allele. The genotype risk factors are in the bold type.

^b Data missing from two controls who could not be unambiguously genotyped.

Table 3

Analysis of the interaction among the polymorphisms with preeclampsia

Genotype combinations	Preeclampsia group n=75	Controls n=143 ^a	P	Odds ratio (95% CI) ^b
With one risk genotype ^c	31 (41.3%)	42 (29.4%)	0.027	1.97 (1.08-3.59)
With one or two risk genotypes ^{c,d}	39 (52.0%)	47 (32.9%)	0.006	2.21 (1.25-3.92)
With two risk genotypes ^d	8 (10.7%)	5 (3.5%)	0.016	4.27 (1.31-13.90)
Without any risk genotype (s)	36 (48.0%)	96 (67.1%)		

^a Data missing from two controls who could not be unambiguously genotyped for PAI-1 polymorphism.

^b OR for each comparison with subjects without genotype risk factors as the reference group.

^c MTHFR (TT) or F II (GA or AA) or FV Leiden or PAI-1 (4G/4G).

^d MTHFR (TT) + PAI-1 (4G/4G), F II (GA or AA) + PAI-1 (4G/4G), FV Leiden + PAI-1 (4G/4G).

CAPÍTULO V

“Genotypes and Haplotypes of Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (Glu298Asp, intron-4, and -786T/C) and Risk of Preeclampsia in a Brazilian population“

**Manuscrito a ser submetido ao periódico Acta
Obstetrícia et Gynecologica Scandinavica**

Genotypes and haplotypes of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (Glu298Asp, intron-4, and -786T→C) and risk of preeclampsia in a Brazilian population

Caroline A. Dalmáz^{1,2}, Mariana R. Botton¹, Kátia G. dos Santos¹, Citânia L. Tedoldi³
and Israel Roisenberg¹

¹From the Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and ²Centro Universitário La Salle, Canoas, RS, Brazil, and the ³Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Israel Roisenberg

Departamento de Genética

Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Caixa Postal 15053

91.501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

FAX n° + 55 51 3316 7311

Phone n° + 55 51 3316 6728

e-mail: israberg@ufrgs.br

This first Brazilian prospective study tested the association between the polymorphisms Glu298Asp, intron-4 and -786T→C in the endothelial nitric oxide synthase gene and preeclampsia because different populations could explain the controversial results published worldwide.

Abbreviations:

NO: Nitric oxide; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; OR: odds ratio; CI: confidence interval

Genotypes and haplotypes of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (Glu298Asp, intron-4, and -786T→C) and risk of preeclampsia in a Brazilian population

Background. Preeclampsia, a common serious complication of pregnancy, is characterized by vasoconstriction, dysfunction of the vascular endothelium, and hypertension. Unidentified genetic factors and impaired nitric oxide (NO)-mediated vasodilation are thought to contribute to development of the syndrome. The Glu298Asp, intron-4 and -786T→C polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene have been studied as possible markers to the development of this complication. In the present study we investigated these polymorphisms in the development of preeclampsia in a Brazilian population.

Methods. In a prospective case-control study we investigated the Glu298Asp, intron-4 and -786T→C polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene in 75 women with mild or severe preeclampsia and 145 women with normal pregnancy. The genotype frequencies were assessed, the odds ratio (OR) calculated and the haplotype frequencies were estimated.

Results. The genotype distribution was significantly different between preeclamptic and normotensive women for the Glu298Asp polymorphism in Caucasians (Asp/Asp versus Glu/Glu + Glu/Asp: OR=2.65; 95% CI: 1.045-6.69; $p=0.040$) but it was not different in African-Brazilians ($p>0.05$). The genotype frequencies for the intron-4 and -786T→C polymorphisms did not differ in Caucasians and African-Brazilians ($p>0.05$). The estimated haplotype frequencies considering the eNOS Glu298Asp, the intron-4, and the -786T→C polymorphisms were different between women with preeclampsia and

control women in African-Brazilians ($p < 0.001$). The Asp298-786T-4b haplotype was more frequent in cases than in controls. The analysis with the Caucasian group did not demonstrate significant differences ($p = 0.138$).

Conclusions. In the population analyzed, a possible association between the Glu298Asp polymorphism on the development of the preeclampsia in the Caucasian group was suggested. It was also indicated that the Asp298-786T-4b haplotype may be related to occurrence of preeclampsia in African-Brazilian women.

Key words: endothelial nitric oxide synthase; preeclampsia; Glu298Asp, intron-4 and -786T→C polymorphisms

Introduction

Preeclampsia is characterized by high blood pressure associated with proteinuria that usually develops after the 20th gestational week, in the otherwise previously normotensive women (1) and it remains an important cause of maternal and fetal morbidity and mortality worldwide (2). Although the pathophysiology of preeclampsia remains unclear, genetic factors and impairment of nitric oxide (NO)-mediated vasodilation appear to play important roles in the development of this condition (3-5).

It is unlikely that a single gene causes preeclampsia. Several maternal genetic variations, in conjunction with environmental factors and paternal component, may predispose to the development of the disease. The endothelial-derived NO, involved in vascular dilation and reduced vascular reactivity, is synthesized from L-arginine by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (6, 7). Nitric oxide regulates blood pressure, platelet aggregation, myometrial quiescence during pregnancy and parturition, and may be involved in the pathogenesis of preeclampsia (8). The eNOS gene is located at chromosome 7q35-36 and has several polymorphisms, some of which have been related to the variation in the NO plasma levels (9, 10).

A single nucleotide polymorphism in exon 7 (G894T), which leads to an amino acid substitution (Glu298Asp), and a variable number of tandem repeats in intron-4 have been evaluated in preeclampsia (11-15). Other expressive eNOS gene polymorphisms consist of three mutations: -786T→C, -922A→G e 1468T→A, better represented by the first one, whereas the others are not expressive at functional analysis.

The role of eNOS as a candidate gene for the development of preeclampsia has been investigated in several studies; however, the results have been inconsistent (11,12,15,17-19). Furthermore, it is not clear whether genotypic risks reported for Glu298Asp, intron-4

and -786T→C polymorphisms are independent or reflect carriage of common risk haplotypes.

In this study, the relation between the polymorphisms Glu298Asp, intron-4 and -786T→C in the endothelial nitric oxide synthase gene and preeclampsia was investigated in a Brazilian population, independently or in haplotype combination.

Materials and Methods

Patients and Controls

The subjects were recruited in the reference Maternity of a tertiary public hospital in Southern Brazil (Hospital Nossa Senhora Conceição) and we identified 75 cases of preeclampsia in the High Risk Obstetrical Cardiology Clinic according to the criteria proposed by American College of Obstetricians and Gynecologists (20). Preeclampsia was defined as the presence of hypertension associated with proteinuria after the 20th week of gestation in women known to be normotensive beforehand. Hypertension was defined as a blood pressure of $\geq 140/90$ mmHg (diastolic) on two occasions of up to 4-6 h apart. The blood pressure was measured on the right arm, and with the patient always in the seated position. Proteinuria was defined as urinary excretion of 300 mg or more of protein in 24 h. The preeclampsia was classified as severe when there was a blood pressure $\geq 160/110$ mmHg; or urinary protein excretion ≥ 5 g per 24h; a platelet count of $<100\ 000\text{mm}^{-3}$ in at least two samples; the combination of hemolysis, abnormal liver enzymes associated with persistent epigastric or upper right quadrant pain; persistent and severe symptoms as altered mental status, headaches, blurred vision or blindness; presence of multiorgan involvement such as pulmonary edema and oliguria ($<500\text{mL}$ per day) according to

previously published classifications (20). Body mass index (BMI) was calculated considering the values of weight and height obtained at the first appointment.

The 145 control subjects with uncomplicated pregnancies among in and out patients of the same hospital were enrolled during the same period of the study and the inclusion criteria of the controls were: no rise in blood pressure, no hypertension or proteinuria, similar age (± 2 years), no biological relationship, and a delivery date as close as possible to the delivery date(s) of the patient group and with a follow up for at least three months after delivery.

All women who had chronic hypertension, renal disease, diabetes, collagen vascular diseases, cancer or thrombosis were not included in the study.

All subjects participating in this study gave their written informed consent, and the protocol was approved by the ethics committee of Grupo Hospitalar Conceição and by the National Research Committee of Ethics.

Blood sampling and Test procedures

DNA was isolated from whole blood using a non-enzymatic technique (23). DNA samples were genotyped by PCR using specific primers and conditions as those previously described for the Glu298Asp (11), the intron-4 (10) and the -786T→C polymorphisms in the eNOS gene (16). As previously reported, the PCR products were subjected to digestion with the restriction enzymes *BanII* for the Glu298Asp polymorphism (11) and *MspI* for -786T→C polymorphism in the eNOS gene (16). The digested fragments were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis containing ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light.

Statistical methods

Because the polymorphisms above mentioned have shown different prevalences in the general population from diverse ethnic groups (21,22), we analyzed the Caucasian group separated from the African-Brazilian group.

Student *t* test was employed for comparison of the quantitative variables between groups. Differences in proportions were tested by Fisher's exact test or χ^2 test. Relative risks were estimated by the odds ratio and P – values of < 0.05 were considered to be significant. All confidence intervals were calculated at the 95% level and all statistical analyses were performed with SPSS software (version 10.0). Haplotypes were estimated using the Arlequin software (version 2.001).

Results

Study patients

Table I shows the demographic and clinical characteristics of the cases and the controls. As expected, the mean gestational age at delivery was lower in cases than in

controls, and the family history of preeclampsia was more frequent in patients. Obesity, defined by BMI > 30 Kg/m² after adjustment for age, was prevalent in both groups being even more frequent in preeclamptic women. There were no significant differences in the parity and the smoking habits between patients and controls.

Risk association with preeclampsia using a case-control design

Table II shows the genotype and allele frequencies for eNOS polymorphisms evaluated in the study according to ethnic background. In addition, Table III estimates the effects of the eNOS polymorphisms on preeclampsia risk modeled with logistic regression. The genotype distributions were significantly different between preeclamptic and normotensive women for the Glu298Asp in Caucasians in a recessive model, but they were not different for the intron-4 and -786T→C polymorphisms in a dominant model (Caucasians and African-Brazilians).

The observed genotype distribution was in agreement with the Hardy-Weinberg proportion for almost all cases and controls for all polymorphisms, except the Glu298Asp and -786T→C in the African-Brazilian controls.

Risk association with severe preeclampsia using a case-control design

There were no significant differences in the prevalence of the eNOS Glu298Asp, the intron-4, and the -786T→C polymorphisms (in any genotype combination) among women with severe preeclampsia (in the Caucasian and African-Brazilian women) compared to controls (P >0.05 for all comparisons).

Risk association with preeclampsia using a haplotype design

The estimated haplotype frequencies considering the eNOS Glu298Asp, the intron-4, and the -786T→C polymorphisms were different between women with preeclampsia and control women in African-Brazilians ($P < 0.001$). The Asp298-786T-4b haplotype was more frequent in cases than in controls. The analysis with the Caucasian group did not demonstrate significant differences ($P = 0.138$). Table IV show the frequencies of the eNOS haplotypes and risk of preeclampsia.

Discussion

It is described that in a normal pregnancy, NO metabolic route is activated, leading to an increased NO efficacy (24). It is believed that this increase is because of maternal vasodilatation necessary to accommodate the increased circulating volume during gestation without an elevation in blood pressure. In preeclampsia, this adaptation mechanism fails, endothelial dysfunction occurs, blood pressure elevates and proteinuria develops (25). Moreover, maternal endothelial dysfunction persists after an episode of preeclampsia (24). This is of interest because endothelial dysfunction is a key feature of a number of cardiovascular disorders, with women who experienced preeclampsia exhibiting an up to 2-fold excess risk of cardiovascular disease in later life (26).

In our study we investigated the possible relationship between the Glu298Asp, intron-4 and -786T→C eNOS gene polymorphisms and preeclampsia independently and in haplotype analysis.

Our finding regarding the Glu298Asp eNOS polymorphism is consistent with previous findings in the Colombian (27) and Japanese populations (11,12). In the Japanese population severe preeclampsia susceptibility was linked to the eNOS gene (11), directing the study of this candidate gene in our patients. It has also been shown that eNOS

Glu298Asp polymorphism is associated with differences in endothelium dependent dilation early in pregnancy (25). Moreover, Hillermann et al. (28) suggested that the presence of the 298Asp eNOS variant may predispose a preeclamptic woman to develop abruptio placentae or that it is a marker for predisposition to develop this complication. However, Landau et al. (29), Kim et al. (30), Tempfer et al. (31) and Yoshimura et al. (32), in the American, Korean, Austrian and Bangladeshi populations, respectively, did not find this association when they investigated this relation to preeclampsia or severe preeclampsia. Contrasting results were obtained in affected women from Eastern Finland in whom the Asp allele was less common (13), having a protective role against the development of preeclampsia.

Regarding the results we found for the intron-4 eNOS gene polymorphism is in agreement to findings of Zhou et al. (33), Serrano et al. (27), and Grandone et al. (34), but they are not in accordance to findings of Bashford et al. (14) and Tempfer et al. (15). As far as we know, only two studies investigated the relationship between the $-786T \rightarrow C$ polymorphism and preeclampsia and our finding is consistent with this previous studies (27,34). In other words, no association was found.

The different results may differ for several reasons: there may exist ethnic differences in the phenotypic expression of the eNOS polymorphisms, so the carrier of the aspartate variant will likely develop more hypertensive symptoms than non carriers. The ethnicity, socioeconomic status, differences in the incidence, the manifestations and the classification of preeclampsia are different in these studies (11-15,27,34). Therefore, those discrepant results may be related to the different genetic backgrounds of the studied subjects. Moreover, the selection of controls and the inclusion criteria varied among the studies.

Up to date, just one study analyzed simultaneously the possible association of these three polymorphisms with the development of preeclampsia. They found that the Asp298-786C-4b haplotype was considered as a marker of risk to preeclampsia in the Colombian population (27). In our study, we found that the Asp298-786T-4b haplotype can be a risk factor for preeclampsia in African-Brazilians.

One important limitation of the current study relates to the ethnic mixture of the population studied (Caucasians and African-Brazilians). This raises the issue of whether the positive association observed with eNOS reflects a confounding by ethnicity attributable to the population stratification (35). We carefully matched the patients and the controls by age and ethnicity and we analyzed Caucasian and African- Brazilians separately (we included almost two controls for each case). Again, it is possible that marked differences in results may be due to the heterogeneity of the preeclampsia syndrome and the differences in definitions among the studies. The adoption of clear definitions of phenotype and inclusion criteria will facilitate the development of meta-analysis of diverse studies. It is conceivable that ethnicity may also be accountable for diverse results.

In conclusion, in the population analyzed, a possible association between the Glu298Asp polymorphism on the development of the preeclampsia in the Caucasian group was suggested. It was also indicated that the Asp298-786T-4b haplotype may be related to occurrence of preeclampsia in African-Brazilian women.

Acknowledgments

We are grateful to the patients and the individuals for participating in the study, and we thank to Nurse Katia Gerloff, from Nossa Senhora Conceição Hospital.

References

1. Gifford RW, August PA, Cunningham G, Grenn LA, Lindheimer MD, Mcnellis D. Report of the National High Blood Pressure Education Program Workin Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: S1-S22.
2. Roberts JM, Redman CW. Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1993; 341: 1447-51.
3. Salonen Ros H, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S. Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet* 2000; 91: 256-60.
4. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 25-42.
5. Pipkin FB. Risk factors for preeclampsia. *N Engl J Med* 2001; 12: 925-6.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-76.
7. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-69.
8. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 161:1200-04.
9. Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Wang J, Blangero J et al. Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3147-53.

10. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 190-3.
11. 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: 238-41.
12. Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E, Ebina Y, Fugimoto S. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet.* 2001; 103: 241-44.
13. Hakli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in pre-eclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10: 154-57.
14. Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW, Roa BB, Gregg AR. Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184: 1345-50.
15. Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, Gregg AR. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2001; 20: 107-18.
16. Ordóñez AJ, Carreira JM, Franco AG, Sánchez LM, Alvarez MV, García EC. Two expressive polymorphisms on the endothelial nitric oxide synthase gene (intron-4, 27 bp repeat and -786 T/C) and the venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2000; 99: 563-66.

17. Lade JA, Moses EK, Guo G, Wilton AN, Grehan M, Cooper DW et al. The eNOS gene: a candidate for the preeclampsia susceptibility locus? *Hypertens Pregnancy* 1999; 18: 81-93.
18. Arngrimsson R, Hayward C, Nadaud S, Baldursdottir A, Walker JJ, Liston WA et al. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 354-62.
19. Lewis I, Lachmeijer G, Downing S, Dekker G, Glazebrook C, Clayton D et al. Failure to detect linkage of preeclampsia to the region of the NOS3 locus on chromosome 7q. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 310-13.
20. American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia, *ACOG Practic Bull* 2002; 33: 1-14.
21. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 719-25.
22. Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX et al. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide* 2005; 12: 177-82.
23. Lahiri DK & Nurnberger Jr JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 5444.
24. Lopez-Jaramillo P, Narvaez M, Calle A, Rivera J, Jacome P, Ruano C et al. Cyclic guanosine 3',5' monophosphate concentrations in preeclampsia: effects of hydralazine. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 33-8.

25. 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: 1511-17.
26. Smith GC, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet* 2001; 357: 2002-06.
27. Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension* 2004; 44: 702-7.
28. Hillermann B, Carelse K, Gebhardt GS. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet* 2005; 50: 415-9.
29. 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.
30. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK et al. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta* 2006; 27: 438-44.
31. Tempfer CB, Jirecek S, Riener EK, Zeisler H, Denschlag D, Hefler L et al. Polymorphisms of thrombophilic and vasoactive genes and severe preeclampsia: a pilot study. *J Soc Gynecol Investig* 2004; 11: 227-31.
32. 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.
33. Zhou R, Yang Y, Xiong Q, Cao X. Detection of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in preeclampsia. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2003; 34: 671-73.
34. Grandone E, Colaizzo D, Martinelli P, Pavone G, Errico M, Vecchione G et al . Does endothelial nitric oxide synthase gene variation play a role in the occurrence of hypertension in pregnancy? Hypertens Pregnancy 2003; 22: 149-55.
35. Cardon LR, Palmer LJ. Population stratification and spurious allelic association. Lancet 2003; 361: 598-604.

Address for correspondence:

Israel Roisenberg, PhD
Departamento de Genética
Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Caixa Postal 15053
91.501-970 Porto Alegre, RS, Brazil
FAX n° + 55 51 3316 7311
Phone n° + 55 51 3316 6728
e-mail: israberg@ufrgs.br

Table I. Demographic and clinical characteristics of patients with preeclampsia and the control group

	Preeclampsia group n = 75	Control n = 145	p-values
Maternal age at delivery (years)	27.8±7.5	27.3±7.2	0.68
Ethnicity (Caucasians)	68.0%	74.5%	0.18
Gestational age at delivery (weeks)	35.6±3.4	38.3±3.4	<0.001
Family history of PE	37.7%	20.8%	0.03
BMI (Kg/m ²)	31.4±3.9	27.9±4.6	<0.001
Smoking	18.6%	23.9%	0.48
Parity	2.4±1.7	2.8±1.8	0.18

Data are presented as mean ± SD or %.

Table II. Genotype and allele frequencies for eNOS polymorphisms evaluated in the study according to ethnic background

Gene Variant	Ethnic Background					
	All ethnic groups		Caucasian		African-Brazilian	
	Cases (<i>n</i> = 75)	Controls (<i>n</i> = 144)	Cases (<i>n</i> = 53)	Controls (<i>n</i> = 111)	Cases (<i>n</i> = 22)	Controls (<i>n</i> = 33)
Glu298Asp						
Glu/Glu	33 (44.0%)	69 (47.9%)	23 (43.4%)	53 (47.7%)	10 (45.5%)	16 (48.5%)
Glu/Asp	31 (41.3%)	65 (45.1%)	19 (35.8%)	48 (43.2%)	12 (55.5%)	17 (51.5%)
Asp/Asp	11 (14.7%)	10 (7.0%)	11 (20.8%)†	10 (9.1%)†	0 (0%)	0 (0%)
Allele Frequency						
Glu	97 (64.7%)	203 (70.5%)	65 (61.3%)	154 (69.4%)	32 (72.7%)	49 (74.2%)
Asp	53 (35.3%)	85 (29.5%)	41 (38.7%)	68 (30.6%)	12 (27.3%)	17 (25.8%)
Intron-4						
b/b	54* (73.0%)	101* (70.6%)	39* (75.0%)	80* (72.7%)	15 (68.2%)	21 (63.6%)
b/a	19 (25.7%)	41 (28.7%)	12 (23.1%)	29 (26.4%)	7 (31.8%)	12 (36.4%)
b/c	0 (0%)	1 (0.7%)	0 (0%)	1 (0.9%)	0 (0%)	0 (0%)
a/a	1 (1.3%)	0 (0%)	1 (1.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
a/c	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
c/c	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Allele frequency						
A	21 (14.2%)	41 (14.3%)	14 (13.5%)	29 (13.2%)	7 (15.9%)	12 (18.2%)
B	127 (85.8%)	244 (85.3%)	90 (86.5%)	190 (86.4%)	37 (84.1%)	54 (81.8%)

C	0 (0%)	1 (0.4%)	0 (0%)	1 (0.4%)	0 (0%)	0 (0%)
-786T→C						
T/T	34 (45.3%)	63 (43.7%)	22 (41.5%)	47 (42.3%)	12 (54.5%)	16 (48.5%)
T/C	34 (45.3%)	72 (50.0%)	24 (45.3%)	55 (49.6%)	10 (45.5%)	17 (51.5%)
C/C	7 (9.3%)	9 (6.3%)	7 (13.2%)	9 (8.1%)	0 (0%)	0 (0%)
Allele frequency						
T	102 (68.0%)	198 (68.8%)	68 (64.2%)	149 (67.1%)	34 (77.3%)	49 (74.2%)
C	48 (32.0%)	90 (31.2%)	38 (35.8%)	73 (32.9%)	10 (22.7%)	17 (25.8%)

*Data missing from one patient and one control who could not be unambiguously genotyped.

† $p = 0.040$

Table III. Estimate of the effects of the eNOS polymorphisms on preeclampsia risk modeled with logistic regression

Polymorphism	Caucasians	p-values	African-Brazilian	p-values
	OR (95% CI)*		OR (95% CI)*	
Recessive model				
Glu298Asp	2.645 (1.045-6.697)	0.040	—†	
-786T→C	1.725 (0.605-4.915)	0.308	—†	
Dominant model				
Glu298Asp	1.192 (0.617-2.303)	0.601	1.129 (0.383-3.332)	0.826
Intron - 4	0.889 (0.418-1.891)	0.760	0.817 (0.260-2.563)	0.729
-786T→C	1.035 (0.533-2.009)	0.920	0.784 (0.266-2.314)	0.660

*OR: odds ratios; CI: confidence intervals.

† none homoizigote was detected.

Table IV. Frequency of the eNOS haplotypes and risk of preeclampsia

			Caucasian*		African-Brazilian*	
			Frequency	Frequency	Frequency	Frequency
Glu298Asp	Intron-4	-786T→C	in controls (n =218)†	in cases (n =104)†	in controls (n =66)†	in cases (n = 44)†
Glu	b	T	0.497	0.435	0.583	0.408
Glu	a	T	0.045	0.052	0.062	0.092
Glu	b	C	0.076	0.074	—‡	0.160
Glu	a	C	0.076	0.045	0.098	0.067
Asp	b	T	0.128	0.157	0.075	0.273
Asp	b	C	0.166	0.199	0.160	—‡
Asp	a	T	—‡	—‡	0.022	—‡
Asp	a	C	0.012	0.038	—‡	—‡

* $p=0.621$ for Caucasian; $p<0.001$ for African-Brazilian.

† number of haplotypes.

‡ none was detected.

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

A discussão dos aspectos mais específicos do presente trabalho já foi realizada nas discussões dos capítulos III a V. Portanto, no presente capítulo serão discutidos aspectos mais gerais, bem como as perspectivas para a continuidade deste trabalho.

Fatores de risco para os distúrbios hipertensivos da gestação no Sul do Brasil

Os DHG são importantes causas de morte materna e perinatal em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento. A identificação dos fatores de risco ligados aos DHG são muito importantes para que se possa identificar pacientes em maior risco e, em nosso país, poucos estudos abordaram este tema (Gaio *et al.*, 2001; Kahhale e Zugaib, 1995).

Alguns fatores de risco parecem definidos para os DHG, como é o exemplo de história familiar e PE prévia, diabetes, hipertensão crônica pré-existente e primiparidade. Porém, outros como a idade materna nos extremos do período procriativo, tem apresentado resultados contraditórios.

Em nosso estudo, os extremos de idade, considerados entre < 18 e > 35 anos, não foram encontrados associados aos DHG. A gestação tardia está ocorrendo como consequência de uma série de fatores, tais como: a busca pela independência financeira, ao maior tempo de formação requerido pelo mercado de trabalho atual, às separações e às novas uniões, aliados às possibilidades oferecidas pelos métodos anticoncepcionais, além da fertilização assistida, que contribuem para este fenômeno universal (Mathews e Hamilton, 2002; Astolfi e Zonta, 2002). Por outro lado, a falta de perspectivas e a

desinformação das jovens também é uma realidade, principalmente em pacientes de um hospital público, pois todas as participantes do estudo são oriundas de baixo nível social [Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC)].

Estudo multicêntrico norte-americano não encontrou variação na incidência dos DHG nas diversas faixas etárias (Sibai *et al.*, 1997), ao passo que outros estudos apontam maior incidência em gestantes com idade materna avançada (Ziadeh e Yahaya, 2001; Gregory e Korst, 2003). A maior incidência dos DHG na idade avançada foi atribuída pela elevada ocorrência, nesta faixa etária, de hipertensão crônica e diabetes, questionando o papel da idade materna avançada como fator de risco independente para o surgimento dos DHG (van Katwijk e Peeters, 1998). Portanto, esta questão merece maior atenção, sendo necessário maior número de estudos que abordem este tema a fim de esclarecer possíveis vieses.

O nosso estudo mostra alguns dos principais fatores de risco independentes (história familiar, diabetes e hipertensão crônica) para o desenvolvimento dos DHG em nossa população, que deverão ser levados em consideração como marcadores clínicos para a detecção precoce das pacientes com maior risco e, desta maneira, poderá se oferecer medidas que possam reduzir a incidência de DHG ou a severidade dos mesmos. Ainda, há a necessidade de outros estudos epidemiológicos para se investigar outros fatores de risco em nosso meio.

Os polimorfismos e a pré-eclâmpsia:

A investigação dos fatores genéticos associados com doenças humanas frequentes e complexas alcança, atualmente, alta prioridade em pesquisas na área de Genética Humana

e Médica. O presente trabalho procurou identificar variantes genéticas associada à PE na população brasileira, além da prevalência de fatores de risco associados aos DHG. Devido a aspectos fisiopatológicos da PE, elegemos para este estudo genes envolvidos com a trombofilia e o estresse oxidativo, no intuito de verificar possível associação independente e/ou ação sinérgica dos polimorfismos e o desenvolvimento e/ou progressão à PE leve ou grave e procuramos estudar, ainda, polimorfismos de um mesmo gene ou de efeito aditivo.

Polimorfismos pró-trombóticos

Alguns autores e recente metanálise têm sugerido que se há associação dos polimorfismos dos genes ligados às trombofilias, neste trabalho mencionados, e a PE, esta se dá com os casos de pacientes que desenvolvem a forma severa de PE (Morrisson *et al.*, 2002). Entretanto, esta sugestão deve ser cuidadosamente avaliada, pois muitos estudos, conforme já abordamos no Capítulo I:

- ❖ avaliaram apenas um polimorfismo,
- ❖ incluíram diferentes DHG,
- ❖ incluíram múltiplas,
- ❖ apresentaram pequeno número de pacientes,
- ❖ apresentaram diferentes desenhos de estudo e definições de PE,
- ❖ foram desenvolvidos em diferentes populações.

Estas limitações podem auxiliar a explicar os diferentes resultados encontrados (Kupferminc, 2005).

Em nosso estudo, nenhum dos genótipos apresentou ocorrência maior significativa nas gestantes com PE quando analisados isoladamente, entretanto, quando os polimorfismos dos genes ligados às trombofilias foram avaliados em conjunto, observou-se a associação com PE, conforme foi discutido no Capítulo IV.

É interessante observar que conforme o aumento do número de mutações presentes nas mulheres com PE, a razão de chances também aumentou: este fato sugere que estas alterações quando combinadas podem levar a maior risco. Poucos estudos realizaram análise de efeito sinérgico desses polimorfismos: Kim *et al.* (2001b), não encontrou associação dos polimorfismos C677T do gene da MTHFR e FVL, entretanto, dentre os critérios de inclusão dos controles, neste estudo, mulheres com duas ou mais gestações sem PE, foram incluídas, o que em nosso entendimento, pode ter sido viés de seleção. Recente estudo de revisão sobre a análise da associação da PE com trombofilias, sugere que os defeitos combinados são fatores de risco estabelecidos em mulheres com PE severa (Kupferminc, 2005).

Os resultados dos estudos sobre a PE e os polimorfismos aqui analisados são controversos e fatores como os já mencionados, além de estudos com mulheres que já haviam apresentado PE prévia, estudo que avaliou os polimorfismos no feto e na mãe (Livingston *et al.*, 2001) e, também, as diferenças populacionais podem ser as explicações para os diferentes resultados encontrados, conforme relatado nos capítulos IV e V desta tese.

Polimorfismos envolvendo gene do eNOS

No ano 2000, um estudo publicado em um periódico científico de grande impacto demonstrou que o polimorfismo Glu298Asp estava associado aos níveis de eNOS, pois a

proteína com o resíduo Asp na posição 298 era susceptível à clivagem por proteases endógenas (Tesauro *et al.*, 2000). Desde então, diversos autores sentiram-se impelidos a analisar a relação deste polimorfismo com as doenças cardiovasculares. Posteriormente, vários estudos independentes demonstraram que o polimorfismo Glu298Asp não exerce nenhum efeito sobre a atividade da eNOS, tanto *in vitro* (Fairchild *et al.*, 2001; Golser *et al.*, 2003) como *in vivo* (McDonald *et al.*, 2004), e que a associação descrita por Tesauro *et al.* (2000) pode ser atribuída a um artefato metodológico ocorrido durante a preparação das amostras. Com isso, os resultados positivos encontrados nos estudos com o polimorfismo Glu298Asp foram atribuídos ao desequilíbrio de ligação entre este polimorfismo e as outras variantes funcionais no gene da eNOS, como o polimorfismo -786T→C na região promotora, para o qual existem evidências consistentes de que se trata de uma variante funcional (Nakayama *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2000).

As definições diferentes para DGH (critérios diagnósticos distintos)

Uma das grandes dificuldades para discutirmos os resultados, conforme referido anteriormente, em relação aos demais estudos, é a diversidade de classificações e definições dos DHG. Várias definições e classificações são propostas por diferentes grupos de especialistas:

International Society for the Study of Hypertension (ISSH), 1986;

Organização Mundial da Saúde (OMS), 1987;

Canadian Hypertensive Society (CHS), 1997;

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group, 2000;

Australasian Society for the Study of Hypertension (ASSH), 2000;

American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), 2002.

No presente trabalho utilizamos as recomendações do ACOG 2002 foram empregadas, além do critério de acompanhamento até o puerpério tardio, conforme já descrito.

A seleção dos casos e controles

O delineamento de qualquer estudo de caso-controle envolve dois pontos cruciais: a seleção dos indivíduos (principalmente os controles) e a seleção das variantes genéticas (Cardon e Bell, 2001).

Para evitar os vieses de seleção, os indivíduos devem ser selecionados a partir de uma mesma população de origem, a fim de obter a homogeneidade dos casos e controles em relação à ancestralidade genética e aos fatores de risco ambientais (Zondervan e Cardon, 2004). É pouco provável que tenham ocorrido vieses de seleção no presente estudo. Tanto os casos quanto os controles foram selecionados na Maternidade e no Ambulatório do Serviço de Alto Risco do Hospital de referência do Estado do RS, a saber: HNSC do Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre).

Da mesma forma, é improvável que tenham ocorrido vieses de aferição. Todos os pacientes passavam por um exame clínico, por uma entrevista por meio de protocolo padronizado (anexo) e realizavam exames diagnósticos dos distúrbios hipertensivos da gestação. Os controles realizavam entrevista e eram acompanhadas através de suas consultas rotineiras de pré-natal (exames clínicos e laboratoriais). Todas as pacientes e os controles foram acompanhadas até 90 dias de pós-parto (puerpério tardio), pois é conhecido que mesmo após o parto pode ocorrer PE. Portanto, possível viés de classificação também foi cuidadosamente monitorado.

Os exames e os critérios diagnósticos dos distúrbios hipertensivos da gestação

Em relação aos exames e critérios diagnósticos dos distúrbios hipertensivos da gestação, o método tradicionalmente recomendado para o diagnóstico da PE é a proteinúria de 24 horas e aferições da pressão arterial. No entanto, é importante observar que alguns fatores podem levar a confusão nestas medidas: a presença de infecção do trato urinário, comum em pacientes gestantes, pode levar a um exame qualitativo de urina alterado, com presença de proteinúria, para tanto foi observado por nós, todos os exames e descartado este possível fator de confusão.

Além desses métodos, outras medidas laboratoriais foram valorizadas, como medida de ácido úrico (quando superior a 3,6 mg/dL é indicativo de início de PE) (Report, 2000).

Quanto aos demais tipos de DHG, foram observadas as aferições da pressão arterial e também os exames laboratoriais solicitados na rotina do Serviço de Alto Risco do HNSC.

Uma característica da PE é o estado de hipercoagulabilidade e a coagulação intravascular, que é evidenciada pelo consumo plaquetário, com redução de seu tempo de vida (Estelles *et al.*, 1994). Em todas as nossas pacientes que apresentaram plaquetopenia, que é um dos critérios de gravidade para a definição da forma de PE Grave, foi cuidadosamente observado, em pelo menos duas medidas, o número de plaquetas circulantes, pois oscilações da rede elétrica podem influenciar o equipamento de contagem de parâmetros hematológicos. Desta maneira, procuramos evitar classificação errônea de nossas pacientes entre as formas de PE Leve e PE Grave. Além disso, a análise dos polimorfismos era realizada sem a identificação prévia dos pacientes quanto à PE.

A seleção dos genes candidatos

A seleção dos genes candidatos e dos polimorfismos a serem analisados deve ser cuidadosa, principalmente para as variantes recentemente descritas, como ilustrado pelos exemplos descritos a seguir.

Como já descrevemos, a gestação por si é um estado de hipercoagulabilidade. No campo das trombofilias, a tendência à trombose tem sido estudada e ligada a muitos aspectos gestacionais. Recentemente, as complicações graves da gestação como PE, restrição de crescimento intra-uterino, DPP, morte fetal intra-uterina estão sendo associadas com trombofilias. Trombofilias são herdadas ou adquiridas por condições que predispõe o indivíduo à hipercoagulabilidade. As variantes moleculares ligadas à hemostasia, por nós estudadas e descritas ao longo desta tese (C677T do gene da MTHFR, FVL, G20210A do gene da F II e 4G/5G do gene do PAI-1), e suas possíveis associações com PE e ou PE grave, têm sido extensivamente investigadas em todo o mundo. Também os polimorfismos Glu298Asp, intron-4, -786T→C do gene da eNOS tem sido reportados como possíveis fatores de risco ao desenvolvimento e/ou gravidade da PE.

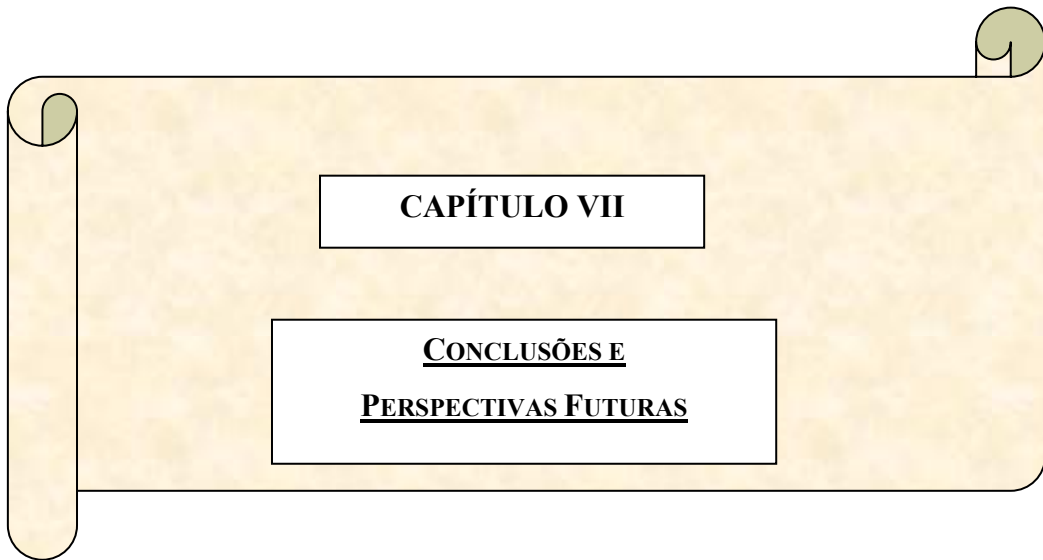
Assim, a seleção dos genes candidatos analisados na presente tese foi baseada nos seguintes critérios:

- (1) Genes que codificam produtos essenciais para a homeostasia vascular e estresse oxidativo e que exercem diversas funções fisiológicas;
- (2) Polimorfismos recentemente identificados e/ou com evidências experimentais quanto ao seu impacto nos níveis e/ou a atividade da proteína em questão;
- (3) Variantes localizadas na região promotora ou codificadora dos genes;
- (4) Evidências de que os mesmos poderiam estar associados com os DHG.

Outros fatores

A maior parte dos estudos, inclusive o nosso, se concentraram na genética materna e não avaliam a influência paterna e do feto. Encontramos dificuldades de acompanhamento das pacientes e dos controles, pois o HNSC atende a um público extremamente carente, conforme pode ser evidenciado no Capítulo II desta tese, através da descrição dos níveis de escolaridade – um índice que retrata nível sócio-econômico. Portanto, as gestantes apresentam dificuldades financeiras até mesmo de comparecer às consultas do pré-natal e o contato telefônico muitas vezes torna-se inviável pelos mais diversos fatores. Por isso, apesar das limitações destacadas conseguimos obter um tamanho amostral expressivo, equivalente ou mesmo superior aos estudos realizados em outras populações mundiais (Lindoff *et al.*, 1997; Shoda *et al.*, 1997; Fabbro *et al.*, 2003; D’Elia *et al.*, 2002; Dávalos *et al.*, 2005).

Ao iniciarmos o estudo em 2002, as publicações com relação a este tema eram restritas às populações dos Estados Unidos da América, Europa e Ásia. Até o presente momento, não encontramos nenhuma outra publicação completa relacionadas à população brasileira.



9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A análise realizada a partir dos dados obtidos nos permitiu formular as seguintes conclusões do estudo nesta população:

- (1) Foram estudadas 11 fatores de risco conhecidos como predisponentes aos DHG. Entretanto, apenas história familiar de PE, DM e HAS prévia mostraram-se como fatores de risco independentes.
- (2) As distribuições genótípicas e freqüências alélicas dos polimorfismos C677T do gene da MTHFR, G1691A do gene do FV, G20210A do gene da F II e 4G/5G do gene do PAI-1 não parecem estar associadas isoladamente à ocorrência e/ou severidade da PE em gestantes com essa complicação quando comparadas à gestantes normotensas. Entretanto, a interação entre os genótipos de risco mostrou-se significativamente associada à PE, com valores crescentes com o número de genótipos envolvidos.
- (3) A distribuição genotípica do polimorfismo Glu298Asp do gene da eNOS foi significativamente diferente entre as pacientes com PE e as mulheres normotensas caucasóides, no entanto não foi diferente nas pacientes afro-brasileiras.
- (4) A distribuição genotípica e freqüência alélica dos polimorfismos intron-4 e –786T→C do gene da eNOS não estão associadas à ocorrência e/ou severidade da

PE em gestantes com essa complicação quando comparadas à gestantes normotensas, seja no grupo das caucasóides ou das afro-brasileiras.

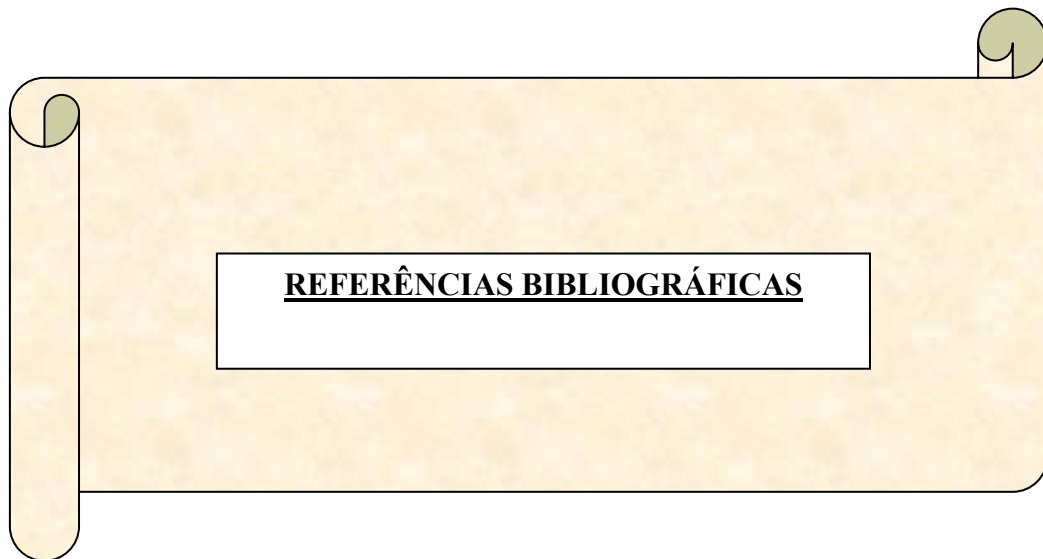
- (5) As frequências dos haplótipos Glu298Asp , intron-4 e -786T→C foram diferentes nas mulheres com PE quando comparadas à gestantes normotensas no grupo de mulheres afro-brasileiras, onde o haplótipo Asp298-786T-4b foi mais frequente nos casos do que nos controles.

Assim, as perspectivas do presente estudo podem ser resumidas em:

- (1) Estudos que visem a identificação de fatores de risco ligadas aos DHG em nossa população são necessários para que auxilie no manejo destas complicações.
- (2) Os polimorfismos relacionados ao estresse oxidativo, embora constituam um campo de pesquisa promissor na identificação de variantes genéticas associadas aos DHG, têm sido pouco explorados, até o momento, o que justifica uma maior ênfase nesta linha de investigação.
- (3) Devido ao grande número de SNPs (“single nucleotide polymorphisms”) identificados e caracterizados e à variabilidade intra-genômica e inter-populacional no padrão de desequilíbrio de ligação, os estudos de associação deveriam focar na investigação de haplótipos, e não em alguns SNPs isoladamente.
- (4) Como existe uma grande variabilidade genética entre os diversos grupos étnicos, a identificação de variantes genéticas associadas às DHG requer

que os estudos de associação investiguem populações etnicamente diferenciadas, especialmente no Brasil.

- (5) Devido ao grande número de comparações realizadas e ao limitado tamanho amostral, quando comparado com outros estudos realizados por consórcios internacionais, os nossos resultados devem ser confirmados em outras populações.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdella TN, Sibai BM e Hays JM (1984) Relationship of hypertensive disease to abruptio placentae. *Obstet Gynecol* 63:365-370.
- ACOG (2001) Chronic hypertension in pregnancy. *ACOG Practice Bulletin* 29:1-13.
- ACOG (2002) Diagnosis and management of preeclampsia. *ACOG Practice Bulletin* 33:1-14.
- Ament L (2003) Factor V Leiden: a review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs* 14: 190-195.
- Arngrimsson R, Bjornsson S e Geirsson RT (1995) Analysis of different inheritance patterns in eclampsia/pre-eclampsia syndrome. *Hypertens Pregnancy* 14:27-38.
- Arngrimsson R, Geirsson RT e Bjornsson S (1990) Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *BJOG* 97:762-769.
- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Goncalves MS, Costa FF (1997) Prevalence of the prothrombin gene variant (nt20210A) in venous thrombosis and arterial disease *Thromb Haemost* 78:1430-1433.
- Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF e Reitsma PH (1995) Factor V Leiden is common in a Brazilian population. *Am J Haematol* 49:46-51.
- Astolfi P, Zonta LA (2002) Delayed maternity and risk delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol* 16:67-72.
- Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW, Roa BB e Greg AR (2001) Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:1345-1351.
- Beauchamp NJ, Daly ME, Hampton KK Cooper PC, Preaton FR e Peake IR (1994) High prevalence of a mutation in the factor V gene within the UK population: relationship to activated protein c resistance and familial thrombosis. *Brit J Haematol* 88:219-222.
- Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA e Reitsma PH (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-67.
- Bloem BR, van Putten MJ, van Hilten JJ e Bertina RM (1998) Superior sagittal sinus thrombosis in a patient heterozygous for the novel 20210 A allele of the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 79 1:235.

- Boundel M, Hepner M, Sciuccati G, Pieroni G, Feliu-Torres A, Mardaraz C e Frontroth JP (2002) Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation in children with venous thromboembolism. *Thromb Haemast* 87:972-977.
- Brown AM e Buddle ML (1997) What's the name? Problems with the classification of hypertension in pregnancy. *J Hypertens* 15:1049-1054.
- Brown K, Luddington R, Willianson D, Baker P e Baglin T (1997) Risk of venous thromboembolism associated with a G to A transition at position 20210 in the 3'untranslated region of the prothrombin gene. *Brit J Haematol* 98:907-909.
- Brown MA, Wang MX, Buddle ML, Carlton MA, Carrio GM, Zammit VC e Withworth JA (1994) Albumin excretory rate in normal and hypertensive pregnancy. *Cli Sci (Colch)*. 86:251-255.
- Bucciarelli P, Franchi F, Alatri A, Bettini P e Moia M (1998) Budd-Chiari syndrome in a patient heterozygous for the G20210A mutation of the prothrombin gene. *Thromb Haemost* 79:445-446.
- Burick A, Wisotzkey JD, Najarian MP, Monk Jr. JS e Rhoads Jr. JE (1997) The role of preoperative factor V Leiden screening in different geographic populations. *The American Surgeon* 63:547-550.
- Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, VanDorsten P, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis P e Thurnau G (1998) Low-dose aspirin to prevent pre-eclampsia in women with high risk. *N Engl J Med* 338:701-705.
- Cayatte A, Palacino JJ, Horten K e Cohen RA (1994) Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 14:753-759.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J e Deanfield JE (1994) Endothelial dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 24:1468-1474.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK e Deanfield JE (1992) Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 340:1111-1115.
- Chesley LC e Cooper DW (1986) Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. *Br J Obstet Gynaecol* 93:898-908.
- Cincotta RB e Brennecke SP (1998) Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. *Int J Gynecol Obstet* 60:23-27.
- Cockell AP e Poston L (1997) Flow-mediated vasodilation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension* 30:247-251.

- Cooper DW e Liston WA (1979) Genetic control of severe preeclampsia. *J Med Genet* 16: 409-416.
- Corral J, Gonzalez-Conejero R, Lozano ML, Rivera J, Heras I e Vicente V (1997) The venous thrombosis risk factor 20210 A allele of prothrombin gene is not a major risk factor for arterial thrombotic disease. *Brit J Haematol* 99:304-307.
- Cumming AM, Keeney S, Salden A, Bhavnani M, Shwe KH e Hhay CRM (1997) The prothrombin gene G20210A variant: prevalence in a UK anticoagulant clinic population. *Brit J Haematol* 98:353-355.
- Dahlback B (1994) Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis* 24:139-151.
- Dávalos IP, Moran MC, Martínez-Abundis E, González-Órtiz M, Flores-Martínez SE, Machorro V, Sandoval L, Figuera LE, Mena JP, Oliva JM, Tlacuilo-Parra JA, Sanchez-Corona J e Salazar-Paramo M (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and Factor V Leiden variant in Mexican women with preeclampsia/eclampsia. *Blood Cells, Mol Dis* 35:66-69.
- De Swiet M. Maternal mortality: confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:760-66.
- De Groot CJM, Bloemenkamp KWM, Duvekot EJ, Helmerhorst FM, Bertina RM, Van Der Meer F, De Ronde H, Oei SG, Kanhai HHH e Rosendaal FR (1999). Preeclampsia and genetic risk factors for thrombosis: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 181:975-980.
- de Maat MPM, de Bart ACW, Meijer HP, Havelaar AC, Mulder PGH e Kluft C (1996) Interindividual and intraindividual variability in plasma fibrinogen, t-PA antigen, PAI-1 activity, and CRP in healthy, Young volunteers and patients with angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1156-1162.
- de Maat MPM, Jansen MWJC, Hille ETM, Vos HL, Bloemenkamp KW, Buitendijk S, Helmerhorst FM, Wladimiroff JW, Bertina RM, De Groot CJ (2004) Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes, *J Thromb Haemost* 2:1588-1593.
- Dekker GA (1999) Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 42:422-435.
- Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C e van Geijn HP (1995) Underling disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 173:1042-1048.
- D'Elia AV, Driul L, Giacomello R, Colaone R, Fabbro D, Di Leonardo C, Florio P, Petraglia F, Marchesoni D e Damante G (2002) Frequency of factor V, prothrombin

and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 53:84-87.

Department of Health (1999) Why mothers die. Report on confidential inquiries into maternal deaths in United Kingdom 1994-96. London: Stationery Office.

Dilley A, Austin H, Hooper AW, El-Jamil M, Whitsett C, Wenger N, Benson J e Evatt B (1998) Prevalence of the prothrombin 20210G-to-A variant in Blacks> infants, patients with venous thrombosis, patients with myocardial infarction, and control subjects. *J Lab Clin Med* 132:452-455.

Dizon–Townson DS, Nelson LM, Easton K e Ward K (1996). The Factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 175:902-905.

Duley L (1992) Maternal mortality associated with antihypertensive disorders of pregnancy in Africa, Asia, Latin America, and the Caribbean. *Br J Obstet Gynaecol* 99:547-553.

Esplin MS, Fausett MB, Fraser A, Kerber R, Mineau G, Carrillo J e Varner MW (2001) Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N Engl J Med* 344:867-872.

Faas MM, Bakker WW, Valkhof N, Baller JF e Schuiling GA (1997) Plasma endotelin-1 and tumor necrosis factor-alpha concentrations in pregnant and cyclic rats after low dose endotoxin infusion. *Am J Obstet Gynecol* 177:429-430.

Faas MM, Schuiling GA, Linton EA, Sargent IL e Redman CW (2000) Activation of peripheral leukocytes in rat pregnancy and experimental preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 182:351-357.

Fabbro DD, D'Elia AV, Spizzo R, Driul L, Barillari G, Di Loreto C, Marchesoni D e Damante G (2003) Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphisms and preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 56:17-22.

Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ e Sessa WC (2001) Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)→Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276:26674-26679.

Ferraresi P, Marchetti G, Lagnani C, Cavallari E, Castoldi E, Mascoli F, Ardissimo D, Palareti G e Bernardi F (1997) The heterozygous 20210 G/A prothrombin genotype is associated with early venous thrombosis in thrombophilias and is not increased in frequency in disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2418-2422.

Folsom AR, Pankow JS, Williams RR, Evans GW, Province MA e Eckfeldt JH (1998) Fibrinogen, plasminogen activator inhibitor-1, and carotid intima-media wall thickness in the NHLBI Family Heart Study. *Thromb Haemost* 79:400-404.

- Förstermann U, Boissel JP e Kleinert H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12:773-790.
- Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J e Beijamin N (1997) Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 349:837-842.
- Franco RF, Santos SEB, Elion J, Tavella MH e Zago MA (1998) Prevalence of the G20210A polymorphism in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene in different human populations. *Acta Haematologica* 100:9-12.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP e Rozen R (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111-113.
- Gaio DS, Schmidt MI, Duncan BB, Nucci LB, Matos MC e Branchtein L (2001). Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens Pregn* 20:269-281.
- Garg UC e Hassid A (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83:1774-1777.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E e Romero R (2001) Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 185: 792-797.
- Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A (2001) Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol* 97:44-48.
- Golser R, Gorren AC, Mayer B e Schmidt K (2003) Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide* 8:7-14.
- GOPEC Consortium (2005) Disentangling fetal and maternal susceptibility for pre-eclampsia: A British multicenter candidate-gene study. *Am J Hum Genet* 77:127-131.
- Grandone E, Margaglione M, Calaiizzo D, Cappucci G, Paladini D, Martinelli P, Montanaro S, Pavone G e Di Minno G (1997) C→T MTHFR polymorphism and genetic to pre-eclampsia. *Thromb Haemost* 77:1052-1054.
- Grandone E, Margaglione M, Calaiizzo D, Cappucci G, Sciannone N, Montanaro S, Paladini D, Martinelli P e Di Minno G (1999) Prothrombotic genetic risk factors and the occurrence of gestational hypertension with or without proteinuria. *Thromb Haemost* 81:349-352.

- Green F e Humphries S (1994) Genetic determinants of arterial thrombosis. *Ballière's Clinical Haematology* 7:675-692.
- Gregg JP, Yamane AJ e Grody WW (1997) Prevalence of factor V-Leiden mutation in four distinct American ethnic populations. *Am J of Med Genet* 73: 334-336.
- Gregory KD, Korst LM (2003) Age and racial/ethnic differences in maternal, fetal, and placental conditions in laboring patients. *Am J Obst Gynecol* 188:1602-1608.
- Hallak M, Senderowicz J, Cassel A, Shapira C, Aghai E, Ausleder R e Abramovivih (1997) Activated protein C resistance associated with thrombosis in pregnancy. *Am J Obst Gynecol* 176:889-893.
- Hamsten A, Wiman B, de Faire U e Blomback M (1985) Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in Young survivors of myocardial infarction. *New Engl J Med* 19:1557-1563.
- Hamsten A, Walldius G, Szamosi M, Faire U, Dahlén G, Landou C e Win\man B (1987) Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* VII 8549:3-8.
- Helewa ME, Burrows RF, Smith J, Williams K, Brain P e Rabikin SW (1997) Report of the Canadian Hypertension Society Consensus. Conference 1: definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 157:715-725 (Level III).
- Hellgren M, Svensson PJ e Dahlback B (1995) Resistance associated protein C as a basis for venous thromboembolism associate with pregnancy and oral contraceptiveis. *Am J Obstet Gynecol* 173:210-213.
- Higgins JR, Kaiser T, Moses EK, North R e Brennecke (2000) Prothrombin G20210A mutations: is it associate with pre-eclampsia? *Gynecol Obstet Invest* 50:254-257.
- Hillarp A, Zoller B, Svensson PJ e Dahlback B (1997) The 20210 A allele of the prothrombin gene is a common risk factor among Swedish outpatients with verified deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 78:990-992.
- Hingorani AD (2000) Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. *Atherosclerosis* 154:521-527.
- Hogg N, Kalyanaramam B, Joseph J, Struck A e Parthasarathy S (1993) Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett* 334:170-174.
- Howard TE, Marusa M, Channel C e Duncan A (1997) A patient homozygous for a mutation in the prothrombin gene 3'untranslated region associated with massive thrombosis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 8:316-319.

- Jeffery S, Leatham E, Zhang Y, Carter J, Pratel P e Kaski JC (1996) Factor V Leiden polymorphism FVQ506 in patients with ischaemic heart disease, and in different populations groups. *J Hum Hypertens* 10:433-434.
- Kaaja RJ e Greer IA (2005) Manifestations of chronic disease during pregnancy. *JAMA* 294:2751-2757.
- Kaiser T, Brennecke SP e Moses EK (2000) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are not a risk factor for pre-eclampsia/eclampsia in Australian women. *Gynecol Obstet Invest* 50:100-102.
- Kapur RK, Mills LA, Spitzer SG e Hultin MB (1997) A prothrombin gene mutation is significantly associated with venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2875-2879.
- Kim YJ, Ahn B, Song TB e Byun J (2001a) Lipide peroxidation and total peroxyl radical trapping ability of umbilical venous blood plasma in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:S75.
- Kim YJ, Williamson RA, Murray JC, Andrews J, Pietscher JJ, Peraud PJ e Merrill DC. (2001b) Genetic susceptibility to pre-eclampsia roles of cytosine-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-basepair insertion at nucleotide 844 of the gene for cyathione β -synthase, and factor V Leiden mutation. *Am J Obstet Gynecol* 184:1211-1217.
- Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Boers GH, Frosst P, Stevens EM, van Oost BA, den Heijer M, Trijbels FJ, Rozen R e Blom HJ (1996) Molecular genetic analysis in mild hiperhomociteinemia: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 58:38-41.
- Kobashi G, Yamada H, Asano T, Nagano S, Hata A, Kishi R, Fujimoto e Kondo R (2000) Absence of association between a common mutation in the MTHFR gene and preeclampsia in Japanese women. *Am J Med Genet* 93:122-125.
- Kobashi G, Yamada H, Ohta K, Kato E, Ebina Y e Fujimoto S (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet* 103:241-244.
- Kubes P, Suzuki M e Granger DN (1991) Nitric oxide: as endogenous modelator of leuckocyte adhesion. *Proc Natl Aca Sci USA* 88:4651-4655.
- Kujovich JL (2004) Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol* 191:412-424.
- Kupfermanc MJ (2005) Thrombophilia and preeclampsia: the evidence so far. *Clin Obstet and Gynecol* 48: 406-415.

- Kupfermanc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Gordon D, Eldor A e Lessing JB (1999) Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 340:9-13.
- Kupfermanc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A e Lessing JB (2000a) Severe preeclampsia and high frequency genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol* 96:45-49.
- Kupfermanc MJ, Peri H, Zwang E, Yaron Y, Wolman I e Eldor A (2000b) High prevalence of the prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth retardation, abruption placentae and 2nd trimester loss. *Acta Obstet Gynecol Scand* 79:963-967.
- Lachmeijer AMA, Arngrimsson R, Bastiaans EJ, Pals G, ten Kate LP, Vriés JI, Kostense PJ, Aarnoudse JG e Dekker GA (2001) Mutations in the gene for MTHFR, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of PE. *Am J Obstet Gynecol* 184:394-402.
- Lachmeijer AMA, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP e Arngrimsson R (2002) Searching for preeclampsia genes; the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 105:92-113.
- Lain KY e Roberts JM (2002) Contemporary concepts of the pathogenesis and management of preeclampsia. *JAMA* 26 (287):3183-3186.
- Laivouri H, Kaaja R, Ylikorkala O, Hiltunen T e Kontula K (2000) 677C→T polymorphism of the MTHFR gene and pre-eclampsia. *Obstet Gynecol* 96:277-280.
- Lee DH, Henderson PA e Blajchman MA (1996) Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. *Canadian Medical Association Journal* 155:285-289.
- Levine AJ, Siegmund KD, Ervin CM, Diep A, Lee ER, Frankl HD e Haili RW (2000) The methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:657-663.
- Li H, Wallerah T e Förstermann U (2002) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7:132-147.
- Lindoff C, Ingemarsson I, Martinsson G, Segemark M, Thyssel H e Asedt B (1997) Preeclampsia is associated with a reduced response to activated protein C. *Am J Obstet Gynecol* 176:457-460.
- Liston WA e Kilpatrick DC (1991) Is a genetic susceptibility to pre-eclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus? *Br J Obstet Gynaecol* 98:1079-1086.

- Livingston JC, Barton JR e Park V (2001) Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 185:153-157.
- Lockwood CJ (1999) Hereditary coagulopathies in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 54:754-765.
- Maraganore JM (1993) Thrombin, thrombin inhibitors, and the arterial thrombotic process. *Thromb Haemost* 70:208-211.
- Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O e di Minno G (1998) The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:152-156.
- Margaglione M, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, Colaizzo D, Celentano E, Panico S e di Mino G (1997) Plasminogen activator inhibitor PAI-1 antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensinogen converting enzyme ACE genes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:2082-2088.
- Mathews TJ, Hamilton BE (2002) Mean age of mother, 1970-2000. *Natl Vital Stat Rep* 51:1-13.
- Mathonnet F, Nadifi S, Serazin-Leroy V, Dakouane A e Giudicelli Y (2002) Absence of factor V Leiden mutation and low prothrombin G20210A mutation prevalence in a healthy Moroccan population. *Thrombosis and Haemostasis* 88:1073-1074.
- McCully KS (1996) Homocysteinemia and vascular disease. *Nat Med* 2:386-389.
- McDonald DM, Alp NJ e Channon KM (2004) Functional comparison of the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphic variants in human endothelial cells. *Pharmacogenetics* 14:831-839.
- Mimuro S, Lahoud R, Beutler L e Trudinger B (1998) Changes in resistance to activated protein C in the course of pregnancy and prevalence of factor V mutation. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 38:200-204.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama M, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K (1998) Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32:3-8.
- Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, Hino J, Ogawa E, Hamanaka I, Kamitani S, Takahashi N, Kawakami R, Kangawa K, Yasue H e Nakao K (2000) 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* 9:2629-2637.

Mogren I, Hogberg U, Winkvist A e Stenlund H (1999) Familial occurrence of preeclampsia. *Epidemiology* 10:518-522.

Moncada S e Higgs A (1993) The L-arginine- nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012.

Morgan L, Crawshaw S, Baker PN, Broughton Pipkin F e Kalsherker N (1999) Maternal and fetal angiotensinogen gene allele sharing in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 106:244-251.

Morrison ER, Miedzybrodzka AZ, Campbell DM, Haites NE, Wilson BJ, Watson MS, Greaves M e Vickers MA (2002) Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestacional hypertension: results from a large population – based study and systematic review. *Thromb Haemost* 87:779-785.

Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ, D'ello M, Regan C, Whitehead AS e Fitzgerald DJ (2000) Prospective evaluation of thr risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:266-270.

Nadaud S, Bonnarddeaux A, Lathrop M e Soubrier F (1994) Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 198:1027-1033.

Nagy B, Toth T, Rigo J Jr, Karadi I, Romics L e Papp Z (1998) Detection of Factor V mutation in severe pre-eclamptic Hungarian women. *Clin Genet* 53:478-481.

Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y e Nakao K (1999) T-786→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99:2864-2870.

Ness RB, Markovic N, Bass D, Harger G e Roberts JM (2003) Family history of hypertension, heart disease, and stroke among woen who developed hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol* 102:1366-1371.

Norwitz E, Robinson JN e Repke JT (1999) Prevention of preeclampsia: is it possible? *Clin Obstet and Gynecol* 42: 436-454.

O'Saughnessy KM, Fu B, Ferraro F, Lewis I, Downing S e Morris NH (1999) Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in an East Anglian preeclampsia cohort. *Hypertension* 33:1338-1341.

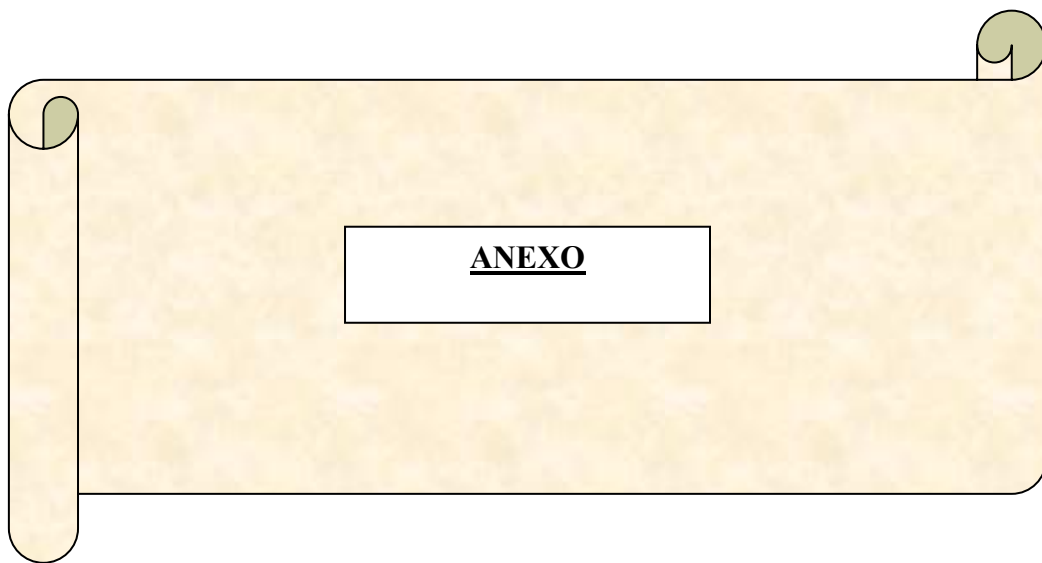
Ogunyemi D, Benae JL e Ukatu C (2005) Is eclampsia preventable? A case control reiew of consecutive cases from urban underserved region. *South Med* 97:440-445.

- Pegoraro RJ, Hira B e Moodley J (2003) Plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and platelet glycoprotein IIIa (PGIIIa) polymorphisms in Black South Africa with pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 82:313-317.
- Perry KG Jr e Martin JN Jr (1992) Abnormal hemostasis and coagulopathy in preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 35:338-350.
- Pipkin FB (2001) Risk factors for preeclampsia? *N Engl J Med* 22(344):925-926.
- Poort S, Rosendaal F, Reitsma P e Bertina R (1996) A common genetic in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698-3703.
- Powers RW, Minich LA, Lykins DL, Ness RB, Crombleholme WR e Roberts JM (1999) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, folate and susceptibility to pre-eclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 6:74-79.
- Radomski MW, Palmer RM e Moncada S (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2:1057-1058.
- Raikovic A, Catalano PM e Malinow MR (1997) Elevated homocyst(e)ine levels with preeclampsia. *Obstet Gynecol* 90:168-171.
- Redman CWG, Sacks GP e Sargent IL (1999) Preeclampsia, an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180:499-506.
- Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy (2000) *Am J Obstet Gynecol* 183:S1-S22.
- Rigo J Jr, Nagy B e Fintor L (2000) Maternal and neonatal outcome of pre-eclampsia pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5, 10 MTHFR. *Hypertens Preg* 19:163-172.
- Roberts JM e Cooper DW (2001) Pathogenesis and genetics of preeclampsia. *Lancet* 357:53-56.
- Rosendaal FR, Doggn CJM, Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE e Reitsma PH (1998) Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. *Thromb Haemost* 79:706-708.
- Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D e Webb RC (1996) Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 78:225-230.
- Savvidou MD, Vallance PJT, Nicolaidis KH e Hingorani AD (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension* 38:1289-1293.

- Scott CL, Chavez GF, Atrasch HK, Taylor DJ, Shah RS e Rowley D (1997) Hospitalizations for severe complications of pregnancy, 1987-1992. *Obstet Gynecol* 90:225-229.
- Seligman SP (1994) The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 171:944-948.
- Serrano NC, Casas JP, Diaz LA, Paez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, Vallance P e Lopez-Jaramillo P (2004) Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension* 44:702-707.
- Sibai B, Dekker G e Kupferminc M (2005) Preeclampsia. *Lancet* 365:785-799.
- Sibai BM (1990) The HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, and low plaquetes): much ado about nothing? [see comments]. *Am J Obstet Gynecol* 162:311-316.
- Sibai BM e Abdella TN, Anderson GD (1983) Pregnancy outcome in 211 patients with mild chronic hypertension. *Obst Gynecol* 61:571-576.
- Sibai BM, Ewell M, Levine RJ, Klebanoff MA, Esterlitz J, Catalano PM, Goldenberg RL e Joffe G (1997) Risk factors associated with preeclampsia in helath mulliparous women: the calcium for preeclampsia prevention (CPEP) study group [see comments]. *Am J Obstet Gynecol* 177:1003-1010.
- Simioni P, Pradoni P, Lensing AWA, Scudeller A, Sardella C, Prins MH, Villalta S, Dazzi F e Girolami A (1997) The risk of recurrent venous throboembolism in patientes an Arg50Gln mutation in the gene for factor V. *New Engl J Med* 336:399-403.
- Skjaerven R, Vatten LJ, Wilcox AJ, Ronning T, Irgens LM e Lie RT (2005) Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ* 331:877.
- Sladek SM, Magness RR e Conrad KP (1997) Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 272:441-463.
- Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H e Kubo T (1997) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and preeclampsia. *J Med Genet* 34:525-526.
- Svensson PJ, Zoller B, Mattiason I e Dahlback B (1997) The factor v R506Q mutation causing APC resistance is highly prevalent amongst unselected outpatients with clinically suspected deep venous thrombosis. *J Inter Med* 241:379-385.
- Tamim H, Finan RR e Almawi Y (2002) Prevalence of two thrombophilia predisposing mutations: factor V G1691A R506Q, Leiden and prothronbin G20210A, among healthy Lebanese. *Thromb Haemost* 88:691-692.

- Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE e Greg AR (2001) An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 20:107-118.
- Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP e Moss J (2000) Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2832-2835.
- The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (1997) *Arch Intern Med* 157:2413-2446 [erratum *Arch Intern Med* 1998;158:573] (Level III).
- Thornton JG e Macdonald AM (1999) Twin mothers, pregnancy hypertension and preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 106:570-575.
- Thornton JG e Onwude JL (1991) Preeclampsia discordance among identical twins. *BMJ* 303:1241-1242.
- Treolar AS, Cooper DW, Brennecke SP, Grehan MM e Martin NG (2001) An Australian twin study of the genetic basis of preeclampsia and eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 184:371-381.
- Tsukada T, Yokohama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T e Igari J (1998) Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 245:190-193.
- Tuddenham EGD e Cooper DN (1994) *The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders*. Oxford University Press.
- van Katwijk C, Peeters LL (1998) Clinical aspects of pregnancy after the age of 35 years: a review of the literature. *Hum Reprod Update* 4:185-194.
- van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MMW, von Blomberg ME e Buller HR (1999) High prevalence of haemostatic abnormalities in women with a history of severe pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 180:1146-1150.
- von Templehoff GF, Heilmann L, Spanuth E, Kunzmann E e Hommel G (2000) Incidence of the factor V Leiden mutation, coagulation inhibitor deficiency, and elevated antiphospholipid antibodies in patients with pre-eclampsia or HELLP-syndrome. *Throm Res* 100:363-365.
- Walker JJ (2000) Pre-eclampsia. *Lancet* 356:1260-1265.
- Wallenburg HCS (2001) Prevención de la preeclampsia: situación y perspectivas en el año 2000. *Eur J of Obstet and Reproduc Biol* 1:254-263.

- Wang XL e Wang J (2000) Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol Genet Metab* 70:241-251.
- Wang XL, Mahaney MC, Sim AS, Wang J, Blangero J, Almasy L, Badenhop RF e Wilcken DE (1997) Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:3147-3153.
- Wang XL, Sim AS, Wang MX, Murrell GA, Trudinger B e Wang J (2000) Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett* 471:45-50.
- Yamada N, Arinami T, Kobayashi KY, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, Kubo T e Hamaguchi H (2000) The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor –1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet* 45:138-141.
- Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H e Okamura H (2000) Association of the missense Glu928Asp variant of endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 7:238-241.
- Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H e Okamura H (2001) The missense Glu928Asp variant of endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption. *Hum Genet* 108(3):181-183.
- Ziadeh S, Yahaya A (2001) Pregnancy outcome at age 40 and older. *Arch Gynecol Obstet* 265:30-33.
- Zusterzeel PLM, Visser W, Blom HJ, Peters WHM, Heil SG e Steegers EAP (2000) Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in pre-eclampsia and the HELLP syndrome. *Hypertens Preg* 19:299-307.



ANEXO
**Programa De Pós - Graduação Em Genética E Biologia Molecular E Grupo
Hospitalar Conceição – Setor Gestação De Alto Risco**

Questionário Distúrbios Hipertensivos Na Gestação

- 1- Nº _____ Data internação ___ / ___ / ___ Leito _____
- 2- Nome _____ 3- Registro _____
- 3- End _____
- 4- Fone1 _____ Fone2 _____
- 5- Cor ()1-Branca ()2-Mista ou negra
- 6- Data Nascimento ___ / ___ / ___ 7- Idade ___
- 7- Gesta ___ Para ___
- 8- Cesária ___ intervalo gest: ___
- 9- Aborto ___ () espontâneo () provocado
- 10- DUM ___ / ___ / ___ IG ___
- 11- ECO _____ IG _____
- 12- Pré natal ()0-não ()1- sim HNSC ()2-sim outro
- 13- ACO ()0- não () 1- sim
- 14- Fumante ()0- não () ___ n° cigarros/dia
- 15- Drogas () 0-não () Qual? _____
- 16- Peso _____ Altura _____ IMC _____
- 17- Diagnóstico da internação _____
Outros diagnósticos _____
- 20- HAS () 0-não () 1- sim primária () 2- sim secundária
- 21- Tempo de diagnóstico ___ anos
- 22 - Medicações prévias _____
- 23- Medicações na gestação _____
- 24- Complicações () 1- Cardiopatia hipertensiva
() 2- AVC 0-Não
() 3- IAM 1-Sim
() 4- Ins. Renal
- 25- DHEG () 0-não () 1- sim leve () 2-sim grave
- 26- Idade gestacional do diagnóstico _____
- 27- História familiar () 0-não () 1-sim materna () 2-sim paterna () 8- NSA28- História prévia () 0-não () 1- sim () 8 NSA
- 29- Novo parceiro () 0-não () 1- sim () 8-NSA
- 30- Complicações maternas () 1- DPP
() 2- EAP

- 3- Insuf. Renal
 - 4- Hellp
 - 5-Eclâmpsia
 - 6- coagulopatia
- 0-Não
1-Sim

TA internação: _____

Medicação na gestação _____

31- Hipertensão transitória 0-não 1-sim

32-Hipertensão não classificada 0-não 1-sim

33- Data do parto ___/___/___

34- Idade gestacional ___

35- Parto 1- único 2-múltiplo

Via de parto 0 vag 1 forp 2 ces mat _____ 3 ces fetal _____

Sexo RN 1 masculino 2 feminino

36- Peso _____ Capurro _____ 1 AIG 2 PIG 3GIG

37- 0-FM 1- MBP 2-BP

Prematuridade 0-não 1-sim

Local RN: _____ Apgar: _____

Usou sulfato de magnésio:

TA pós parto _____

Revisão 45 dias Data ___/___/___

Observações: _____

MAC sugerido _____

Entrevistadora: _____

Data					
IG					
Peso					
TA					

Ecos

TS:	HbsAg:
VDRL:	Toxo IgG:
Anti-HIV:	Toxo IgM:
Glicemia:	

EXAMES - RESULTADOS

DATA:	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
HT:	-	-		-	---
Hgb:					
Plaq					
TP					

KTTP					
Fibri					
Ureia					
Creat					
BT					
TGO					
TGP					
Ac.urico					
DHL					
Prot 24					
Ca 24h					
DCE					

ECG: **DATA:**

RX TX: **DATA:**

ECOCARDIOGRAMA: **DATA:**

CINTILO **DATA:**

DADOS DE USO DE ÁLCOOL

1. Com que frequência a Sra toma bebidas de álcool?
(0)nunca (1)1x mês ou menos (2)2-4x por mês (3)2-3x por semana (4)4 ou + vezes por semana
2. Nas ocasiões em que bebe, quantas doses, copos ou garrafas a Sra costuma tomar?
(0)1 ou 2 doses (1) 3 ou 4 doses (2) 4-6 doses (3) 7 ou 9 doses (4) 10 ou mais doses
3. Com que frequência a Sra toma “seis ou mais doses” em uma ocasião?
(0)nunca (1)menos 1x mês (2)1x por mês (3)1x por semana (4)Todos os dias ou quase todos os dias
4. Com que frequência, durante o último ano a Sra achou que não seria capaz de controlar a quantidade de bebida ingerida depois de começar?
(0)nunca (1)menos 1x mês (2)1x por mês (3)1x por semana (4)Todos os dias ou quase todos os dias
5. Com que frequência, durante o último ano, a Sra não conseguiu cumprir com algum compromisso por causa da bebida?
(0)nunca (1)menos 1x mês (2)1x por mês (3)1x por semana (4)Todos os dias ou quase todos os dias
6. Com que frequência durante o último ano depois de Ter bebido muito a Sra precisou beber pela manhã para se sentir melhor?
(0)nunca (1)menos 1x mês (2)1x por mês (3)1x por semana (4)Todos os dias ou quase todos os dias
7. Com que frequência, durante o último ano, a Sra sentiu culpa ou remorso depois de beber?
(0)nunca (1)menos 1x mês (2)1x por mês (3)1x por semana (4)Todos os dias ou quase todos os dias
8. Com que frequência, durante o último ano, a Sra não conseguiu se lembrar do que aconteceu na noite anterior por causa da bebida?
(0)nunca (1)menos 1x mês (2)1x por mês (3)1x por semana (4)Todos os dias ou quase todos os dias
9. Alguma vez na vida a Sra ou alguma outra pessoa já se machucou, se prejudicou por causa de a Sra Ter bebido?
(0)não (2)sim mas não no último anos (4) sim durante o último ano
10. Alguma vez na vida algum parente, amigo, médico ou outro profissional da saúde já se preocupou com a Sra por causa da bebida ou lhe disse para parar de beber?
(0)não (2)sim mas não no último anos (4) sim durante o último ano

DADOS SOCIOECONÔMICOS

1. Quantas pessoas moram na sua casa e qual sua idade?
- | Idade | <19 ^a | 20-69 | 70 ou + | Total |
|------------|------------------|-------|---------|-------|
| Nº pessoas | _____ | | | |
2. Na sua casa a Sra tem: (tem de estar funcionando)
- | | | |
|------------|---------|---|
| Rádio | (0) não | Sim, quantos? (1) (2) (3) (4) quatro ou mais |
| Geladeira | (0) não | (2) sim |
| Freezer | (0) não | (1) sim |
| Carro | (0) não | Sim, quantos? (2)um (4)dois (5) três ou + |
| Aspirador | (0) não | (1) sim |
| M lavar ro | (0)não | (1) sim |
| V. cassete | (0)não | (2) sim |
| TV cores | (0)não | Sim, quantas (2)uma (3)duas (4) três (5) 4 ou + |
| Banheiro | (0)não | Sim, quantos? (2) um (3)dois (4) três ou + |
| Empregad | (0)não | Sim, quantos? (2) um (4) dois ou + |
3. No mês passado, quanto ganharam as pessoas que moram na sua casa?
- MR: pessoa de maior renda
- Pessoa 1(MR): _____
- Pessoa 2: _____

A Família tem outra fonte de renda, por exemplo aposentadoria, pensão, aluguel ou outros?

Outra renda: _____

AS PERGUNTAS ABAIXO REFEREM-SE A PESSOA DE MAIOR RENDA NA FAMÍLIA

4. Até que série estudou na escola?
- __série do __grau
- ATIVIDADE DE MAIOR RENDA*
5. Está trabalhando no momento?
- | | |
|----------------|-----------------|
| (1)Trabalhando | (2)desempregado |
| (3)aposentado | (4)pensionista |
| (5)encostado | (6)estudante |
| () outra | _____ |
6. Qual o tipo de firma que trabalha(va)? _____
7. Que tipo de trabalho faz ou fez? _____
8. É empregado, patrão ou trabalha por conta própria?
- | |
|---|
| (1) Empregado |
| (2) Empregador – nº de empregados? _ |
| (3) Conta própria com estabelecimento próprio |
| (4) Conta própria sem estabelecimento próprio |
| (5) Biscateiro |
| (6) Outro _____ |

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Gostaria de convidá-la para participar de um estudo em que estaremos investigando fatores de risco para hipertensão (pressão alta) em mulheres durante a gestação e após o parto. Entre os fatores de risco estão alterações hereditárias da coagulação, e para o diagnóstico é necessária uma amostra de sangue. Necessitamos de pacientes com hipertensão e de pacientes que não tiveram estas complicações. A sua participação é importante para que possamos chegar a conclusões que possam lhe beneficiar ou a outras pacientes em futuras gestações, na necessidade de prevenção da hipertensão e de suas formas mais graves como a pré-eclâmpsia. A sua participação é voluntária, sem prejuízo de seu tratamento, e você tem o direito de se retirar do estudo a qualquer momento, bastando unicamente manifestar a sua vontade. As informações são confidenciais, e as conclusões serão utilizadas para publicação em revista científica.

Para viabilizarmos o estudo é necessário que além de responder a um questionário, sejam coletados 10mL de sangue de uma veia periférica. O volume coletado não tem repercussão sobre seu organismo, e o risco da coleta pode ser a dor da punção, a formação de uma pequena mancha escura na pele (equimose) ou, um sangramento mínimo.

Os resultados dos exames de sangue estarão a sua disposição com a pesquisadora responsável Caroline Abrão Dalmáz, posto 2ºD, setor de internação de alto risco, do Hospital N.S. da Conceição. Se os resultados forem alterados podem ser investigados seus familiares de sangue sem custo nenhum. Favor assinar na linha correspondente a seu nome, se concordar em participar do estudo.

Nome da paciente _____

Assinatura _____

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Pesquisadora responsável: Caroline Abrão Dalmáz