

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética, Ecologia e Evolução
Programa de Pós-graduação em Genética



Dissertação de Mestrado

**Interações gene-gene na via de sinalização induzida pela
visfatina/NAMPT na Farmacogenética da Pré-eclampsia**

Autora: Daniela Alves Pereira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon

Data: 12 de julho de 2019

Local: ICB, Sala I3 236

Belo Horizonte

2019

Daniela Alves Pereira

**Interações gene-gene na via de sinalização induzida pela
visfatina/NAMPT na Farmacogenética da Pré-eclampsia**

Versão final

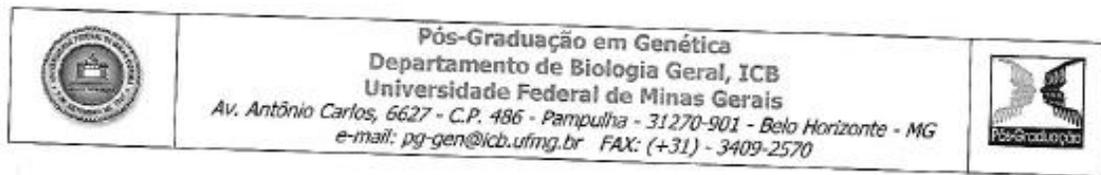
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon

Local: ICB, Sala I3 236

Data: 12 de julho de 2019

- 043 Pereira, Daniela Alves.
Interações gene-gene na via de sinalização induzida pela visfatina/NAMPT na Farmacogenética da Pré-eclampsia [manuscrito] / Daniela Alves Pereira. - 2019.
- 65 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.
1. Genética. 2. Pré-eclampsia. 3. Hipertensão Induzida pela Gravidez - Terapia. 4. Óxido nítrico. 5. Nicotinamida Fosforribosiltransferase. I. Luizon, Marcelo Rizzatti. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título
- CDU: 575

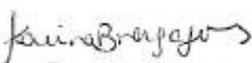


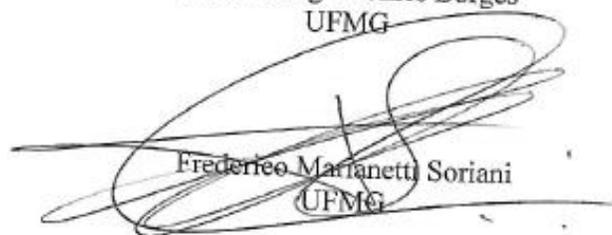
**" Interações gene-gene na via de sinalização induzida pela
 visfatina/NAMPT na Farmacogenética da Pré-eclampsia"**

Daniela Alves Pereira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


 Marcelo Rizzatti Luizon - Orientador
 UFMG


 Karina Braga Gomes Borges
 UFMG


 Frederico Marianetti Soriani
 UFMG

Belo Horizonte, 12 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desse trabalho não teria sido possível sem o empenho de diversas pessoas. Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo e para meu crescimento como profissional e pessoa.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Rizzatti Luizon, por todos os ensinamentos passados, todas as horas dedicadas ao meu aprendizado e crescimento, pelas trocas de experiências e vivências e pela paciência e carinho ao longo desses dois anos de convívio. Aos Professores Karina Braga Gomes Borges e Renan Pedra de Souza, que estiveram na minha banca de avaliação ao término do primeiro ano de mestrado e contribuíram de forma substancial para a conclusão desse trabalho e para meu crescimento como pesquisadora.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório do Prof. Marcelo e também aos alunos do Prof. Francisco Lobo, que estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos durante os dois anos de desenvolvimento desse trabalho e sem os quais, com certeza, eu teria grandes dificuldades de chegar até o final.

Obrigada a Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do ICB e seus funcionários, professores e secretárias, e a CAPES, pela bolsa a mim concedida.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, Bernadete e Francisco, à minha irmã, Patrícia, minha avó Conceição e a todos meus familiares e amigos mais próximos que estiveram ao meu lado em cada um dos momentos durante essa caminhada. Essa dissertação é de todos vocês!

SUMÁRIO

1. Resumo	1
2. Abstract	2
3. Introdução	3
3.1. Fisiopatologia da Pré-eclampsia (PE) e a disfunção endotelial	3
3.2. Nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT): Na gestação normal e na pré-eclampsia ..	6
3.3. O papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	8
3.4. Óxido nítrico (NO) e a pré-eclampsia (PE)	10
3.5. Polimorfismos em genes induzidos pela via da visfatina/NAMPT	13
3.5.1 Nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT)	13
3.5.2 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	14
3.5.3. Sintase endotelial do óxido nítrico (NOS3)	15
3.6. Interações entre polimorfismos genéticos na via de sinalização da visfatina/NAMPT	16
3.7. Farmacogenética e a pré-eclampsia	19
4. Justificativa	21
5. Objetivo Geral	23
6. Objetivos específicos	23
7. Metodologia	24
7.1. Seleção das participantes, coleta e processamento das amostras	24
7.2. Critérios de diagnóstico e de responsividade à terapia anti-hipertensiva	24
7.3. Genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único	25
7.4. Determinação das concentrações dos marcadores bioquímicos	27
7.5. Determinação dos níveis plasmáticos de nitrito (NO ₂ ⁻)	27
7.6. Análise estatística dos resultados	27
7.7. Interações gene-gene pelo método <i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>	28
8. Resultados e discussão	31

8.1. Distribuição dos níveis de visfatina/NAMPT, nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA em gestantes do grupo controle e PE	32
8.2. Correlação entre níveis de visfatina/NAMPT, nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA em gestantes do grupo controle, PE e subgrupos de PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva	35
8.3. Interações entre polimorfismos de <i>NAMPT</i> e <i>VEGF</i> com diferentes concentrações plasmáticas de nitrito em pacientes controle, com PE e subgrupos responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva	40
8.4. Interações entre polimorfismos de genes relacionados à via induzida pela visfatina (<i>NAMPT</i>) quando comparados os grupos controle e PE e subgrupos responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva	45
9. Conclusão	51
10. Referências	52
11. Anexo I	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Algumas das ações biológicas da visfatina/NAMPT	7
FIGURA 2	Papel do VEGF na disfunção endotelial na pré-eclampsia	10
FIGURA 3	Simplificação da atividade da eNOS	12
FIGURA 4	Modelo de interação para polimorfismos de VEGF e MMP-9	18
FIGURA 5	Vias de sinalização que medeiam a proliferação e migração celular endotelial induzida pela visfatina/NAMPT	19
FIGURA 6	Resumo das etapas envolvidas na implementação do método <i>Multifactor Dimensionality Reduction</i> (MDR)	29
FIGURA 7	Boxplots de comparação entre as médias e medianas de (A) visfatina/NAMPT, (B) nitrito plasmático, (C) sFLT-1 e (D) ADMA nos grupos controle e PE	33
FIGURA 8	Teste de correlação de Spearman entre os níveis de visfatina/NAMPT e nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA entre os grupos de gestantes normotensas (grupo controle) e gestantes com PE respectivamente	36
FIGURA 9	Teste de correlação de Spearman entre visfatina/NAMPT e nitrito plasmático e sFLT-1 entre os grupos de pacientes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva, respectivamente	38
FIGURA 10	Efeito dos polimorfismos de <i>NAMPT</i> rs1319501 T>C (A e B) e rs3801266 A>G (C e D) nos níveis de nitrito plasmático	41
FIGURA 11	Efeito dos polimorfismos de <i>VEGF</i> rs2010963 G>C, rs699947 C>A e rs1570360 G>A nos níveis de nitrito plasmático	43
FIGURA 12	Análise de interação gene-gene quando comparados os grupos controle e PE	46
FIGURA 13	Análise de interação gene-gene quando comparados os grupos de gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1	Critérios de responsividade à terapia anti-hipertensiva na hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia	25
TABELA 1	Polimorfismos genéticos funcionais (SNPs) selecionados	26
TABELA 2	Características clínicas e demográficas das pacientes controle x pré-eclâmpsia	31
TABELA 3	Características demográficas das pacientes responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva	32
TABELA 4	Modelo de interação do MDR robusto entre polimorfismos de <i>VEGF</i> , <i>NOS3</i> e <i>NAMPT</i> em pacientes com PE e grupo controle	46
TABELA 5	Modelo de interação do MDR robusto entre polimorfismos de <i>VEGF</i> , <i>NOS3</i> e <i>NAMPT</i> em gestantes com pré-eclâmpsia responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva	48

LISTA DE ABREVIATURAS

24 h Pr	Poteinúria de 24h
χ^2	Qui-quadrado
μL	Microlitro
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ADAM17	Domínio 17 da metaloproteinase Uma Proteína Desintegrina e Metaloproteinase
ADAMTS	Uma Desintegrina e Metaloproteinase com Motivos de Trombospondina
Akt	Proteína quinase B
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Transaminase glutâmico oxalacética
ATP	Trifosfato de adenosina
BH4	Tetra-hidrobiopterina
cGMP	Monofostato cíclico de guanosina
ChIP-seq	Imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento
CI	Intervalo de confiança
CVC	<i>Cross-validation consistency</i>
DDAH-1/2	Dimetilarginina dimetilaminohidrolase
dbSNP	Banco de Dados de Polimorfismos de nucleotídeo único
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
eNOS	Sintase endotelial do óxido nítrico
ET-1	Endotelina-1
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitro
GWAS	Estudos de associação genômica ampla
h	Hora
Hb	Concentração de hemoglobina
Hct	Hematócrito
IGC	Idade gestacional na coleta
IGN	Idade gestacional ao nascer
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
KDR	Receptor do domínio quinase
Kg m^{-2}	Quilograma por metro quadrado
L-NAME	N^{ω} -nitro-arginina-metil-ester
MAF	Frequência do alelo menos comum
MDR	<i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>

mg	Miligrama
mg/dL	Miligramas por decilitro
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mmHG	Milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteases de Matriz Extracelular
NA	Ácido nicotínico
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAMPT	Nicotinamida fosforibosiltransferase
NK	<i>Natural Killer</i>
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nNOS	Sintase do óxido nítrico neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NOS3	Sintase endotelial do óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pré-eclampsia
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PIGF	Fator de crescimento placentário
ROS	Espécies reativas de oxigênio
sEng	Endoglina solúvel
sFLT-1	Receptor tirosina quinase 1 solúvel semelhante a fms
sGC	Guanilato ciclase solúvel
siRNA	<i>Short intronic repeat RNA</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz extracelular
U/L	Unidades por litro
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR 1/2	Receptores 1 e/ou 2 do Fator de crescimento endotelial vascular
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>

1. RESUMO

A pré-eclampsia (PE) é a maior causa de morbimortalidade materno-fetal e seu diagnóstico inclui hipertensão induzida pela gestação e outros critérios clínicos, que pode ser proteinúria. A terapia anti-hipertensiva prolonga a gestação e diminui desfechos adversos. Porém, 40% das gestantes não respondem à essa terapia e são associadas aos desfechos clínicos mais graves. Na PE ocorre placentação anormal, isquemia da placenta e liberação dos fatores tirosina quinase-1 solúvel (sFLT-1) e endoglinta solúvel, o que leva a baixa biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e resulta em disfunção endotelial. A visfatina/Nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT) induz a produção endotelial de NO e é um potencial biomarcador de disfunção endotelial. Nosso objetivo foi examinar as correlações entre os níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT, nitrito (marcador da formação endógena de NO), sFLT-1 e ADMA de 205 gestantes com PE (incluindo subgrupos de responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva) e 203 do grupo controle, se polimorfismos de *NAMPT* e *VEGF* afetam os níveis de nitrito, e caracterizar interações entre polimorfismos de *NAMPT*, *NOS3* e *VEGF* nestes grupos. Os genótipos foram determinados por ensaios de discriminação alélica Taqman. Os níveis de nitrito foram mensurados por ensaio de quimioluminescência, e os de visfatina/NAMPT, sFLT-1 e ADMA por ELISA, e analisados por testes de correlação de Spearman. As análises de interação gene-gene foram feitas pelo programa *Multifactor Dimensionality Reduction*. No grupo PE, os níveis de visfatina/NAMPT tiveram correlação negativa com nitrito ($r=-0,257$, 95% CI=-0,477/-0,007, $P=0,038$) e positiva com sFLT-1 ($r=0,326$, 95% CI=-0,084/0,532, $P=0,007$). No grupo controle, os níveis de visfatina/NAMPT tiveram correlação positiva com nitrito ($r=0,317$, 95% CI=0,110/0,497, $P=0,002$) e negativa com sFLT-1 ($r=-0,340$, 95% CI=-0,592/-0,027, $P=0,029$). Em gestantes com PE não responsivas à terapia anti-hipertensiva, os níveis de visfatina/NAMPT e nitrito tiveram correlação negativa ($r=-0,376$, 95% CI=-0,643/-0,026, $P=0,031$), e os genótipos TC+CC do polimorfismo rs1319501 de *NAMPT* foram associados aos menores níveis de nitrito plasmático. Foram detectadas interações entre genótipos dos polimorfismos rs1319501 de *NAMPT* e rs2010963 de *VEGF* na comparação dos grupos controle e PE ($P=0,001$), e entre genótipos dos polimorfismos VNTR 27pb do *NOS3* e rs2010963 do *VEGF* na comparação de gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva ($P=0,013$). Nossos achados sugerem um efeito inibitório da visfatina/NAMPT na formação de NO em PE e no grupo de gestantes não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Além disso, que interações gene-gene na via da visfatina/NAMPT podem afetar o risco e a responsividade à terapia anti-hipertensiva em PE.

Palavras chave: Pré-eclampsia, Terapia anti-hipertensiva, Óxido nítrico (NO), Visfatina/NAMPT, Interações gene-gene.

2. ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a major cause of maternal and perinatal morbidity/mortality, and is characterized by pregnancy-induced hypertension and other clinical criteria, including proteinuria. Antihypertensive therapy prolongs gestation and decreases adverse outcomes. However, 40% of pregnant are nonresponsive to antihypertensive therapy and associated with adverse outcomes. Abnormal placentation and placental ischemia occur in PE, followed by the release of soluble tyrosine kinase-1 (sFLT-1) and soluble endoglin, which leads to low nitric oxide (NO) bioavailability and results in endothelial dysfunction. Visfatin/Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) favors endothelial NO production, and is a potential biomarker of endothelial dysfunction. In this study, we examined correlations between the plasma levels of visfatin/NAMPT, nitrite (marker of endogenous NO formation), sFLT-1 and ADMA in 205 pregnant with PE (including responsive and nonresponsive to antihypertensive therapy) and 203 of control group, whether *NAMPT* and *VEGF* polymorphisms affect plasma nitrite levels, and characterized gene-gene interactions. Genotypes were determined by Taqman allelic discrimination assays. Plasma nitrite levels were measured by ozone-based chemiluminescence assay, and visfatin/NAMPT, sFLT-1 and ADMA by ELISA, which were analyzed by Spearman's correlation tests. Gene-gene interactions were characterized using Multifactor Dimensionality Reduction. In pregnant with PE, visfatin/NAMPT levels were negatively correlated to nitrite ($r=-0.257$, 95% CI= $-0.477/-0.007$, $P=0.038$), and positively correlated to sFLT-1 ($r=0.326$, 95% CI= $-0.084/0.532$, $P=0.007$). In the control group, visfatin/NAMPT were positively correlated to nitrite levels ($r=0.317$, 95% CI= $0.110/0.497$, $P=0.002$) and negatively correlated to sFLT-1 ($r=-0.340$, 95% CI= $-0.592/-0.027$, $P=0.029$). In the subgroup of PE who are nonresponsive to antihypertensive therapy, visfatin/NAMPT and nitrite levels were negatively correlated ($r=-0.376$, 95% CI= $-0.643/-0.026$, $P=0.031$), and the TC+CC genotypes of *NAMPT* polymorphisms rs1319501 were associated with low levels of plasma nitrite. We found interactions between genotypes of *NAMPT* rs1319501 and *VEGF* rs2010963 polymorphisms when compared control group and PE ($P=0.001$), and between genotypes of *NOS3* VNTR 27pb and *VEGF* rs2010963 polymorphisms when compared subgroups of PE who were responsive and nonresponsive to antihypertensive therapy ($P=0.013$). Our findings suggest an inhibitory effect of the visfatin/NAMPT on NO formation in PE and in the subgroup of pregnant with PE who are nonresponsive to antihypertensive therapy. Moreover, our findings suggest that gene-gene interactions in the *NAMPT* pathway may affect both the susceptibility to PE and the responsiveness to antihypertensive therapy in PE.

Keywords: Preeclampsia, Antihypertensive therapy, Nitric Oxide (NO), Visfatin/NAMPT, Gene-gene interactions.

3. INTRODUÇÃO

O diagnóstico da pré-eclâmpsia (PE) é definido por hipertensão após a 20^a semana de gestação e outros critérios clínicos, que pode ou não incluir proteinúria. Na ausência desta, considera-se a associação com trombocitopenia, elevação das enzimas hepáticas, insuficiência renal, edema pulmonar ou surgimento de distúrbios visuais. A hipertensão é definida por pressão sistólica de pelo menos 140 mm Hg, ou diastólica de pelo menos, 90 mm Hg, aferidas em duas ocasiões diferentes, com intervalo de 4 a 6 horas, em pacientes normotensas. A proteinúria é definida como excreção urinária de no mínimo 300 mg em amostra de urina de 24 horas (ACOG *et al.*, 2013).

A PE é a principal causa de morbidade e mortalidade materno-fetal e afeta de 5% a 7% das gestantes, sendo responsável por mais de 70.000 mortes maternas e 500.000 mortes fetais em todo o mundo a cada ano (RANA *et al.*, 2019). A PE está associada a partos prematuros e a um maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares maternas a longo prazo (PHIPPS *et al.*, 2019). Por ser uma patologia exclusiva da gravidez, o único tratamento definitivo é a remoção da placenta, fato que pode levar a nascimentos pré-maturos em muitos casos. A terapia anti-hipertensiva disponível para tratar a PE inclui metildopa, labetalol e nifedipina, mas esses fármacos têm eficácia limitada. Portanto, existe a necessidade da descoberta de novas opções terapêuticas para mulheres com PE que melhorem seus sintomas e sejam seguras para o feto em crescimento (SASSER *et al.*, 2015).

Os fármacos anti-hipertensivos são usados para redução da pressão arterial, prolongar a gestação e diminuir os potenciais desfechos adversos na PE (BERZAN; DOYLE; BROWN; 2014; ABALOS; DULEY; STEYN; 2014). Entretanto, um grande grupo de gestantes não responde à terapia anti-hipertensiva e está associado aos piores parâmetros clínicos, de acordo com critérios de responsividade definidos previamente (LUIZON *et al.*, 2017a; NHBPEP *et al.*, 2000). Nesse contexto, é relevante buscar por formas de prevenção e detecção precoce da PE, pois não existe estratégia preventiva ou terapêutica definitiva, tampouco um biomarcador específico, teste clínico para diagnóstico precoce ou preditivo da gravidade da doença (GUO *et al.*, 2019).

3.1. Fisiopatologia da Pré-eclâmpsia (PE) e a disfunção endotelial

Durante a gravidez normal, os citotrofoblastos invadem a decídua e o miométrio para substituir as células da parede vascular das artérias espiraladas maternas. Esse processo é responsável pela perda da túnica muscular dos vasos, tornando-os grandes, de baixa resistência, para que possam acomodar o aumento do fluxo sanguíneo necessário para suprir o feto. A PE é caracterizada pela falha da remodelação das artérias espiraladas e placentação anormal, onde

os citotroblastos não infiltram a porção das artérias espiraladas que se encontra no miométrio. Desse modo, o calibre das artérias espiraladas permanece pequeno e mantém sua capacidade de constrição, o que resulta em hipoperfusão placentária e hipóxia (revisado em FOLK, 2018). O desenvolvimento apropriado dos trofoblastos é dependente de um balanço de sinais que controlam sua proliferação e diferenciação (CAREY *et al.*, 2014). Embora não se conheça a razão do desenvolvimento anormal da circulação uteroplacentar nas gestantes que desenvolvem PE, fatores vasculares, imunológicos e genéticos foram implicados (ABDALLA *et al.*, 2001).

Uma hipótese proposta sobre o desenvolvimento da PE, é a de que uma resposta imune alterada na gestação precoce leva a placentação anormal seguida por redução da perfusão placentária, isquemia sincitiotroblástica e danos extensivos no endotélio vascular (ROBERTS E HUBEL, 2009). A disfunção endotelial proveniente desses danos causaria uma diminuição na produção e na atividade de agentes vasodilatadores, como a prostaciclina e o óxido nítrico (NO), o que levaria a uma redução do fluxo sanguíneo útero-placentário, com trombose das artérias espiraladas e infarto placentário (SIBAI; DEKKER; KUPFERMINC; 2005). Os extensivos danos vasculares e da hipóxia resultam no aumento exponencial da produção de múltiplas citocinas e fatores de crescimento que culminam nas manifestações clínicas da PE (ROBERTS *et al.*, 2009).

Durante a gravidez ocorrem alterações para manter o sistema imunológico materno tolerante aos antígenos paternos expressos pelo feto, tais como o aumento da produção das interleucinas IL-12 e IL-1 β pelos monócitos, uma maior capacidade para sintetizar IL-8 pelos granulócitos, os linfócitos T não apresentam qualquer característica de ativação e a diminuição da produção de IL-6.

A placenta, por sua vez, por estar em contato direto com o sangue fetal, desempenha um papel importante nos mecanismos da tolerância materna ao feto. Neste processo estão envolvidos vários fatores, incluindo o antígeno HLA-G, um membro do MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) da classe I expresso nas células trofoblásticas. O HLA-G inibe a função das células *Natural Killer* (NK) e a maturação das células dendríticas e desempenha uma função importante na tolerância fetal às células maternas. De fato, na gravidez o HLA-G se expressa também nos monócitos ativados pela IL-10 e pelo interferon γ e protege o feto da rejeição materna, evitando a ação das células NK e dos linfócitos T citotóxicos. Portanto, a resposta imune sofre transformações importantes durante a gestação, de modo a reduzir a atividade inflamatória (SARGENT; BORZYCHOWSKI; REDMAN, 2006)

Na PE, entretanto, ocorre má adaptação das respostas imunes, com resposta inflamatória materna excessiva, resultando na invasão superficial dos trofoblastos, remodelamento defeituoso

da artéria espiral, infarto placentário e liberação de citocinas pró-inflamatórias e fragmentos placentários na circulação sistêmica. Os trofoblastos interagem na decídua com as células NK uterinas, modificando suas citocinas, regulando as moléculas de adesão e as metaloproteinases da matriz. A incapacidade dos trofoblastos para realizar essas mudanças pode ser um fator crítico para o início da PE. Várias citocinas, produzidas na interface materno-fetal, tem impacto na invasão trofoblástica. A deficiência de interleucina IL-10 pode contribuir para o aumento das respostas inflamatórias contra os trofoblastos, provocados, por exemplo, pelo Fator de Necrose Tumoral- α e interferon γ . Conseqüentemente, a alta taxa de apoptose dificulta a capacidade invasiva dos trofoblastos, resultando em transformação defeituosa das artérias espirais, hipóxia, trombose e infarto da placenta (CUBRO *et al.*, 2018).

Antes do início dos sintomas clínicos da PE se observa um aumento da liberação pela placenta de fatores anti-angiogênicos, como a tirosina quinase 1 semelhante a fms (sFLT-1) e endoglina solúvel (sEng) (POWE; LEVINE; KARUMANCHI; 2011). Concomitantemente, estão diminuídos os níveis de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento placentário (PIGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (POWE *et al.*, 2011). Na gestação normal, ocorre a liberação dessas citocinas pró-angiogênicas, que circundam o trofoblasto e atuam na angiogênese e na estabilidade vascular (LI *et al.*, 2001).

A disfunção endotelial sistêmica é característica marcante da PE (ROBERTS *et al.*, 1989). Hipertensão e proteinúria são manifestações clínicas características da PE e colocam o endotélio vascular como seu alvo central. A hipertensão é caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica e por baixa complacência arterial, e a proteinúria provém da lesão renal (POWE *et al.*, 2011). O diagnóstico clínico da PE pode incluir trombocitopenia grave, coagulação intravascular disseminada, descolamento de placenta, e inúmeras implicações de longo prazo (MAYRINK; COSTA; CECATTI; 2018). Entretanto, não existe um biomarcador preditivo ou de diagnóstico para PE. Embora o sFLT-1 seja atualmente usado como auxiliar no diagnóstico, ainda não é possível avaliar se fatores circulantes terão impacto na prática clínica e se ajudarão a melhorar os desfechos maternos e perinatais (ZEISLER *et al.*, 2016; CERDEIRA *et al.*, 2018).

Biomarcadores são parâmetros, incluindo lipídios, peptídeos, ácidos nucléicos, proteínas, cuja presença ou ausência pode ser inequivocadamente associada a processos biológicos específicos ou estágios da doença, possibilitando seu estudo de uma perspectiva quantitativa e/ou qualitativa (NAVAJAS; CORRALES; PARADELA; 2019).

3.2. Nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT) na Gestação normal e na Pré-eclampsia (PE)

O tecido adiposo pode exercer efeitos pleiotrópicos através da produção e secreção de adipocinas (MAZAKI-TOVI *et al.*, 2010), e é reconhecido como um órgão endócrino altamente ativo (CATALANO *et al.*, 2006; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER; 2006). A nicotinamida fosforibosiltransferase, uma adipocina conhecida como visfatina/NAMPT, é um potencial biomarcador de disfunção endotelial vascular em PE (ROMACHO; SÁNCHEZ-FERRER; PEIRÓ, 2013; PAVLOVA; NOVAK; BIENERTOVÁ-VAŠKŮ, 2015). Ela é secretada pelo tecido adiposo visceral (adipócitos e macrófagos infiltrantes), mas também pelo músculo esquelético, fígado, células imunes, cardiomiócitos, cérebro (DAHL *et al.*, 2012), placenta, membranas fetais (OGNJANOVIC; BRYANT-GREENWOOD; 2002) e miométrio (ESPLIN *et al.*, 2005).

A visfatina/NAMPT é encontrada tanto no meio extracelular quanto intracelular, mas seu mecanismo de ação extracelular ainda não é completamente conhecido (DAHL *et al.*, 2012). Ela possui papel na inflamação e na regulação da matriz extracelular e, portanto, tem sido implicada na patogênese e observa-se seu aumento em várias doenças, como insuficiência miocárdica, aterosclerose, distúrbios metabólicos, doenças inflamatórias e distúrbios neurodegenerativos, embora as bases de seus efeitos ainda estejam sendo debatidas (DAHL *et al.*, 2012). Ela também está elevada em pacientes obesos, na resistência à insulina, na diabetes do tipo 2 e em estados pró-inflamatórios (ADYA *et al.*, 2007). A visfatina/NAMPT também tem papel contra a apoptose, o que a torna um potencial alvo para o tratamento do câncer (HASMANN e SCHEMAINDA, 2003).

Essa adipocina aumenta a produção de moléculas pró-angiogênicas, como o VEGF e as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), podendo afetar diretamente a contração vascular por induzir o relaxamento dependente do endotélio através do aumento da expressão da eNOS (sintase endotelial do óxido nítrico), responsável pela produção do NO nesse tecido, e da produção do próprio NO (ADYA *et al.*, 2007). No entanto, a visfatina/NAMPT mostrou também prejudicar o relaxamento dependente do endotélio através da ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (VALLEJO *et al.*, 2011). Nos últimos anos, a visfatina/NAMPT tem sido relatada como uma molécula com múltiplas ações biológicas, algumas delas estão sintetizadas na **Figura 1** (modificada de ROMACHO; SÁNCHEZ-FERRER; PEIRÓ, 2013).

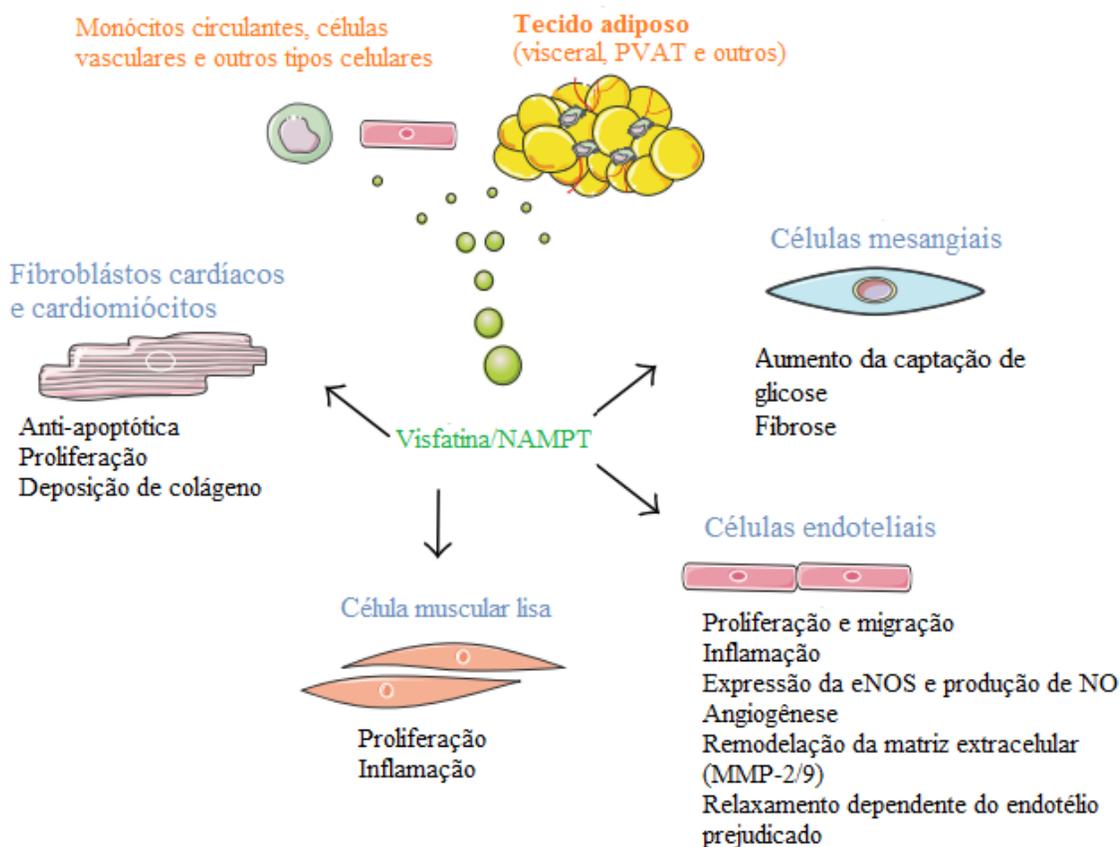


Figura 1: Algumas das ações biológicas da visfatina/NAMPT. Resumo de ações diretas da visfatina/NAMPT nas células do sistema cardiovascular. Abreviações: eNOS, Sintase endotelial do óxido nítrico; MMP-2/9, metaloproteinases de matriz extracelular-2/9; NO, óxido nítrico; PVAT, tecido adiposo perivascular. (Adaptado de ROMACHO; SÁNCHEZ-FERRER; PEIRÓ, 2013. Tradução da autora).

A visfatina/NAMPT foi inicialmente proposta como marcador clínico de aterosclerose, disfunção endotelial e dano vascular. Além disso, ela também promove a inflamação vascular e a aterosclerose, com efeito na secreção de citocinas e quimiocinas, sobrevivência de macrófagos, recrutamento de leucócitos pelas células endoteliais, na inflamação do músculo liso vascular e na desestabilização da placa aterosclerótica (ROMACHO; SÁNCHEZ-FERRER; PEIRÓ, 2013).

Na gestação, as adipocinas podem desempenhar um papel na invasão trofoblástica e placentação bem-sucedida, que requer angiogênese adequada (TERSIGNI *et al.*, 2011). Os maiores níveis de visfatina no plasma materno são atingidos entre 19 e 26 semanas de gestação (MAZAKI-TOVI *et al.*, 2009). No entanto, a obesidade materna e fatores relacionados à obesidade aumentam o risco de desenvolvimento de PE (O'BRIEN; RAY, CHAN, 2003; SPRADLEY; PALEI;

GRANGER, 2015), e a desregulação das adipocinas pode estar associada à disfunção endotelial presente na PE (LEE *et al.*, 2009; MORI *et al.*, 2010).

A maioria dos estudos mostrou aumento nos níveis séricos de visfatina/NAMPT em PE, mas os achados sobre concentrações maternas de visfatina/NAMPT circulante na PE são contraditórios (HU *et al.*, 2008; FASSHAUER *et al.*, 2008; ADALI *et al.*, 2009; ZULFIKAROGLU *et al.*, 2010; MAZAKI-TOVI *et al.*, 2010). Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel da visfatina na PE.

A fisiopatologia da PE não está completamente conhecida, o que dificulta o estudo de genes candidatos, como o *NAMPT*. Além disso, a PE é uma doença complexa e é provável que um único gene ou variante não seja capaz de explicar todos os casos de PE (WILLIAMS E MORGAN, 2012). Nesse contexto, é plausível examinar os genes inclusos na via da visfatina/NAMPT para uma melhor compreensão do componente multifatorial da doença.

3.3. O papel do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Na gestação normal, fatores de crescimento angiogênicos desempenham papel central no desenvolvimento vascular fetal e placentário. O VEGF é um importante fator de crescimento específico para células endoteliais e expresso em numerosos tecidos, incluindo a placenta (BRENNAN; MORTON; DAVIDGE; 2014). Ele promove a angiogênese pela ligação com dois receptores do tipo tirosina quinase, o VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR) (FERRARA; GERBER; LECOUTER; 2003) e sua expressão é induzida por vários fatores de crescimento (DEROANNE *et al.*, 1997; PERTOVAARA *et al.*, 1994), citocinas inflamatórias (COHEN *et al.*, 1996; JUNG *et al.*, 2001; REGA *et al.*, 2007) e hipóxia (SHWEIKI *et al.*, 1992).

No início da gestação, o VEGF modula o desenvolvimento vascular e a permeabilidade no endométrio, assim como na placenta e no embrião. Além disso, o VEGF foi encontrado no soro de mulheres ao longo da gestação e, por induzir a produção de NO e prostaciclina (PGI₂) pelas células endoteliais, acredita-se que ele desempenhe um papel na modificação da vasculatura sistêmica materna (BRENNAN *et al.*, 2014). A depleção de um único alelo do *VEGF* resulta em vasculatura placentária anormal com morte de embriões de camundongo na faixa de 10 a 12 dias (FERRARA *et al.*, 1996). Além do seu papel central na vasculogênese e angiogênese placentária e embrionária, o VEGF está envolvido na sobrevivência das células endoteliais e homeostase vascular em vasos e tecidos maduros (MAHARAJ *et al.*, 2006). A inibição do VEGF *in vivo* leva a desordens em vários órgãos com endotélio fenestrado, fenótipo observado na PE. Em camundongos, o *knockout* do *VEGF* no início da vida pósnatal resulta em proteinúria,

síndrome nefrótica e endoteliose, similares as clássicas lesões renais observadas na PE (EREMINA *et al.*, 2003).

O VEGF tem um efeito vasodilatador na vasculatura sistêmica, mediado pelo relaxamento dependente de NO, devido a super regulação de NO e prostaciclina nas células endoteliais (POWE *et al.*, 2011). Um estudo em camundongos sugere um papel do VEGF no controle da pressão sanguínea sistêmica, uma vez que o antagonismo do KDR leva a elevações na média da pressão arterial por um mecanismo dependente de NO (FACEMIRE *et al.*, 2009).

O fator de crescimento placentário (PlGF), um homólogo do VEGF expresso na placenta que também possui atividade pró-angiogênica (MAGLIONE *et al.*, 1991) se liga exclusivamente ao receptor Flt-1 (PARK *et al.*, 1994). Camundongos com o receptor Flt-1 sem o domínio tirosina quinase possuem vasos sanguíneos normais e sobrevivem, mostrando que o Flt-1 atua como regulador negativo da angiogênese através do sequestro do VEGF extracelular, e não por ação intracelular (HIRATSUKA *et al.*, 1998).

Na PE, os níveis circulantes e placentários da forma solúvel do receptor Flt-1 (sFLT-1) estão aumentados, o que leva a diminuição do VEGF e PlGF livres circulantes e impede sua biodisponibilidade para estimular a angiogênese e manter a integridade endotelial (**Figura 2**). Nos rins, essa inativação da forma livre do VEGF é possivelmente a causa de endoteliose e proteinúria (MUTTER E KARUMANCHI, 2008; WANG; RANA; KARUMANCHI; 2009), desfechos observados na PE. Estudos em cultura de células e tecido placentário *in vitro* demonstraram que a regulação do sFLT-1 é realizada pelas vilosidades placentárias e trofoblastos em resposta a reduções de tensões de oxigênio, similar as observadas em isquemia placentária (GILBERT *et al.*, 2008; MUTTER E KARUMANCHI, 2008; WANG *et al.*, 2009).

Em modelos animais de PE, outros estudos demonstraram que a restauração dos níveis de VEGF livre resulta na melhora significativa da função renal e da pressão sanguínea. O uso de VEGF recombinante em ratos com isquemia placentária reestabelece a filtração glomerular e a função endotelial, resultando em redução da alta pressão arterial associada à isquemia placentária (GILBERT *et al.*, 2010).

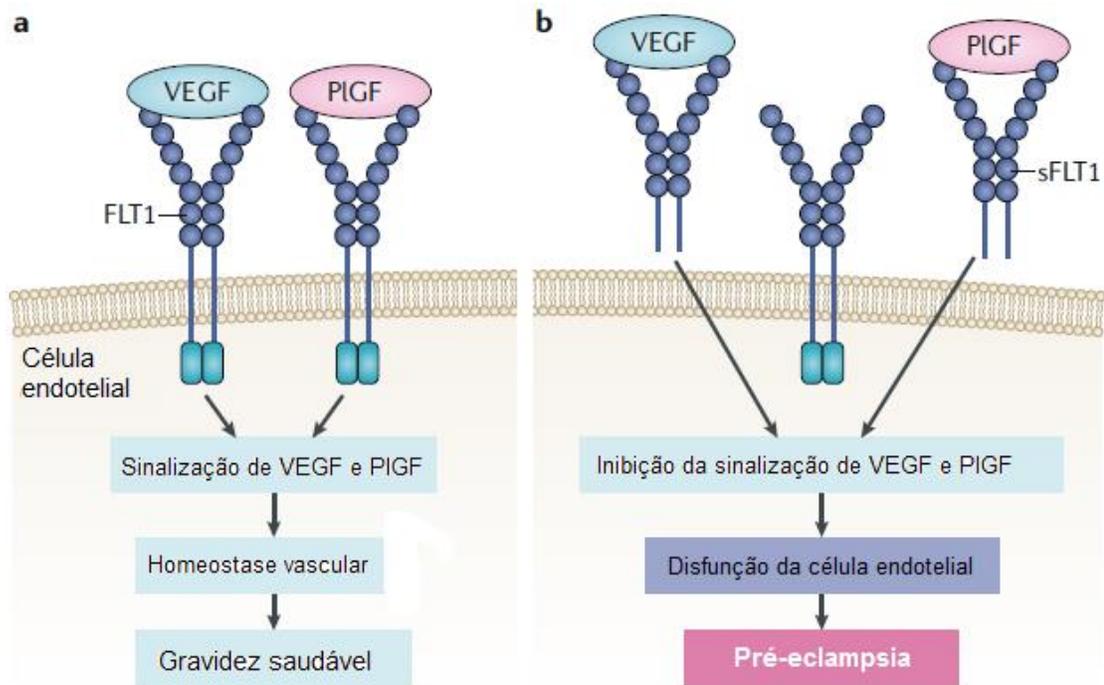


Figura 2: Papel do VEGF na gravidez normal e na disfunção endotelial na pré-eclâmpsia.

A) Na gestação normal, a homeostase vascular é mantida pelos níveis fisiológicos do VEGF e PlGF pelas ligações com o receptor FLT1 e outros receptores de sinalização. **B)** Na PE, o excesso do FLT-1 solúvel (sFLT-1), secretado pela placenta, se liga ao VEGF e ao PlGF circulantes, resultando na inibição das suas vias de sinalização e culminando em disfunção endotelial e redução da produção de prostaciclina e óxido nítrico (Adaptado de PHIPPS *et al.*, 2019. Tradução da autora).

3.4. Óxido nítrico (NO) e a Pré-eclâmpsia (PE)

O NO é um gás, um fator de relaxamento endógeno derivado do endotélio e um importante sinalizador intracelular e extracelular. Em condições fisiológicas, a liberação de NO na circulação placentária dilata o leito vascular placentário fetal e dá aporte a troca materno-fetal de oxigênio e nutrientes. O aumento na concentração de NO ocorre com a idade gestacional, o que sugere que ele tenha papel importante nas alterações cardiovasculares durante a gravidez normal (revisado em MANNAERTS *et al.*, 2018).

Os principais sintomas da PE envolvem a vasculatura e pacientes com PE demonstram disfunção endotelial com vasodilatação dependente do endotélio prejudicada, mas sem alteração da vasodilatação independente das células endoteliais (POWE *et al.*, 2011). Nesse contexto, as vias de sinalização mediadas pelo NO tem um papel chave na homeostase vascular devido ao

seu papel importante como regulador do tônus vascular, da pressão arterial, proliferação celular, adesão leucocitária e agregação plaquetária (FORSTERMANN e MUNZEL, 2006).

O NO é sintetizado por três isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS), que são codificadas por três genes: NOS neuronal, nNOS (codificada pelo *NOS1*), NOS induzível, iNOS (codificada pelo *NOS2*) e a NOS endotelial, eNOS (codificada pelo *NOS3*), a principal NOS no sistema vascular. Enquanto que as isoformas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente, a forma induzível (iNOS) é regulada por condições pró-inflamatórias e estresse oxidativo (FARAH; MICHEL; BALLIGAND; 2018).

A eNOS é responsável pela síntese do NO pela conversão de L-arginina para L-citrulina, com transferência de elétrons pela forma reduzida da NADPH. A tetra-hidrobiopterina (BH₄), dinucleótido de flavina e adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) e calmodulina são cofatores necessários para a atividade catalítica da eNOS (VANHOUTTE *et al.*, 2017) (**Figura 3**). Como as NOS utilizam o aminoácido L-arginina como substrato, um importante inibidor da via arginina-NO é a dimetilarginina assimétrica (ADMA), uma forma metilada da L-arginina que inibe as atividades da nNOS e da eNOS, reduzindo a produção de NO endotelial (AZEVEDO *et al.*, 2017). De acordo com sua ação, níveis elevados de ADMA foram reportados em mulheres com PE (SPEER *et al.*, 2008; SAVVIDOU *et al.*, 2003; DEMIR *et al.*, 2012).

A atividade da eNOS inclui controles pós-traducionais, como fosforilação, acetilação, interações proteína-proteína, S-nitrosilação e S-glutationilação. O principal mecanismo de ativação da eNOS é a fosforilação do aminoácido serina na posição 1177 mediada pela enzima Akt-quinase, uma via dependente da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K), que aumenta a sensibilidade da eNOS às concentrações basais de Ca⁺⁺/calmodulina (BOO *et al.*, 2006; FULTON *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação do NO envolvem o aumento do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) pela ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) e outras moléculas da via, o que resulta em diminuição da pressão arterial, inibição da agregação plaquetária e vasodilatação (EMDIN *et al.*, 2018). O NO também previne a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, adesão e migração de macrófagos, liberação e ação do potente vasoconstritor endotelina 1 (ET-1) e tem papel fundamental contra a aterosclerose (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

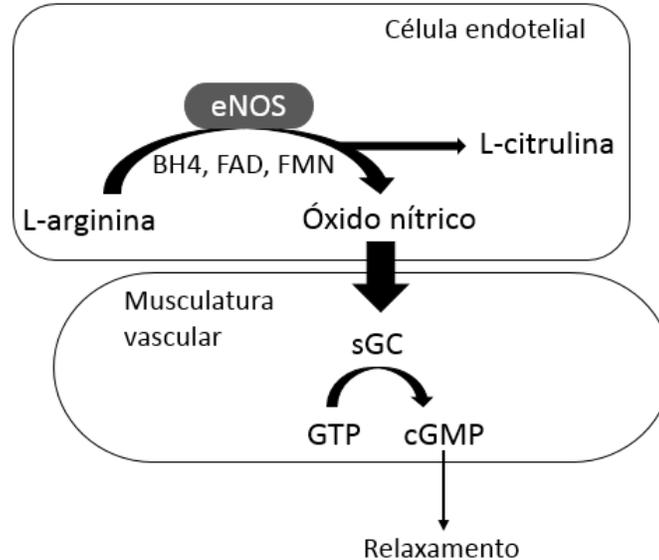


Figura 3: Simplificação da atividade da eNOS. A eNOS catalisa conversão da L-arginina para gerar NO. O NO reage com guanilato ciclase solúvel (sGC) e promove a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), resultando em relaxamento do músculo liso vascular. BH4: tetraidrobiopterina; FAD: dinucleótido de flavina e adenina; FMN: mononucleótido de flavina (Adaptado de ZHU et al., 2016).

Durante a gestação, mudanças importantes acontecem na dinâmica cardiovascular materna. Essas modificações vão incluir, o aumento do volume sanguíneo e do débito cardíaco, entretanto, sem o aumento da pressão arterial, sendo a dilatação sistêmica induzida por NO um dos motivos responsáveis pela ausência do aumento da pressão durante a gestação normal (SANDRIM *et al.*, 2008a).

A disfunção endotelial ocorre quando as células endoteliais perdem ou reduzem sua capacidade de liberar NO, um passo inicial reconhecido para a aterosclerose (DAVIGNON E GANZ; 2004; FÖRSTERMANN; XIA; LI; 2017).

Uma formação prejudicada de NO foi descrita em doenças hipertensivas gestacionais, incluindo a PE (KUBLICKIENE *et al.*, 2000; SAVVIDOU *et al.*, 2003; GARCÍEA *et al.*, 2007). Em PE, os fatores antiangiogênicos sFLT-1 e sEng presentes na circulação materna atuam na redução da biodisponibilidade de NO (revisado em SANDRIM *et al.*, 2008a). Além dos fatores antiangiogênicos sFLT-1 e sEng, o aumento das concentrações do ânion superóxido (O_2^-), também presente na PE elimina o NO produzido para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), o que reduz ainda mais sua biodisponibilidade e causa danos às células endoteliais. A gestação normal está associada a um quadro de estresse oxidativo devido ao aumento do metabolismo materno e a atividade metabólica da placenta. Portanto, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

pela placenta está aumentada, mas é contrabalanceada por antioxidantes. Entretanto, na PE os níveis de antioxidantes pode ser baixo demais para contrabalancear o aumento da produção de ROS (CHEN E KHALIL; 2017).

Nesse contexto, se mostra evidente que a deficiência de NO durante a PE pode estar envolvida no processo da doença. A inibição crônica da eNOS, em ratas grávidas, pelo uso do análogo e antagonista da L-arginina, L-NAME (N^w-nitro-arginina-metil-ester), produziu hipertensão associada a vasoconstrição renal e periférica, proteinúria, restrição do crescimento intrauterino e aumento da morbidade fetal, um padrão semelhante aos da PE (DENG; ENGELS; BAYLIS; 1996, GILBERT *et al.*, 2008, LAMARCA; GILBERT; GRANGER; 2008).

3.5. Polimorfismos em genes induzidos pela via da visfatina/NAMPT

3.5.1 - Nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT)

Polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) são mudanças de um nucleotídeo em que um dos alelos apresenta frequência maior do que 1% em uma população. Normalmente existem apenas dois alelos em um SNP, por exemplo, um A ou um T e milhões de sítios de SNPs já foram identificados no genoma humano (KITTS *et al.*, 2014).

Os SNPs do gene *NAMPT* podem ser capazes de afetar os níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT. Nesse contexto, nosso grupo mostrou que os SNPs rs1319501 T>C e rs3801266 A>G, localizados na região promotora e no intron 1 do gene de *NAMPT*, respectivamente afetam os níveis circulantes de visfatina/NAMPT em gestantes saudáveis e em PE (LUIZON *et al.*, 2015). Os resultados mostraram que o alelo C e o genótipo CC do polimorfismo rs1319501 do gene *NAMPT* e o haplótipo que combina os alelos C e A destes SNPs, respectivamente, foram mais frequentes no grupo de gestantes controle quando comparado ao grupo com PE. Além disso, o mesmo haplótipo C, A foi marginalmente associado ($P=0.062$) ao grupo de pacientes com PE com menores níveis plasmáticos de visfatina (LUIZON *et al.*, 2015).

Os resultados do estudo de associação mostraram que o alelo C e o genótipo CC do polimorfismo rs1319501 do gene *NAMPT* e o haplótipo que combina os alelos C e A destes SNPs, respectivamente, foram mais frequentes no grupo de gestantes controle quando comparado ao grupo com PE. (LUIZON *et al.*, 2015). Menores níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT poderiam levar a não indução da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/Akt (PEIRÓ *et al.*, 2010). Adicionalmente, poderiam estar associados a uma menor indução do receptor 2 do VEGF (ADYA *et al.*, 2007) e a consequente não fosforilação da serina 1177 da eNOS pela Akt, o que leva a diminuição da síntese de NO.

Entretanto, o presente trabalho nós correlacionamos os níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT com o sFLT-1, ADMA e nitrito plasmático em gestantes do grupo controle, gestantes com PE e nos subgrupos de gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Além disso, examinamos o efeito de polimorfismos de *NAMPT* nas concentrações plasmáticas de nitrito nos mesmos grupos de gestantes, e caracterizamos as possíveis interações de genótipos de polimorfismos de genes induzidos pela via da visfatina/*NAMPT* entre os grupos, no intuito de elucidar a contribuição da visfatina/*NAMPT* na susceptibilidade à PE.

3.5.2 - Fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*)

A expressão e atividade do *VEGF* são reguladas tanto em nível transcricional como translacional e alguns dos mecanismos que regulam e modulam sua expressão já foram citados anteriormente. Um vez que a perda de um único alelo do *VEGF* resulta em anomalias cardiovasculares e desenvolvimento vascular defeituoso, vários polimorfismos do *VEGF* foram descritos e associados à predisposição ao desenvolvimento de algumas doenças (GONÇALVES *et al.*, 2010).

O *VEGF* possui papéis importantes na manutenção da integridade de vários órgãos afetados durante a PE, além de modular o tônus vascular, suprimir a apoptose endotelial e inibir a agregação plaquetária. Sendo importante ressaltar que a PE está associada a uma expressão alterada de membros da família do *VEGF* e de seus receptores (SANDRIM *et al.*, 2008b).

A associação dos SNPs rs2010963 G>C, rs699947 C>A e rs1570360 G>A localizados no promotor do gene *VEGF* com PE foi examinada e foi observado que o genótipo AA do SNP rs699947 e o GG do SNP rs2010963 foram mais frequentes no grupo de gestantes brancas saudáveis quando comparado à PE. Considerando-se o mesmo grupo de gestantes brancas, foram encontradas diferenças significativas na frequência dos haplótipos desses polimorfismos quando comparando entre os grupos. O haplótipo C-G-C combinando os polimorfismos rs699947, rs1570360 e rs2010963, respectivamente foi menos comum no grupo de PE em comparação com o grupo de gestantes saudáveis (SANDRIM *et al.*, 2008b). Estando esse haplótipo associado a níveis mais altos de *VEGF* (LAMBRECHTS *et al.*, 2003; PRIOR *et al.*, 2006). Banyasz e colaboradores (2006), também mostrou que a progressão da PE é afetada pela presença do polimorfismo rs699947. Já foi mostrado também que portadores do genótipo CC do polimorfismo rs699947 C>A ou GG do polimorfismo rs1570360 G>A estão associados a produção significativamente maior de *VEGF* comparado com portadores dos seus genótipos com duas

cópias do alelo de menor frequência (SHAHBAZI et al., 2002). Entretanto o papel de genótipos e haplótipos de *VEGF* na susceptibilidade e progressão da PE ainda precisam ser elucidados.

3.5.3 – Sintase endotelial do óxido nítrico (*NOS3*)

O gene *NOS3* possui 3794 variações de sequência, incluindo SNPs, inserções/deleções, *variable number tandem repeat* (VNTR) e microssatélites. Entre eles, os SNPs rs2070744 T>C, rs3918226 C>T e rs1799983 Glu298Asp e um VNTR no intron 4 foram associados a várias doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão, doença arterial coronariana, complicações diabéticas e acidente vascular cerebral. Esses polimorfismos da *NOS3* podem afetar a produção de NO e foram estudados devido às suas implicações funcionais (Revisado em LUIZON; PEREIRA; TANUS-SANTOS; 2018).

Um estudo *in vitro* indica que a substituição de uma Timina por uma Citosina pelo SNP mais estudado no gene *NOS3* (rs2070744) reduz cerca de 50% a atividade transcricional do gene, sendo esse efeito provavelmente devido a maior ligação da proteína de replicação A1 que atua como uma proteína repressora do gene (MIYAMOTO et al., 2000).

Outro polimorfismo muito estudado do *NOS3* é um VNTR localizado no intron 4 com repetições de 27 pares de base. Os alelos mais comumente encontrados apresentam quatro cópias (variante a, mais rara) ou cinco cópias (variante b, mais comum). Esse VNTR regularia a expressão do *NOS3* pela formação de sirRNAs (*short intronic repeat RNA*), onde as células endoteliais que contêm cinco cópias apresentam maiores quantidades de sirRNA e menores níveis de mRNA do *NOS3* do que as que contêm quatro cópias (ZHANG et al., 2008), o que poderia explicar a associação desse polimorfismo com doenças cardiovasculares (revisado em SILVA et al., 2011).

Uma meta-análise mostrou que o genótipo CC do rs2070744 foi associado a um risco aumentado de PE em comparação aos genótipos CT + TT, mas nenhuma associação para o VNTR 4b/a (ZENG et al. 2016). Entretanto, outra meta-análise mostrou que o alelo a do VNTR 4b/a foi associado a um alto risco de PE (DAI et al., 2013). Um estudo realizado com uma amostra da população brasileira mostrou maior frequência do alelo T e do genótipo TT do polimorfismo rs2070744 em PE tardia quando comparado com PE precoce (idade gestacional de aparecimento de sintomas da PE > ou < 34 semanas, respectivamente) e com gestantes normotensas. O alelo a e o genótipo aa do VNTR b/a também apresentaram frequências mais altas em PE precoce se comparado com PE tardia e gestantes normotensas (ALPOIM et al., 2014).

3.6. Interações entre polimorfismos genéticos na via de sinalização da visfatina/NAMPT

O sucesso da genética humana em identificar mutações em genes únicos que causam doenças humanas raras, como a anemia falciforme, não pode ser aplicado totalmente para doenças comuns que possuem etiologia mais complexa. Tal complexidade pode surgir de fenômenos como a heterogeneidade de locus, fenocópia e a dependência de efeitos genotípicos sobre fatores ambientais (isto é, interações gene-ambiente) e genótipos em outros loci (isto é, interações gene-gene ou epistasia) (MOORE, 2010).

A partir dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na PE, mais de 70 genes candidatos foram selecionados, incluindo proteínas vasoativas, trombofílicas, que participam do processo de estresse oxidativo, mediadoras imunes e inflamatórias. No entanto, nenhum destes genes candidatos foi dito como gene causal da PE (WILLIAMS E MORGAN, 2012). A maioria dos estudos com abordagens em genes candidatos em PE teve foco em um único ou em alguns polimorfismos genéticos (CHAPPELL; MORGAN; 2006).

Entre os obstáculos encontrados para identificação de variantes que afetam o risco da PE estão a interação entre fatores ambientais e suscetibilidade poligênica e a falta de replicação dos estudos de associação genética (STAINES-URIAS *et al.*, 2012). Entretanto, como a PE é uma doença geneticamente complexa, esse cenário destaca a necessidade de focar em mais de um gene candidato e na interação entre polimorfismos de genes diferentes. De fato, as interações gene-gene foram consideradas um componente importante de doenças complexas, incluindo a PE (WILLIAMS E PIPKIN, 2011). Nesse contexto, métodos tradicionais, como a regressão logística, tem poder limitado para modelar interações não-lineares como as interações gene-gene (MOORE e WILLIAMS, 2002). As limitações do modelo linear e de outros modelos paramétricos motivou o desenvolvimento de novas abordagens computacionais, como o aprendizado de máquina e a mineração de dados.

O *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR) foi desenvolvido como um modelo não paramétrico usado para identificar combinações de fatores genéticos e ambientais discretos que são preditivos de um desfecho clínico, no caso o desenho experimental do tipo caso-controle (MOORE, 2004, 2007). Este método utiliza aprendizado de máquina e mineração de dados para classificar indivíduos saudáveis e portadores de doença afim de detectar interações gene-gene (ou epistasia) em estudos de associação genética do tipo caso-controle (MOORE *et al.*, 2006; MOORE, 2010).

O MDR foi usado para caracterizar interações envolvendo polimorfismos dos genes *NOS3*, *MMP-9* e *VEGF* associados com PE, e o modelo de interação identificado inclui os polimorfismos rs2010963 G>C do *VEGF* e rs3918242 C>T da *MMP-9* (LUIZON *et al.*, 2012). A combinação do genótipo CC do polimorfismo rs3918242 da *MMP-9* com o GG do rs2010963 do *VEGF* foi mais frequente no grupo de gestantes normotensas que no grupo PE, enquanto a combinação do genótipo CC do polimorfismo rs3918242 da *MMP-9* com o CC do rs2010963 do *VEGF* foi mais frequentes no grupo PE (**Figura 4A**). Os potenciais mecanismos subjacentes às interações observadas estão ilustrados na **Figura 4B** (LUIZON *et al.*, 2012).

Em outro estudo, as interações entre polimorfismos de *TIMP-1*, *TIMP-3* e *MMP-9* foram avaliadas pelo MDR comparando gestantes normotensas e com PE. A combinação dos genótipos GG e TG do polimorfismo rs207058 de *TIMP-1* e o genótipo LH do polimorfismo rs322226 da *MMP-9* foi mais frequente em pacientes com PE quando comparado ao grupo controle, enquanto a combinação com o genótipo TT do polimorfismo de *TIMP-1* foi mais frequente em gestantes normotensas do que em PE (LUIZON *et al.*, 2014).

O MDR também é aplicável para estudos de farmacogenômica, onde os grupos comparados são formados pelos indivíduos responsivos ou não responsivos ao tratamento com um determinado fármaco. De fato, achados sobre interações gene-gene na área de farmacogenômica da hipertensão e da PE foram recentemente revisados (LUIZON; PEREIRA; SANDRIM; 2018). Tais achados indicam a relevância de se considerar as interações entre polimorfismos genéticos de diferentes genes candidatos em vias de sinalização que sejam relevantes para a resposta à terapia anti-hipertensiva (LUIZON; PEREIRA; SANDRIM; 2018).

Nesse contexto, outro estudo examinou se interações entre polimorfismos de *NAMPT*, *MMP-2*, *MMP-9* e *TIMP-1* estavam associadas com subgrupos de pacientes com PE divididos de acordo com a resposta à terapia anti-hipertensiva usada em PE (LUIZON *et al.*, 2017a). As combinações dos genótipos GG do SNP rs2070584 de *TIMP-1* T>G com os genótipos AA e AG do SNP rs3801266 A>G de *NAMPT* foram mais frequentes nas pacientes com PE que foram responsivas e não responsivas á terapia anti-hipertensiva, respectivamente. Essas combinações são significativas quando combinadas com o genótipo CC do SNP rs243865 do *MMP-2* (LUIZON *et al.*, 2017a).

A combinação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais pode contribuir para a fisiopatologia da PE. Assim, estudos de interação gene-gene e epigenética podem auxiliar tanto na elucidação da sua fisiopatologia, como na identificação de biomarcadores farmacogenômicos relacionados aos seus processos fisiopatológicos (LUIZON *et al.*, 2017b).

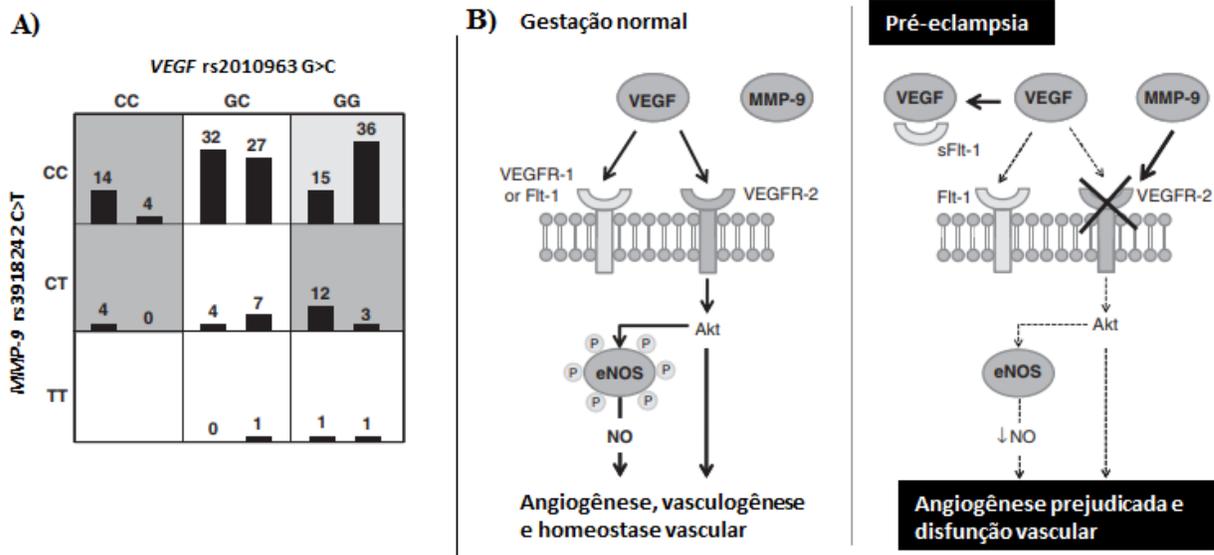


Figura 4: Modelo de interação para polimorfismos de VEGF e MMP-9. **A)** Modelo de interação gerado pelo MDR robusto para polimorfismos de *MMP-9* e *VEGF* comparando gestantes normotensas com PE. As distribuições de casos (barras da esquerda) e controles (barras da direita) são ilustradas para cada combinação de genótipos multilocus. As caselas brancas são rotuladas como desconhecidas, as cinza claras como baixo risco e as cinza escuras como de alto risco. **B)** Interações entre os produtos dos genes *eNOS*, *MMP-9* e *VEGF* na gravidez normal e na PE. Os efeitos do VEGF estão comprometidos devido à ligação do VEGF ao excesso de VEGFR-1 solúvel (sFlt-1) observado na PE, assim como a degradação do domínio extracelular do VEGFR-2 pela MMP-9. Ambos os mecanismos podem envolver diminuição da biodisponibilidade do NO.

MMP-9: Metaloproteinase de matriz extracelular 9; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; NO: Óxido nítrico; eNOS: Sintase endotelial do óxido nítrico; VEGFR-1/2: Receptor (1/2) do fator de crescimento endotelial vascular (LUIZON *et al.*, 2012). Tradução da autora.

A **Figura 5** ilustra as principais vias de mediação da proliferação e migração celular endotelial induzida pela visfatina/NAMPT (PEIRÓ *et al.*, 2010). A visfatina/NAMPT pode induzir a angiogênese, processo importante durante a gestação, por afetar a produção de VEGF através da ativação das vias de sinalização mediadas pela MAP quinase (Proteína-quinases ativadas por mitógenos) e PI3K-Akt (ADYA *et al.*, 2007), e a variabilidade em genes envolvidos nessa via de sinalização induzida pela visfatina pode afetar a suscetibilidade à PE, tornando biologicamente plausível a análise de interações entre polimorfismos funcionais desses genes.

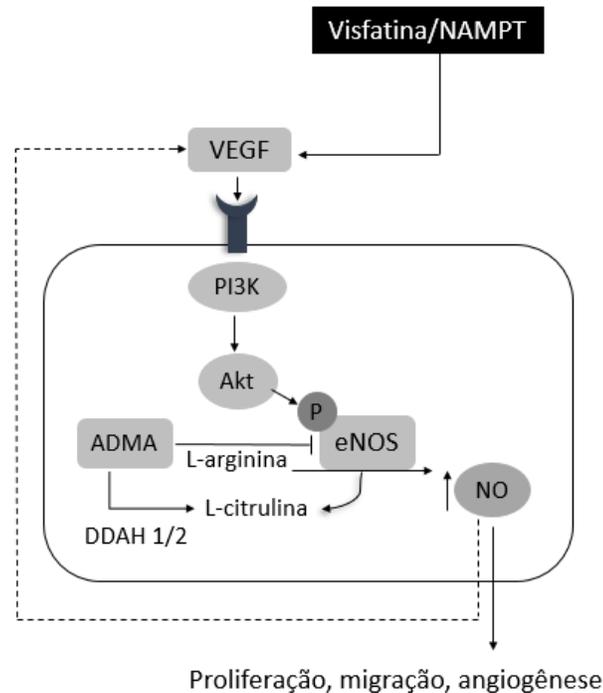


Figura 5: Vias de sinalização que medeiam a proliferação e migração celular endotelial induzida pela visfatina/NAMPT. A visfatina promove a síntese e secreção de VEGF, regula a expressão de VEGFR-2 e favorece a produção de NO pela ação da eNOS via sinalização PI3K/Akt que também culmina na produção de VEGF. Entretanto, ADMA é um inibidor de eNOS, e DDAH 1/2 convertem o ADMA em citrulina.

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; NO: óxido nítrico; MMP: Metaloproteína de matriz extracelular; TIMP: Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz extracelular; ADMA: Dimetilarginina assimétrica; DDAH: Dimetilarginina dimetilaminohidrolase; eNOS: Sintase endotelial do óxido nítrico; P: fósforo; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; Akt: Proteína quinase B. (Adaptado de Peiró *et al.*, 2010).

3.7. Farmacogenética e a pré-eclampsia

O termo farmacogenética foi postulado independentemente pelos geneticistas A. Motulsky e A. Vogel na década de 50, que lançaram os fundamentos para essa área de pesquisa (MOTULSKY, 1957; VOGEL, 1959), originalmente referida a distúrbios hereditários revelados pelo uso de drogas. Posteriormente, a farmacogenética foi definida como o estudo das diferenças genéticas hereditárias que podem afetar as respostas individuais às drogas (VESELL, 1970).

O principal foco da Farmacogenética é elucidar a contribuição das variantes genéticas na variabilidade interindividual das respostas aos medicamentos, como eficácia e reações adversas. Embora nas últimas décadas, os estudos em farmacogenômica tenham levado à identificação de variantes associadas à essa variabilidade de resposta, grande parte da herdabilidade genética dos fenótipos de resposta à drogas parece estar escondida em traços complexos multigênicos e multifatoriais (ZANGER, 2010), evidenciando a importância de estudos com mais de um gene.

A farmacogenética na gravidez ainda é um campo em desenvolvimento (HAAS, 2014). Entretanto, é provável que os efeitos terapêuticos de fármacos utilizadas tanto na medicina reprodutiva, quanto na perinatal, sejam modulados por fatores genéticos (ALFIREVIC; ALFIREVIC; PIRMOHAMED; 2010). Embora resultados emergentes vislumbrem o uso da farmacogenética para individualização da terapia medicamentosa na gestação, incluindo terapia anti-hipertensiva, mais esforços são necessários para determinar esse caminho (HAAS, 2014; LUIZON *et al.*, 2017b).

A terapia anti-hipertensiva na PE inclui o uso de metildopa, nifedipina, hidralazina e labetalol, onde essas drogas vão atuar prologando a gestação, diminuindo assim os desfechos adversos fetais e maternos. Entretanto, como salientado anteriormente, um subgrupo de gestantes com PE não responde à terapia anti-hipertensiva (LUIZON *et al.*, 2017a) e está associada aos piores parâmetros clínicos. Portanto, o uso da farmacogenômica pode auxiliar no resultado do tratamento, reduzir a morbidade e mortalidade materno-fetal e os eventos adversos associados à terapia (WILLIAMS E MORGAN, 2012).

Alguns estudos focaram na farmacogenética no tratamento da PE examinando a distribuição de polimorfismos genéticos em subgrupos de pacientes responsivas ou não responsivas à terapia anti-hipertensiva (Revisados em LUIZON *et al.*, 2017b). Os polimorfismos escolhidos mostraram modificar a expressão de genes candidatos relacionados à fisiopatologia da PE. Genótipos, haplótipos e interações de polimorfismos foram diferentemente distribuídos entre os subgrupos de pacientes responsivas e não responsivas. Entretanto, os achados de associação encontrados nesses estudos devem ser replicados em diferentes populações e estudos adicionais devem focar em outros genes candidatos e nas interações gene-gene dentro de vias de relevância para a fisiopatologia da PE. Nesse contexto, o presente trabalho objetiva caracterizar melhor o papel da visfatina/NAMPT na PE, sua relação com os níveis circulantes de sFLT-1 (marcador clínico da PE), ADMA e níveis de nitrito (um marcador da formação endógena de NO), além das possíveis interações de polimorfismos em genes da via de sinalização PI3K/Akt induzida pela visfatina/NAMPT em gestantes com PE, incluindo os subgrupos de gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

4. JUSTIFICATIVA

A pré-eclampsia (PE) afeta de 5% a 7% das gestantes e é responsável por mais de 70.000 mortes maternas e 500.000 mortes fetais em todo o mundo a cada ano (RANA *et al.*, 2019). No Brasil, a PE também é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materno-fetal (LAURENTI *et al.*, 2004).

Fármacos anti-hipertensivos que são usados para prolongar a gestação e diminuir os potenciais desfechos adversos são, a metildopa (um agonista α -adrenérgico selectivo para α_2), labetalol (um bloqueador α e β) e a nifedipina (um bloqueador dos canais de cálcio) (BERZAN; DOYLE; BROWN; 2014; ABALOS; DULEY; STEYN; 2014). Entretanto, um grande grupo de gestantes não responde à terapia anti-hipertensiva e está associado aos piores parâmetros clínicos, de acordo com critérios de responsividade definidos por estudos prévios (NHBPEP *et al.*, 2000). Portanto, existe a necessidade de novas opções terapêuticas para mulheres com PE que melhorem seus sintomas e sejam seguras para o feto em crescimento (SASSER *et al.*, 2015).

A PE é uma doença multifatorial (PENNINGTON *et al.*, 2012) com fatores ambientais e genéticos, que envolvem vários componentes moleculares em vias metabólicas, os quais são reconhecidos como potenciais alvos para intervenção terapêutica.

Os achados sobre concentrações maternas da adipocina visfatina/NAMPT em pacientes com PE são contraditórias (FERREIRA *et al.*, 2013) (revisados em LUIZON *et al.*, 2015). Além disso, não é conhecida a relação da visfatina/NAMPT com os biomarcadores clínicos e fatores que participam de processos fisiopatológicos centrais envolvidos na PE, como o sFLT-1 e o óxido nítrico (NO). Portanto, compreender os mecanismos mediadores das ações da visfatina/NAMPT e caracterizar fatores que regulam a sua expressão em cenários patológicos permitirá concluir seu papel como potencial alvo terapêutico (ROMACHO; SÁNCHEZ-FERRER; PEIRÓ, 2013).

Investigar interações de polimorfismos em genes candidatos da via de sinalização PI3K/Akt induzida pela visfatina/NAMPT em gestantes normotensas e gestantes com PE, bem como entre os subgrupos de gestantes com PE que são responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva pode auxiliar na elucidação da fisiopatologia da PE e na identificação de biomarcadores relacionados a tais processos fisiopatológicos (LUIZON *et al.*, 2017b). Ademais, a falta de resposta à terapia anti-hipertensiva, assim como os efeitos adversos, e a morbimortalidade materno-fetal associadas à PE, podem ser auxiliados com o uso da farmacogenômica (WILLIAMS E MORGAN, 2012).

Nesse contexto uma vez que os fármacos anti-hipertensivos usados no tratamento da PE podem atuar no aumento da biodisponibilidade de NO, nós hipotetizamos que a visfatina/NAMPT pode prejudicar o relaxamento dependente do endotélio via ativação da NADPH oxidase e que as pacientes não responsivas à terapia anti-hipertensiva possuem interações entre SNPs na via de sinalização PI3K/Akt induzida pela visfatina/NAMPT relacionadas a baixa síntese e biodisponibilidade de NO.

5. OBJETIVO GERAL

Correlacionar os níveis de visfatina/NAMPT com os de nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA, e interações de polimorfismos dos genes *NAMPT*, *VEGF* e *NOS3* em gestantes normotensas e gestantes com PE, bem como entre os subgrupos de gestantes com PE que são responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Correlacionar os níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT com sFLT-1, ADMA e nitrito plasmático no grupo de gestantes normotensas (controle) e com PE, e nos subgrupos de gestantes com PE que são responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.
- 2) Examinar o efeito de polimorfismos de *NAMPT* e *VEGF* nas concentrações plasmáticas de nitrito em gestantes do grupo controle, gestantes com PE e nos subgrupos de gestantes com PE que são responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.
- 3) Caracterizar as possíveis interações de genótipos de polimorfismos de genes induzidos pela via visfatina/*NAMPT* entre os grupos controle e PE, e entre os subgrupos de gestantes com PE que são responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

7. METODOLOGIA

7.1. Seleção das participantes, coleta e processamento das amostras

Para realização deste trabalho foram medidas concentrações plasmáticas de visfatina/NAMPT, sFLT-1, nitrito e ADMA, bem como avaliados genótipos para dois SNPs do gene *NAMPT* que foram obtidos de pacientes com PE e de gestantes saudáveis coletadas previamente, durante a execução de projetos em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Cavalli, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), que foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas (HC) da FMRP/USP. As amostras de plasma e de DNA genômico estão localizadas no HC-FMRP-USP.

Foram selecionadas 205 gestantes com PE em seguimento no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do HC-FMRP/USP, além de 203 gestantes sem diagnóstico de PE do Ambulatório de Pré-natal de Baixo Risco do Centro de Referência da Saúde da Mulher (MATER), pelo método de amostragem por conveniência. Todas as voluntárias que aceitaram participar desse estudo, após explicação detalhada do projeto, assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (**Anexo I**). A autorização para o uso de amostras de gestantes foi obtida pelo CEP da FMRP/USP, Processo Número 4682/2006).

Das pacientes voluntárias que aceitaram participar do estudo, foram coletados 30 ml de sangue venoso, empregando procedimentos de coleta adequados. Em seguida, as amostras de sangue foram usadas para a extração do DNA genômico usado nas genotipagens, bem como nas quantificações bioquímicas.

O protocolo de extração do DNA genômico, obtenção de plasma e armazenamento das amostras foram os mesmos descritos conforme Luizon e colaboradores (2017a).

7.2. Critérios de diagnóstico e de responsividade à terapia anti-hipertensiva

O diagnóstico de PE foi fundamentado nas orientações da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. O diagnóstico de PE foi feito em gestantes que apresentaram hipertensão após 20^o semana de gestação, caracterizada por pressão arterial sistólica > 140 mmHg e diastólica > 90 mmHg em duas aferições de pressão arterial, com intervalo mínimo de 4h e proteinúria (> 0,3g em urina de 24 horas). Pacientes com hipertensão crônica, diabetes, síndrome dos ovários policísticos, gravidez gemelar ou que tenha sido concebida através do uso de fertilização *in vitro* não foram incluídas nesse estudo.

Os pacientes desse estudo foram cuidadosamente monitorados pelo menos uma vez por semana quanto aos sintomas da PE. A responsividade à terapia antihipertensiva foi baseada na avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais (**Quadro 1**) em resposta à administração dos fármacos anti-hipertensivos: a escolha inicial foi a metildopa (1000 a 1500 mg por dia), seguida da nifedipina (40 a 60 mg por dia), que foi administrada em casos de falta de resposta à metildopa. A Hidralazina (5 a 30 mg) foi utilizada nos casos de crise hipertensiva. Um dos critérios clínicos e laboratoriais descritos na tabela foi considerado para classificar a paciente como não responsiva à terapia anti-hipertensiva (LUIZON *et al.*, 2017a; NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM *et al.*, 2000).

Quadro 1: Critérios de responsividade à terapia anti-hipertensiva na hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia.

Sintomas clínicos, incluindo visão turva, dor de cabeça persistente ou escotoma, dores no quadrante superior direito do abdome ou dor epigástrica persistentes.
Pressão arterial sistólica acima de 140 mm hg e pressão arterial diastólica acima de 90 mm hg, conforme avaliado pela curva de pressão sanguínea.
Hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa contagem de plaquetas (síndrome de HELLP); ou proteinúria >2,0 g por 24 h; creatinina >1,2 mg por 100 ml ou nitrogênio ureico sanguíneo >30 mg por 100 ml; AST > 70 u/l e ALT > 60 u/l.
Hipoatividade fetal ou feto não reativo, conforme revelado pela cardiotocografia; restrição de crescimento intra-uterino, oligoamnio, desfecho de perfil biofísico anormal e anormalidades de velocimetria doppler, avaliadas por ultra-som.

Adaptado de Luizon *et al.* (2017a) e definidos pela *National High Blood Pressure Education Program* (NHBPEP *et al.*, 2010).

7.3. Genotipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único

Os polimorfismos apresentados na **Tabela 1**, foram os selecionados para o presente trabalho. Os genótipos para os dois SNPs de *NAMPT*, rs1319501 no promotor e rs3801266 no intron 1, os três SNPs de *VEGF* rs699947 C>A, rs1570360 G>A e rs2010963 G>C foram determinados por ensaios de discriminação alélica Taqman® da Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA (IDs do ensaio, respectivamente: C_7590641_30 e C_340124_10 para *NAMPT*; IDs do

ensaio C_8311602_10; C_1647379_10; C_8311614_10 respectivamente, para *VEGF*). A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizado em um volume total de 12 μ L (3 ng de DNA, 1 x TaqMan *master mix*, 900 nM de cada *primer* e 200 nM de cada sonda) em placas de PCR de 96 poços. A fluorescência da amplificação por PCR foi detectada usando o equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus (Applied Biosystems) ou um detector Chromo 4 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e analisada com o software do fabricante (descrito por LUIZON *et al.*, 2015; SANDRIM *et al.*, 2008b; LUIZON *et al.*, 2014).

Os genótipos para o polimorfismo rs2070744 de *NOS3* foram determinados por PCR utilizando os primers 5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3' (*sense*) e 5'GCCTCCACCCACCCCTGTC-3' (*antisense*). Os produtos gerados pela PCR foram digeridos usando a enzima de restrição *MspI* por pelo menos 3 horas, a 37°C, produzindo fragmentos de 140 e 40 pb para o alelo T ou 90, 50 e 40 pb para o alelo C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 10% e visualizados por coloração com prata (LUIZON *et al.*, 2009). Os genótipos para o polimorfismo VNTR b/a foram determinados por PCR usando os primers 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3' (*sense*) e 5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3' (*antisense*). A reação de PCR foi realizada em um volume de reação de 40 μ l que incluiu aproximadamente 300 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada primer, 200 μ M de cada dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 4 μ l de 103 PCR buffer e 5 U de DNA Taq Polimerase (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese capilar (Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent Technologies Inc., Rockville, MD, EUA) (TANUS-SANTOS; DESAI; FLOCKHART; 2001).

Tabela 1: Polimorfismos genéticos funcionais (SNPs) selecionados.

Gene	dbSNP ^a	SNP	Região	MAF ^b
<i>NAMPT</i>	rs1319501	T>C	Promotor	C=0.155
<i>NAMPT</i>	rs3801266	A>G	Intron 1	G=0.277
<i>NOS3</i>	rs2070744	T>C	Promotor	C=0.234
<i>NOS3</i>	27bp VNTR	4b/a	Intron 4	-
<i>VEGF</i>	rs2010963	G>C	Promotor	C=0.343
<i>VEGF</i>	rs699947	C>A	Promotor	A=0.324
<i>VEGF</i>	rs1570360	G>A	Promotor	A=0.189

a Reference ID (rs#) do Banco de Dados dbSNP-NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/

b Frequência do Menor Alelo. Fonte: Projeto 1000 Genomes; www.1000genomes.org/

NAMPT: nicotinamide phosphoribosyltransferase; *TIMP-1*: metalloproteinase inhibitor 1; *VEGF*: vascular endothelial growth factor.

7.4. Determinação das concentrações dos marcadores bioquímicos

As concentrações de visfatina/NAMPT foram mensuradas pelo método de imunoenensaio enzimático competitivo (ELISA, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando o kit (RayBio Human Visfatin EIA–VIS–1, Norcross, GA, USA) conforme instruções do fabricante (LUIZON *et al.*, 2015). As concentrações séricas de sFLT-1 foram mensuradas com kits de ELISA comerciais (R&D Systems, City, State, Country) seguindo instruções do fabricante (SANDRIM *et al.*, 2008a).

As concentrações plasmáticas de ADMA foram medidas com kits de ensaio imunoenzimático (DLD Diagnostika GmbH, Hamburgo, Alemanha) disponíveis comercialmente e de acordo com instruções do fabricante. Esse é um método de ELISA competitivo onde o ADMA presente nas amostras sobre acilação e compete com as moléculas de ADMA em fase sólida ligadas a placa de microtitulação por um número fixo de antisoros anti-ADMA. Após o equilíbrio do sistema, os complexos antígeno livre e antígeno-antisoro livre são removidos por lavagem. O anticorpo ligado ao ADMA em fase sólida é detectado pelo sistema anticorpo/peroxidase com leitura que ocorre a 450 nm. O total de anticorpo ligado à ADMA em fase sólida é inversamente proporcional à concentração de ADMA na amostra (SANDRIM *et al.*, 2010a).

7.5. Determinação dos níveis plasmáticos de nitrito (NO₂)

O nitrito plasmático é um produto do metabolismo do NO e um marcador relevante da sua formação, deriva da atividade da NOS no endotélio e a inibição da eNOS está associada à diminuição dos níveis de nitrito (DICHI *et al.*, 2014). Os valores de nitrito plasmático, usados como forma de mensurar a síntese endógena de NO, foram determinados utilizando ensaio de quimioluminescência à base de ozônio, conforme descrito e publicado por Sandrim *et al.* (2008a). O ensaio se baseia na injeção de 200 µL de plasma em uma solução de triiodeto acidificado (triiodeto (2,0 g de iodeto de potássio e 1,3 g de iodo dissolvido em 40 mL de água com 140 mL de ácido acético), que reduz o nitrito ao gás NO, que posteriormente foi detectado. A reação se dá em um analisador de quimioluminescência de fase gasosa (Sievers Modelo 280 NO Analyzer) com purificação por nitrogênio.

7.6. Análise estatística dos resultados

As características clínicas das pacientes com PE e do grupo de gestantes controle foram comparadas pelo teste t de Student não pareado, teste U de Mann-Whitney ou χ^2 , conforme apropriado.

As distribuições dos genótipos dos SNPs foram avaliadas quanto à aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde diferenças nas frequências genotípicas e alélicas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A distribuição dos níveis de visfatina/NAMPT, nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA em ambos os grupos foram testados utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, afim de guiar qual o modelo estatístico mais adequado para os testes posteriores. Nenhum conjunto de valores obtidos através das amostras apresentou distribuição normal, exceto as medidas dos níveis de ADMA. Portanto, para comparação entre os grupos foi realizado o teste de Mann-Whitney para os dados não-paramétricos e o Teste t não pareado para níveis de ADMA. Os ensaios de correlação entre visfatina/NAMPT e nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA nos grupos controle e pré-eclâmpsia foram realizados pelo teste de correlação de Spearman. Não foi possível correlacionar, devido ao pequeno número amostral, os níveis de visfatina/NAMPT e ADMA nos subgrupos de PE definidos de acordo com a resposta à terapia anti-hipertensiva.

Os efeitos dos diferentes genótipos dos SNPs dos genes *NAMPT* e *VEGF* nos níveis de nitrito plasmático das pacientes responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva foram comparados utilizando o teste t de Student não pareado.

7.7. Interações gene-gene pelo método *Multifactor Dimensionality Reduction*

As análises de interação gene-gene, que permite elucidar sobre vias e mecanismos envolvidos em doenças (CORDELL, 2009), foram realizadas com o uso do programa *Multifactor Dimensionality Reduction* (MDR; <http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>), que é uma ferramenta de mineração de dados que detecta modelos de interação entre genótipos de polimorfismos de diferentes genes e testa a sua associação em estudos de caso-controle.

Sabe-se que interações complexas entre genes e fatores ambientais desempenham um papel na etiologia de doenças humanas comuns. No entanto, os métodos estatísticos tradicionais não são adequados para detectar essas interações (MCKINNEY *et al.*, 2006). O MDR é um método de aprendizagem de máquina desenvolvido para identificar combinações de variações genéticas associadas ao risco para doenças comuns, de herança complexa (HAHN; RITCHIE; MOORE; 2003; MOORE, 2004). Esse método foi desenvolvido em resposta às limitações apresentadas pela regressão logística na detecção de interações gênicas. O MDR é não paramétrico, pois nenhum parâmetro é estimado e é livre de qualquer modelo genético assumido. O objetivo do MDR é encontrar uma combinação de atributos associados ao resultado da doença, minimizando o número de indivíduos classificados erroneamente. O MDR agrupa genótipos de vários *locus* ou fatores ambientais em grupos de alto e baixo risco, reduzindo efetivamente a

dimensionalidade dos preditores (ou seja, atributos) de N dimensões para uma dimensão. O atributo com uma dimensão recém-construído, pode ser avaliado quanto à sua capacidade de classificar o *status* da doença (MOORE *et al.*, 2009). Assim, o MDR forma uma hipótese contando a frequência de combinações de genótipos dentro da amostra de treinamento (HAHN E MOORE, 2004). A **Figura 6** ilustra os passos para implementar o método MDR.

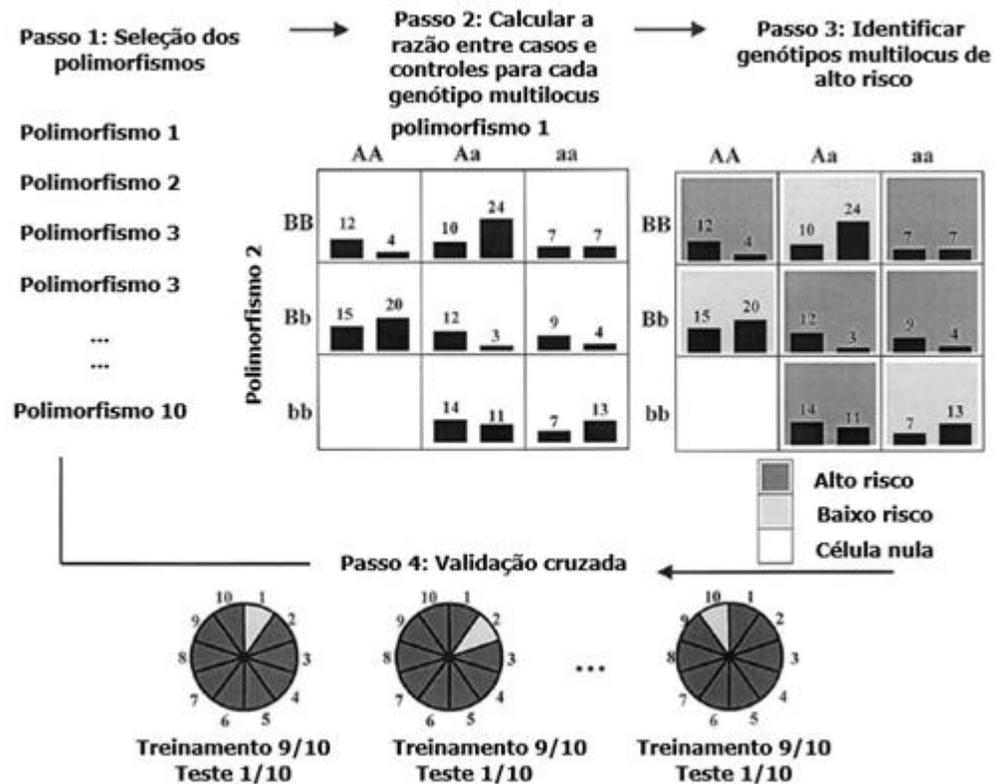


Figura 6: Resumo das etapas envolvidas na implementação do método *Multifactor Dimensionality Reduction (MDR)*. Um conjunto de n fatores genéticos é selecionado; os n fatores e suas possíveis classes multifatoriais ou células são representados no espaço n -dimensional; cada célula multifatorial no espaço n -dimensional é rotulada como "alto risco" ou "baixo risco"; e o erro de previsão de cada modelo é estimado. Para cada combinação de multifatores, as distribuições hipotéticas de casos (barras à esquerda nas caixas) e dos controles (barras à direita nas caixas) são mostradas, onde os números em cima das barras indica a quantidade de indivíduos que possui algum dos n fatores genéticos selecionados. (Adaptado de Ritchie *et al.*, 2001).

O MDR é capaz de identificar interações de genótipos e classificá-las em células de alto e baixo risco e também é aplicável para estudos em farmacogética, onde a variável de resultado é resposta ou não resposta à terapia medicamentosa. A caracterização das interações foi feita utilizando o MDR robusto, que utiliza $\alpha = 0,1$ como limiar para o teste exato de Fisher. O melhor modelo de interação obtido é o modelo com maior pontuação de teste e consistência de validação cruzada. O teste de permutação foi realizado para determinar a significância do melhor modelo (LUIZON et al., 2017a).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Tabela 2** sumaria as características das pacientes envolvidas nesse estudo. As gestantes do grupo controle e com PE apresentaram similaridade na etnia (% de autodeclaração como brancas), % de fumantes, batimentos por minuto, hemoglobina, hematócrito, concentrações creatinina e % de primiparidade (todos valores de $P > 0,05$). Como esperado, as pacientes com PE apresentaram maior pressão sistólica e diastólica comparado ao grupo controle (ambos $P < 0,05$). Os índices de massa corporal (IMC) e glicemia em jejum foram maiores em pacientes com PE comparados às gestantes do grupo controle (ambos $P < 0,05$). Como esperado, foi observado proteinúria, menor peso dos recém-nascidos e parto antecipado nas pacientes com PE se comparados ao grupo controle (todos $P < 0,05$). Embora o IMC e a glicose em jejum sejam maiores em pacientes com PE, vale ressaltar que não houve diferença entre os grupos nos níveis plasmáticos da adipocina visfatina/NAMPT (**Figura 7**).

Tabela 2: Características clínicas e demográficas das pacientes controle x pré-eclampsia

Parâmetros	Grupo controle (n = 203)	Pré- eclampsia (n = 205)	<i>p</i>
Idade (anos)	24.5± 0.4	26.5± 0.4	0.001
Etnia (% brancas)	72.2	72.3	0.994
Fumantes (%)	9.2	9.3	0.993
IMC (Kg m⁻²)	23.2 ± 0.3	27.5± 0.4	0.000
PAS (mm Hg)	110.6± 0.8	140.1± 1.4	0.000
PAD (mm Hg)	71.7± 0.6	88.1± 0.8	0.000
FC (batimentos por min)	82.0± 0.6	82.3± 0.6	0.702
Glicemia em jejum (mg/dL)	75.2± 1.0	80.9± 1.7	0.008
Hb (g/dL)	11.8± 0.1	11.9± 0.1	0.721
Hct (%)	35.6± 0.4	36± 0.2	0.505
Creatinina (mg/dL)	66.7± 2.8	70.5± 1.6	0.620
24 h Pr (mg per 24 h)	ND	904.6± 113.8	0.000
Primiparidade (%)	45.3	44.2	0.849
IGN (semanas)	39.7± 0.1	35.9± 0.3	0.000
Peso do neonato (g)	3297± 39.7	2531± 68.0	0.000
IGC (semanas)	36.5± 0.3	34.0± 0.3	0.000

Abreviações: IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; FC, frequência cardíaca; Hb, concentração de hemoglobina; Hct, hematócrito; IGN, Idade gestacional ao nascer; 24-h Pr, 24-h proteinúria; IGC, Idade gestacional na coleta; ND: não determinado. Valores são a média ± s.e.m. $P < 0.05$ versus grupo de gestantes normotensas.

É importante ressaltar que as pacientes com PE participantes desse estudo já se encontravam fazendo uso da terapia anti-hipertensiva.

Tabela 3 sumaria as características dos subgrupos de gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva à terapia anti-hipertensiva. Conforme o esperado, as gestantes não responsivas apresentaram maior pressão sistólica e diastólica em comparação às responsivas (ambos $P < 0,05$). Assim como apresentaram maior grau de proteinúria, tiveram parto antecipado e bebês com menor peso quando comparado a pacientes responsivas à terapia anti-hipertensiva (todos valores $P < 0,05$). Sendo possível observar um quadro clínico mais grave nesse subgrupo de pacientes (**Tabela 3**). Estudos prévios destacaram que pacientes com hipertensão resistente apresentam alto risco de complicações e um risco aumentado de eventos cardiovasculares, reforçando a necessidade de esforços para melhorar os desfechos da hipertensão nessa população (DAUGHERTY *et al.*, 2012; WEI *et al.*, 2018).

Tabela 3: Características demográficas das pacientes responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva

Parâmetros	Pré-eclampsia		P
	Responsivas (n = 110)	Não responsivas (n = 95)	
Idade (anos)	26.5 ± 0.5	26.6 ± 0.7	0.918
Etnia (% brancas)	71.4	70.5	0.953
Fumantes (%)	12.5	4.2	0.052
IMC (Kg m ⁻²)	29.1 ± 0.7	25.8 ± 0.6	0.001
PAS (mm Hg)	132.2 ± 1.7	149.6 ± 2.0	0.000
PAD (mm Hg)	83.2 ± 1.0	93.8 ± 1.2	0.000
24 h Pr (mg per 24 h)	1120 ± 214.4	1684 ± 227.9	0.029
IGN (semanas)	38.1 ± 0.2	33.5 ± 0.4	0.000
Peso do neonato (g)	3027 ± 66.8	1966 ± 92.7	0.000
IGC (semanas)	35.6 ± 0.4	32.5 ± 0.5	0.000

Abreviações: IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; IGN, Idade gestacional ao nascer; 24-h Pr, 24-h proteinúria; IGC, Idade gestacional na coleta. Valores são a média ± s.e.m. $P < 0.05$ versus grupo de gestantes não responsivas.

8.1. Distribuição dos níveis de visfatina/NAMPT, nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA em gestantes do grupo controle e PE

Os resultados dos níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT, nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA são mostrados na **Figura 7** e estão de acordo com achados previamente publicados (SANDRIM *et al.*, 2008a; SANDRIM *et al.*, 2010a; LUIZON *et al.*, 2015).

A (**Figura 7A**) mostra que os níveis de visfatina/NAMPT não foram diferentes entre os grupos. Notadamente, os níveis plasmáticos de nitrito foram significativamente menores no grupo de gestantes com PE em comparação ao grupo controle (**Figura 7B**). Entretanto, os níveis plasmáticos de sFLT-1 (**Figura 7C**) e de ADMA (**Figura 7D**) foram maiores no grupo PE em comparação ao controle.

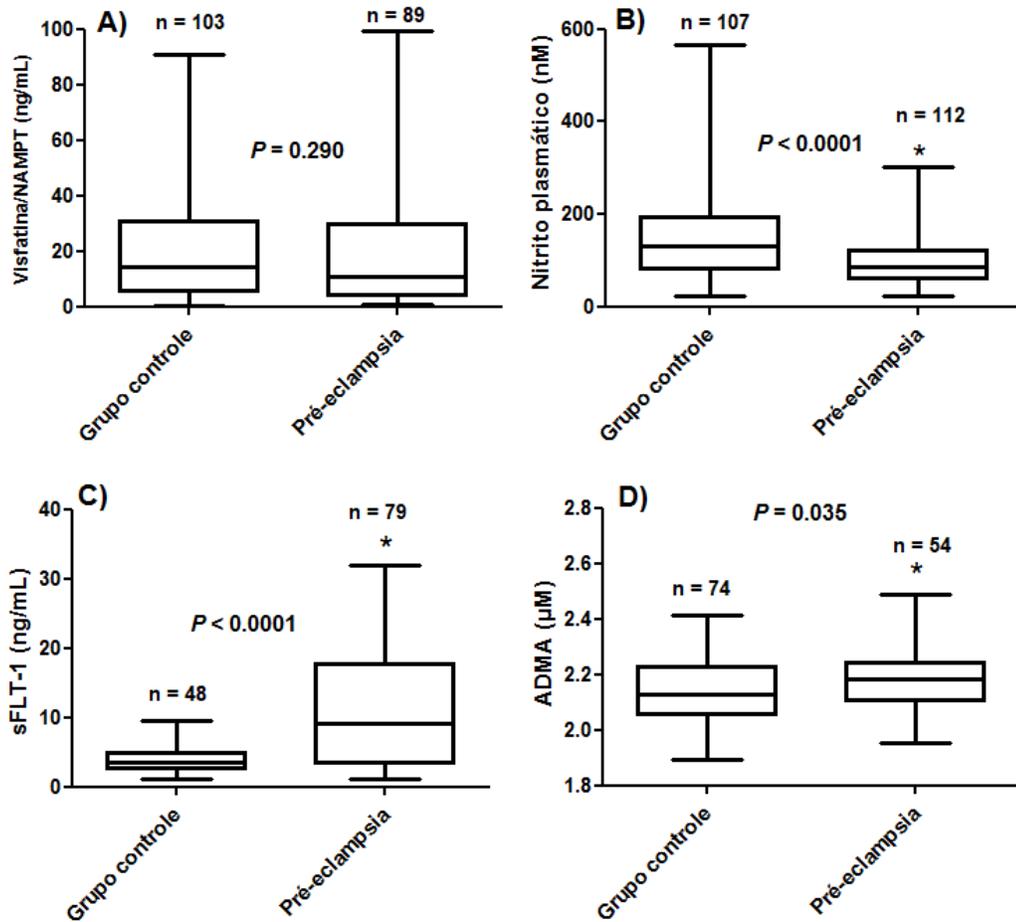


Figura 7: Boxplots de comparação entre as médias e medianas de (A) visfatina/NAMPT, (B) nitrito plasmático, (C) sFLT-1 e (D) ADMA nos grupos controle e PE. A) Entre os níveis de Visfatina/NAMPT nos grupos de gestante controle e PE. B) Valores de nitrito plasmático entre os mesmos grupos. C) Comparação dos níveis plasmáticos de sFLT-1 entre os grupos. D) Comparação dos níveis plasmáticos de ADMA. (*) $P < 0,05$

Alguns estudos mostraram níveis de visfatina/NAMPT crescentes ao longo da gestação (Mastorakos *et al.* 2007), enquanto outros mostraram maiores níveis plasmáticos em gestantes com 19-26 semanas (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009).

Em PE, os achados sobre concentrações maternas de visfatina/NAMPT circulante são contraditórios. A maioria dos estudos mostra aumento dos níveis plasmáticos de visfatina em PE, comparado com gestantes normotensas (ADALI *et al.*, 2009; ZULFIKAROGLU *et al.*, 2010), ou o aumento de níveis séricos de visfatina em PE (FASSHAUER *et al.*, 2008; ZORBA *et al.*, 2012). No entanto, outros estudos mostraram diminuição dos níveis séricos de visfatina em PE (HU *et al.*, 2008), ou diminuição da expressão de visfatina no leito placentário em pacientes com PE comparado com controles normotensas (KIM *et al.*, 2012). Entretanto, no presente trabalho não foram observadas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de visfatina entre os grupos PE e gestantes do grupo controle, o que está de acordo com achados prévios (Mazaki-Tov *et al.* 2010).

A concentração de nitrito plasmático foi menor em gestantes com PE comparado com gestantes controle e também corrobora com achados que mostrando formação prejudicada de NO em doenças hipertensivas gestacionais (SANDRIM *et al.*, 2008a; KUBLICKIENE *et al.*, 2000; SAVVIDOU *et al.*, 2003; GARCÍEA *et al.*, 2007). A PE apresenta características que podem estar associadas a essa diminuição da biodisponibilidade de NO, como a diminuição do VEGF e PIGF circulantes e o aumento do sFLT-1 e sEng (PHIPPS *et al.*, 2019; POWE; LEVINE; KARUMANCHI; 2011).

O sFLT-1 tem sido extensivamente estudado (MASUYAMA *et al.*, 2007; POWE; LEVINE; KARUMANCHI; 2011; RANA *et al.*, 2007) e tem provável papel na fisiopatologia da PE, pois tem sido associado a disfunção endotelial por ser capaz de prejudicar a ativação da eNOS e a síntese de NO (SANDRIM *et al.*, 2008a). Estudos prévios também mostram níveis elevados de sFLT-1 na PE em comparação com gestantes saudáveis (MASUYAMA *et al.*, 2006; MASUYAMA *et al.*, 2007; MAYNARD *et al.*, 2003; RANA *et al.*, 2007), o que está de acordo com os achados da **Figura 7**.

O ADMA é um inibidor endógeno da eNOS que causa disfunção endotelial e que participa da patogênese de diversas doenças vasculares, incluindo a PE (YUAN *et al.*, 2017). Neste trabalho, o ADMA se mostrou elevado em pacientes com PE, assim como em estudos prévios que mostraram seu nível circulante significativamente elevado em PE comparado a gestantes normotensas (GARG *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2016).

8.2. Correlação entre níveis de visfatina/NAMPT, nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA em gestantes do grupo controle, PE e subgrupos de PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

Nossa hipótese era a de que existem relações inversas entre a visfatina/NAMPT e as concentrações circulantes de nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA, nos grupos controle e PE. Portanto, nós realizamos análises de correlação entre os marcadores bioquímicos deste trabalho considerando o grupo de gestantes controle e no grupo de pacientes com PE. Os níveis de visfatina/NAMPT e nitrito plasmático foram correlacionados positivamente em gestantes do grupo controle ($r = 0,317$, 95% CI = 0,110/0,497, $P = 0,002$; **Figura 8A**), mas correlacionados negativamente em PE ($r = -0,257$, 95% CI = -0,477/-0,007, $P = 0,038$; **Figura 8B**). Por sua vez, o principal marcador clínico da PE, sFLT-1, foi correlacionado negativamente com visfatina/NAMPT em gestantes controle ($r = -0,340$, 95% CI = -0,592/-0,027, $P = 0,029$; **Figura 8C**), mas positivamente em PE ($r = 0,326$, 95% CI = -0,084/0,532, $P = 0,007$; **Figura 8D**). Com relação aos níveis de ADMA, não foi possível observar correlação significativa entre visfatina/NAMPT e ADMA nos grupos controle ($r = -0,028$, 95% CI = -0,353/0,302, $P = 0,0864$; **Figura 8E**) e no grupo PE ($r = 0,017$, 95% CI = -0,331/0,362, $P = 0,921$; **Figura 8F**).

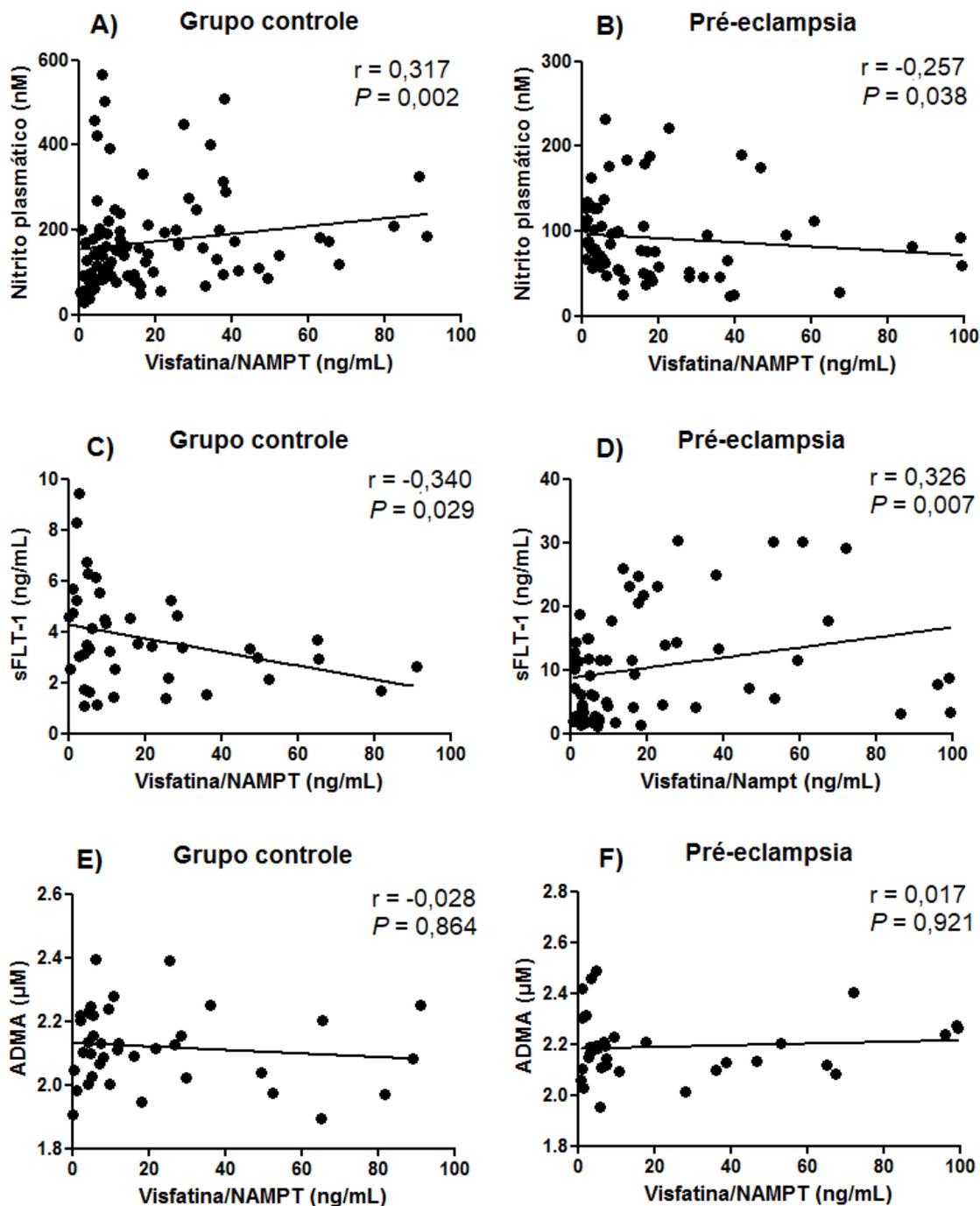


Figura 8: Teste de correlação de Spearman entre os níveis de visfatina/NAMPT e nitrito plasmático, sFLT-1 e ADMA entre os grupos de gestantes normotensas (grupo controle) e gestantes com PE respectivamente.

A) e B): Correlação dos Níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT e nitrito nos grupo controle e PE.

C) e D): Visfatina/NAMPT e sFLT-1 correlacionados nos grupos controle e PE. **E) e F):** Correlação

entre níveis de visfatina/NAMPT e ADMA nos mesmos grupos. Valores significativos: $P < 0,05$. A regressão linear está mostrada nas figuras.

Um número significativo de gestantes com PE não responde à terapia anti-hipertensiva e está associado aos piores desfechos clínicos (revisado em LUIZON *et al.*, 2017b). Portanto, nós avaliamos também as correlações entre a visfatina/NAMPT e as concentrações circulantes de nitrito plasmático e sFLT-1 no subgrupos de pacientes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva, no intuito de compreender melhor as relações entre estes marcadores bioquímicos e características fisiopatológicas desse grupo de gestantes com PE. Nas pacientes com PE responsivas à terapia anti-hipertensiva, não foi possível observar correlação significativa entre os níveis de visfatina/NAMPT e nitrito plasmáticos ($r = -0.065$, 95% CI = $-0.363/0.244$, $P = 0.674$; **Figura 9A**). Entretanto, nas pacientes não responsivas à terapia anti-hipertensiva, observamos correlação negativa ($r = -0.376$, 95% CI = $-0.643/-0.026$, $P = 0.031$; **Figura 9B**). Interessante notar que esta correlação negativa foi observada quando considerado o grupo total de pacientes com PE.

Em relação aos níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT e sFLT-1, não foi possível observar correlação significativa nos subgrupos de pacientes com PE responsivas ($r = 0.302$, 95% CI = $-0.150/0.649$, $P = 0.171$; **Figura 9C**) e não responsivas à terapia ($r = 0.389$, 95% CI = $-0.127/0.740$, $P = 0.122$; **Figura 9D**) como foi observada no grupo total de pacientes. É provável que não tenha sido possível observar correlações significativas devido ao pequeno número amostral de dosagens de sFLT-1 quando dividimos as gestantes com PE em subgrupos de gestantes.

Por razões técnicas, conseguimos medir os níveis de ADMA de apenas 38 das gestantes com PE, o que impossibilitou os testes de correlação quando este grupo foi subdividido de acordo com a resposta à terapia anti-hipertensiva.

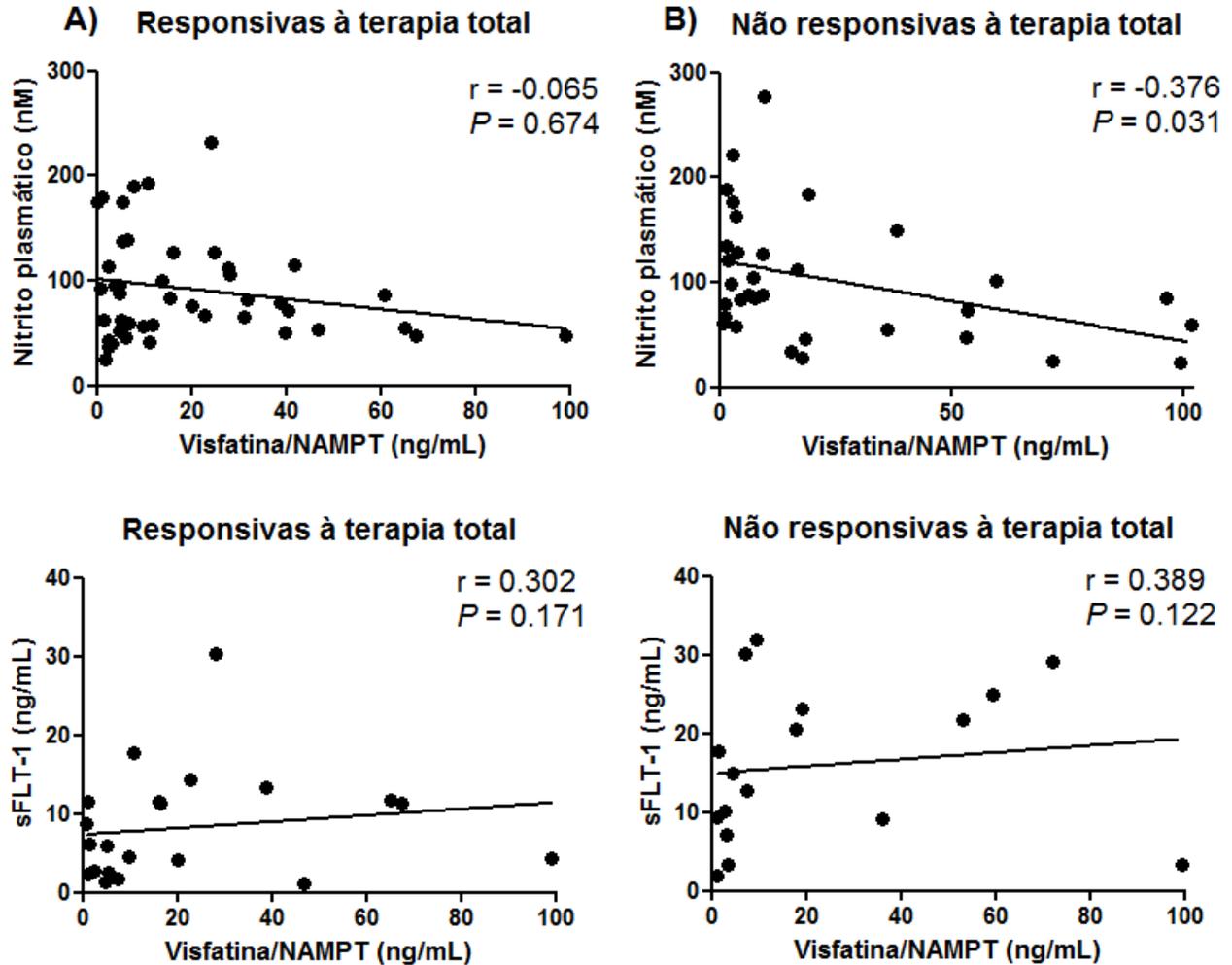


Figura 9: Teste de correlação de Spearman entre visfatina/NAMPT e nitrito plasmático e sFLT-1 entre os grupos de pacientes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva, respectivamente.

A) e B): Correlação entre os níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT e nitrito em pacientes com pré-eclampsia responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. **C) e D):** Correlação entre níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT e sFLT-1 em pacientes dos mesmos grupos. Valores significativos: $P < 0,05$. A regressão linear está mostrada nas figuras.

No endotélio saudável, a visfatina/NAMPT pode estimular a angiogênese pela regulação positiva do VEGF através da ativação de PI3K/Akt e induzir o relaxamento dependente do endotélio através da via do NO (YAMAWAKI *et al.*, 2009). A visfatina/NAMPT foi capaz de ativar a sintase de NO nas células endoteliais (PEIRÓ *et al.*, 2010). Entretanto, ela também foi capaz de prejudicar o relaxamento dependente de endotélio pela ativação da NADPH oxidase, com

liberação de ânions superóxido e inativação do NO, uma vez que o mesmo reage com superóxido para gerar peroxinitrito, um potente agente oxidante (VALLEJO *et al.*, 2011).

O peroxinitrito também é capaz de afetar a função endotelial aumentando a expressão da sintase endotelial do óxido nítrico induzível (iNOS) em células endoteliais isoladas pela ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB). Desse modo, esse aumento de NO induzido pelo peroxinitrito também poderia ser deletério e resultar em um mecanismo de retroalimentação para gerar mais peroxinitrito (VALLEJO *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o sFLT-1 também atua na redução da biodisponibilidade de NO pela ligação ao VEGF e PlGF circulantes (PHIPPS *et al.*, 2019). Esses achados poderiam explicar as relações opostas encontradas entre visfatina/NAMPT e sFLT-1 e visfatina/NAMPT e nitrito (**Figura 8, A-D**), no grupo de gestantes com PE quando comparadas ao grupo de gestantes controle. É interessante ressaltar as interações entre a visfatina/NAMPT o marcador clínico da PE, sFLT-1, que participam em conjunto em via bioquímica (**Figura 5**) relacionada a biodisponibilidade de NO na PE (VALLEJO *et al.*, 2011; PHIPPS *et al.*, 2019).

A PE é associada com altas concentrações de ADMA e baixas concentrações de nitrito se comparado com gestantes saudáveis (SAVVIDOU *et al.*, 2003). De fato, em estudo prévio mostrou associação negativa entre as concentrações circulantes de ADMA e de nitrito em gestantes saudáveis e PE (SANDRIM *et al.*, 2010a). Nos grupos deste trabalho, não foi possível observar relação significativa entre visfatina/NAMPT e ADMA (**Figura 8, E-F**). Esse resultado pode ser devido a baixa quantidade de amostras de ADMA obtida dessas pacientes, fato ocorrido devido a razões técnicas. Entretanto, baseado nas correlações encontradas com nitrito e sFLT-1, seria esperado encontrar correlações positivas entre visfatina/NAMPT e ADMA. No entanto, tais hipóteses precisam ser comprovadas em futuros estudos.

A metildopa, nifedipina, hidralazina e labetalol são fármacos anti-hipertensivos utilizados no tratamento da hipertensão arterial presente na PE (BERZAN *et al.*, 2014). Bloqueadores de canais de cálcio, como a nifedipina por exemplo, podem restaurar a biodisponibilidade de NO e melhorar a função endotelial (DING E VAZIRI; 2000; TADDEI *et al.*, 2001). A hidralazina por sua vez, pode ter seus efeitos relacionados a produção de NO e mostrou aumentar as concentrações de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) em gestantes com PE (LÓPEZ-JARAMILLO *et al.*, 1996). Nesse cenário, é possível que os fármacos utilizados no tratamento da PE influenciem a biodisponibilidade de NO, contrabalançando a formação prejudicada de NO encontrada na PE (LUIZON *et al.*, 2017a).

A relação negativa encontrada entre visfatina/NAMPT e nitrito plasmático em pacientes com PE também foi observada no subgrupo de pacientes com PE que não respondem à terapia

anti-hipertensiva, mas não no subgrupo de pacientes responsivas (**Figura 9, A e B**). Esses resultados são plausíveis e esperados se levarmos em conta que a visfatina/NAMPT pode induzir o relaxamento dependente do endotélio através da via do NO (YAMAWAKI *et al.*, 2009), mas também prejudicar o mesmo por mecanismos envolvendo a estimulação da NADPH oxidase (VALLEJO *et al.*, 2011) e que as pacientes não responsivas à terapia anti-hipertensiva não se beneficiaram da restauração da biodisponibilidade de NO proporcionada pelos fármacos administrados assim como as pacientes responsivas. Entretanto, tanto a replicação dos achados quando mais estudos são necessários para a comprovação dessas hipóteses.

8.3. Interações entre polimorfismos de *NAMPT* e *VEGF* com diferentes concentrações plasmáticas de nitrito em pacientes controle, com PE e subgrupos responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva

Foi determinada (**Figura 10**) a influência dos polimorfismos de *NAMPT*, rs1319501 T>C (**letras A e B**) e rs3801266 A>G (**letras C e D**) nos níveis de nitrito plasmático em gestantes controle, gestante com PE e gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Como mostrado, o genótipo TC+CC do polimorfismo rs1319501 de *NAMPT* está associado a menores níveis de nitrito plasmático em pacientes com PE não responsivas à terapia anti-hipertensiva, se comparado ao genótipo TT no mesmo grupo de pacientes. Entretanto, não observamos esse efeito quando comparado o grupo controle com o grupo PE.

Genótipos do polimorfismo de *NAMPT* rs3801266 A>G não apresentaram, para os nossos dados, influência sob os níveis de nitrito plasmático nos grupos controle, PE e PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

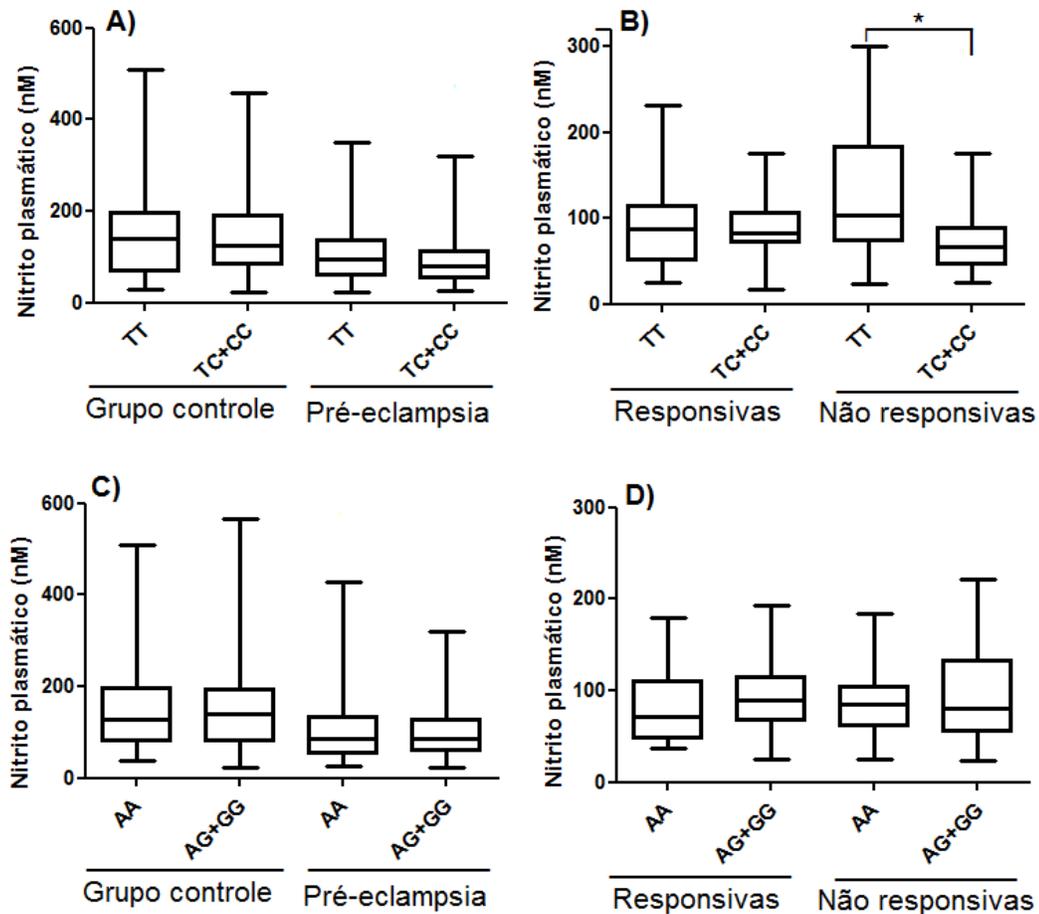


Figura 10: Efeito dos polimorfismos de *NAMPT* rs1319501 T>C (A e B) e rs3801266 A>G (C e D) nos níveis de nitrito plasmático. Letras **A)** rs1319501 T>C e **C)** rs3801266 A>G mostram influência dos respectivos polimorfismos em gestantes do grupo controle e PE. Letras **B)** rs1319501 T>C e **D)** rs3801266 A>G trazem influência dos polimorfismos nos níveis de nitrito plasmático em gestantes com PE divididas em responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Valores significativos: $P < 0,05$.

Os genótipos TC+CC do polimorfismo rs1319501 T>C de *NAMPT* foram previamente associados com níveis mais baixos de visfatina em pacientes com PE não responsivas à terapia anti-hipertensiva (LUIZON *et al.*, 2015). Esse polimorfismo está localizado na região promotora de *NAMPT* e se sobrepõe a um grande número de dados de ChIP-seq de fatores de transcrição do *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE), sugerindo que ele pode sim afetar a expressão de *NAMPT* (LUIZON *et al.*, 2017a). De fato, é provável que esse SNP afete a ligação de fatores de transcrição de acordo com sua pontuação 2c no RegulomeDB (BOYLE *et al.*, 2012). Por outro lado, o genótipo TT contém o alelo selvagem desse polimorfismo e podemos afirmar que ele está

associado a níveis mais altos de nitrito plasmático nas pacientes responsivas à terapia anti-hipertensiva, em comparação com as pacientes não responsivas.

Os genótipos AG + GG do polimorfismo rs3801266 A>G de *NAMPT*, por sua vez, foram associados a níveis mais altos de visfatina em grupo de gestantes não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Níveis aumentados de visfatina/*NAMPT* em crianças e adolescentes obesos também foram previamente reportados nos portadores do genótipo GG (BELO *et al.*, 2015). Esses achados em conjunto mostram que os polimorfismos de *NAMPT* tem efeitos nos níveis de visfatina/*NAMPT*, entretanto, esses efeitos podem variar sob diferentes condições fisiológicas ou em situações de doença (LUIZON *et al.*, 2017a).

As adipocinas podem desempenhar um papel na invasão trofoblástica necessária durante a gestação saudável (TERSIGNI *et al.*, 2011). A visfatina/*NAMPT*, por exemplo, pode induzir o relaxamento dependente do endotélio através da via que culmina na produção de NO (YAMAWAKI *et al.*, 2009). Entretanto, a mesma está implicada na fisiopatologia da aterosclerose e de diversas doenças inflamatórias (DAHL *et al.*, 2012), podendo ter um potencial papel em complicações a longo prazo da PE (KARUMANCHI *et al.*, 2016; POWE; LEVINE; KARUMANCHI; 2011). Nesse contexto, polimorfismos no gene *NAMPT* que alteram os níveis da proteína circulante poderiam afetar a síntese de NO e a dosagem de nitrito plasmático (marcador endógeno da produção de NO), portanto, torna-se relevante examinar a associação entre genótipos dos SNPs de *NAMPT* e nitrito. Esses achados sobre a visfatina/*NAMPT* poderiam explicar as relações encontradas entre polimorfismos de *NAMPT* e níveis de nitrito plasmático em gestantes não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

Adicionalmente, nós determinamos a influência dos polimorfismos de *VEGF* rs2010963 G>C, rs699947 C>A e rs1570360 G>A nos níveis de nitrito plasmático em gestantes dos grupos controle, PE e PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Como mostrado na **Figura 11**, não encontramos associações significativas entre nenhum dos genótipos dos polimorfismos de *VEGF* e os níveis de nitrito plasmático nos grupos de gestantes estudados.

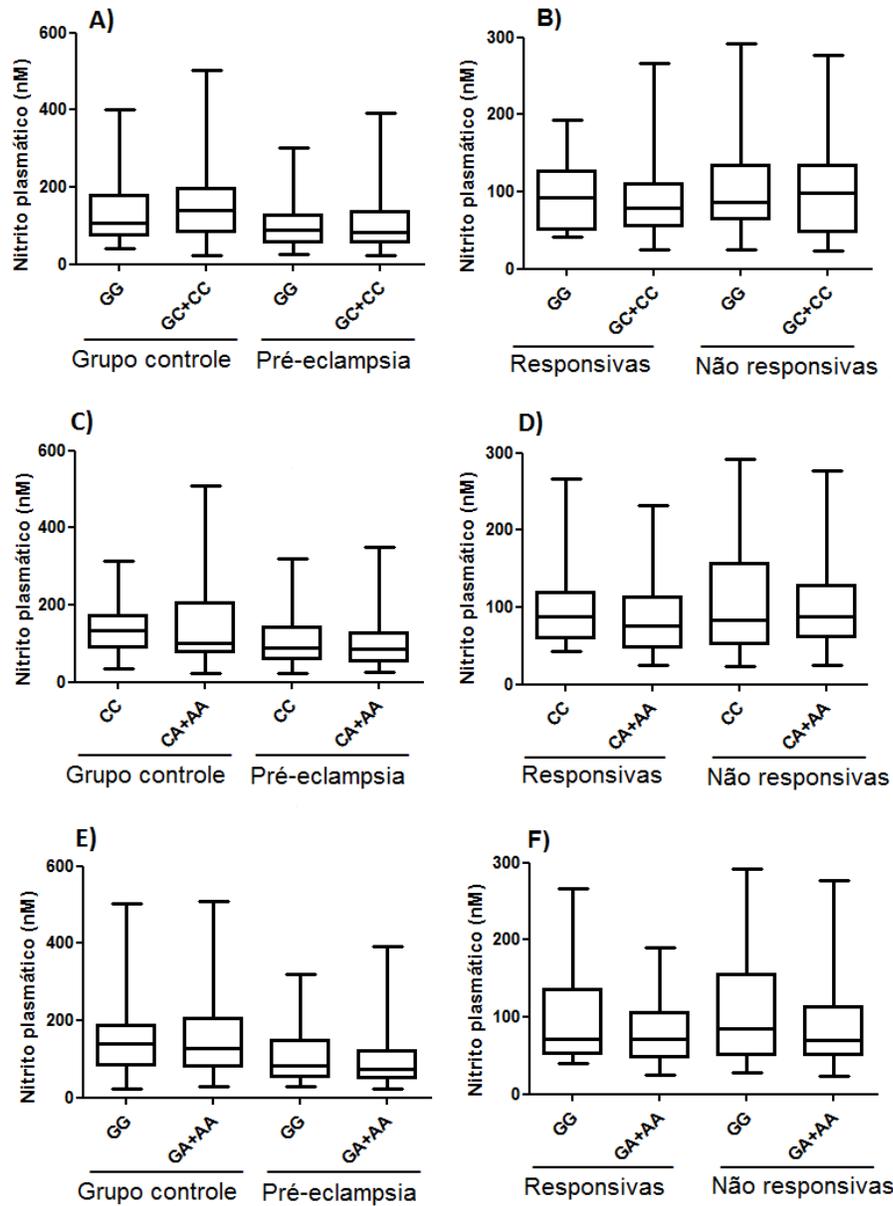


Figura 11: Efeito dos polimorfismos de VEGF rs2010963 G>C, rs699947 C>A e rs1570360 G>A nos níveis de nitrito plasmático. Letras **A)** rs2010963 G>C, **C)** rs699947 C>A e **E)** rs1570360 G>A mostram influência dos respectivos polimorfismos em gestantes do grupo controle e PE. Letras **B)** rs2010963 G>C, **D)** rs699947 C>A e **F)** rs1570360 G>A trazem influência dos polimorfismos nos níveis de nitrito plasmático em gestantes com PE divididas em responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Nenhuma das figuras mostra associação estatisticamente significativa.

O VEGF participa da via do NO e seria plausível estudar a influência de polimorfismos de VEGF nos níveis de nitrito plasmático. Embora nenhum outro estudo tentou verificar o possível efeito desses polimorfismos sob os níveis de nitrito plasmático, diversos trabalhos anteriores mostraram influência de SNPs de *VEGF* na PE e em seus níveis circulantes.

Um estudo longitudinal mediu os níveis de VEGF em gestantes a partir da 10ª semana de gestação e encontrou níveis elevados a partir de 28 semanas em gestantes que subsequentemente desenvolveram PE (BOSIO *et al.*, 2001). Um estudo prospectivo relevou níveis de VEGF significativamente diferentes em mulheres com PE a partir da 30ª semana de gestação, quando comparado com gestantes normotensas (HUNTER *et al.*, 2000). Esses dados em conjunto sugerem o potencial papel do VEGF na patogênese da PE.

Dados de uma meta-análise sugeriram que os polimorfismos de *VEGF* estudados no presente trabalho, rs699947 C>A e rs1570360 G>A não tiveram associação com o risco de desenvolvimento de PE em todas as pacientes examinadas, entretanto o polimorfismo rs2010963 G>C foi associado ao risco de desenvolvimento de PE (CHENG *et al.*, 2013). Outro estudo com os mesmos polimorfismos na população do Irã, mostrou que não houve diferença significativa dos mesmos se comparadas gestantes com PE e controles (SALIMI *et al.*, 2015). Entretanto, a frequência dos genótipos GC e CC do polimorfismo rs2010963 G>C foi maior em mulheres com PE grave, quando comparado com PE leve e controles (SALIMI *et al.*, 2015). Além disso, também foi mensurado os níveis séricos de VEGF, e além das gestantes com PE apresentarem níveis significativamente menores, o genótipo CC do rs2010963 G>C foi associado com menores níveis de VEGF em comparação com indivíduos portadores do genótipo GG (SALIMI *et al.*, 2015). Sumariando os achados para esse polimorfismo, indivíduos controles portadores do genótipo CC possuem níveis séricos de VEGF significativamente menores comparado com portadoras do genótipo GC. Os níveis séricos de VEGF não diferiram significativamente entre os genótipos dos polimorfismos rs699947 C>A e rs1570360 G>A. No entanto, mais estudos são necessários para garantir e validar as associações entre os polimorfismos do *VEGF* e a associação com a PE.

Nas pacientes com PE subdivididas em responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva, não foram observadas diferenças significativas nas distribuições de genótipos ou alelos dos polimorfismos rs699947 C>A e rs2010963 G>C entre os grupos (SANDRIM *et al.*, 2015). Esses achados sugerem que os polimorfismos de *VEGF* não afetam a responsividade à terapia anti-hipertensiva na PE. Entretanto, assim como os achados de associação significativos, esses achados também requerem de replicação em outras populações.

8.4. Interações entre polimorfismos de genes relacionados à via induzida pela visfatina (*NAMPT*) quando comparados os grupos controle e PE e subgrupos responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva

A PE é uma desordem multissistêmica e multifatorial, de etiologia complexa e com forte componente genético, e os diferentes genes associados à PE estão inclusos em vias imunológicas, de hemodinâmica, função endotelial, distúrbios trombofílicos, estresse oxidativo e metabolismo lipídico (WILLIAMS E MORGAN, 2012). O componente genético atribuído à herdabilidade da PE varia de 30 a 60% e, embora os estudos genéticos clássicos e mais recentes de GWAS tenham identificado vários genes de susceptibilidade a PE, eles não explicam completamente essa herdabilidade (ARIFF *et al.*, 2019).

Entretanto os métodos estatísticos tradicionais possuem poder limitado para modelar interações não-lineares como o caso das interações gene-gene (MOORE e WILLIAMS, 2002). Nesse contexto, as limitações do modelo linear e de outros modelos paramétricos motivou o uso do MDR, uma ferramenta de mineração de dados utilizada para detectar interações gene-gene (ou epistasia) em estudos de associação genética (MOORE, 2010). O uso do MDR nos permite analisar modelos de interação gene-gene de maneira eficaz em uma doença complexa como é o caso da PE.

No presente trabalho foram avaliadas as possíveis interações entre os SNPs rs1319501 e rs3801266 de *NAMPT*, rs2010963, rs699947 e rs1570360 de *VEGF*, rs2070744 e o VNTR no intron 4 de *NOS3* quando comparados os grupos controle e PE. Além disso, nós também comparamos os subgrupos de pacientes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

As combinações específicas de genótipos de baixo e alto risco classificadas pelo MDR, quando comparado os grupos controle e PE, estão representadas na **Figura 12**, onde é possível observar interações significativas entre genótipos dos polimorfismos rs1319501 T>C de *NAMPT* e rs2010963 G>C de *VEGF* nos grupo controle e pré-eclampsia com (Pontuação do teste = 0.6503, CVC = 8/10 e $P = 0.001 - 0.002$ (**Tabela 4**)).

Tabela 4: Modelo de interação do MDR robusto entre polimorfismos de *VEGF*, *NOS3* e *NAMPT* em pacientes com PE e grupo controle.

Modelos de interação	Pontuação de treinamento	Pontuação do teste	CVC	*P
Grupo controle (n = 100) vs Pré-eclampsia (n = 131)				
<i>VEGF</i> rs2010963	0,6504	0,6422	10/10	0,002*
<i>VEGF</i> rs2010963, <i>NAMPT</i> rs1319501	0,6815	0,6503	08/10	0,002*
<i>NOS3</i> rs2070744, <i>VEGF</i> rs2010963, <i>NAMPT</i> rs1319501	0,6856	0,5947	10/10	0,063

Abreviaturas: CVC: *Cross-validation consistency*; *NAMPT*: Nicotinamida fosforibosiltransferase; MDR: *Multifactor Dimensionality Reduction*; *NOS3*: Sintase endotelial do óxido nítrico 3; PE: Pré-eclampsia; *VEGF*: Fator de crescimento endotelial vascular.

*P < 0,05

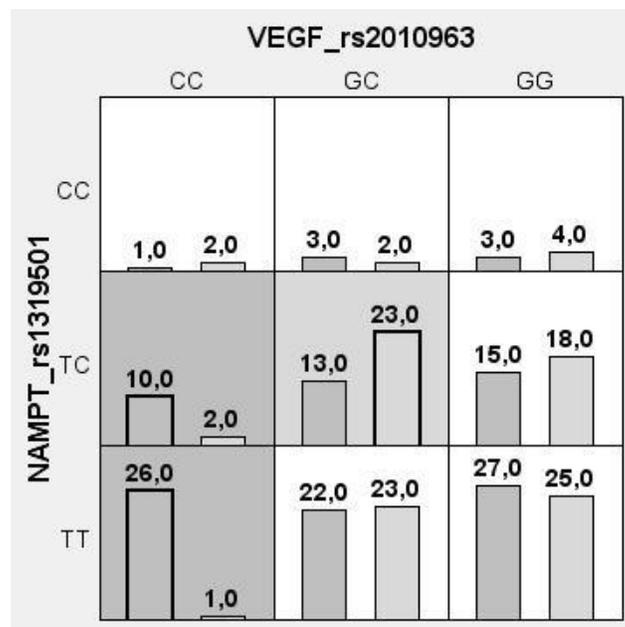


Figura 12: Análise de interação gene-gene quando comparados os grupos controle e PE.

Caselas marcadas em cinza claro e escuro correspondem ao grupo controle e gestantes com PE, respectivamente. O genótipo TC do polimorfismo *NAMPT* rs1319501 combinado com o genótipo CC do polimorfismo *VEGF* rs2010963 foi associado com PE, mas o mesmo genótipo TC de *NAMPT* foi associado com o grupo controle quando combinado ao genótipo GC do polimorfismo *VEGF* rs2010963.

A combinação do genótipo GC do SNP rs2010963 do *VEGF* com o genótipo TC do SNP rs1319501 de *NAMPT* é mais frequente em gestantes do grupo controle. Por outro lado, a associação com a doença ocorre ou não, devido a mudança de um alelo no polimorfismo rs2010963 G>C do *VEGF*, onde o genótipo GC em pacientes controles poderia levar a níveis séricos de VEGF significativamente maiores comparado com portadores do genótipo CC. Entretanto, o mesmo, possui maior frequência em pacientes com PE grave juntamente com o genótipo CC, se comparado com PE leve e controles (SALIMI *et al.*, 2015). Os genótipos TC+CC do polimorfismo rs1319501 T>C localizado no promotor de *NAMPT*, por sua vez, já foram associados com níveis mais baixos de visfatina em pacientes com PE não responsivas à terapia anti-hipertensiva (LUIZON *et al.*, 2017a) e o alelo C e o genótipo CC já foram caracterizados como mais frequentes em grupo de gestantes controle quando comparado com grupo de gestantes com PE (LUIZON *et al.*, 2015).

O genótipo CC, que apresenta mudança de um alelo do polimorfismo rs2010963 G>C do *VEGF* e sua combinação com o mesmo genótipo TC do polimorfismo rs1319501 de *NAMPT* interagem entre si em gestantes com PE. O genótipo CC do polimorfismo de *VEGF* foi associado com menores níveis de VEGF em comparação ao genótipo GG e GC em pacientes com PE e controles, respectivamente (SALIMI *et al.*, 2015). Esses achados sugerem que maiores níveis de VEGF em pacientes portadoras do genótipo GC comparando ao CC influência nos casos da doença.

A combinação dos genótipos TT do SNP de *NAMPT* rs1319501 e CC do SNP rs2010963 de *VEGF* está associada a PE e pode ser devido aos menores níveis de VEGF em portadoras do genótipo CC e do relaxamento dependente de endotélio prejudicado promovido pela visfatina/*NAMPT* com a ativação da NADPH oxidase, uma vez que o genótipo TT é o selvagem e suas variações são associadas a menores níveis de visfatina/*NAMPT*.

Afim de se estudar as gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva, foram estudadas as possíveis interações quando comparados esses grupos de pacientes. A **Figura 13** mostra essas combinações específicas de genótipos sendo possível observar interações significativas entre os genótipos dos polimorfismos VNTR 27pb do *NOS3* e rs2010963 G>C de *VEGF* comparando entre os grupos (P=0.013, **Tabela 5**).

Tabela 5: Modelo de interação do MDR robusto entre polimorfismos de *VEGF*, *NOS3* e *NAMPT* em gestantes com pré-eclampsia responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

Modelos de interação	Pontuação de treinamento	Pontuação do teste	CVC	*P
Responsivas (n = 64) vs Não responsivas (n = 67)				
<i>NOS3</i> VNTR	0,5555	0,4663	9/10	0,892
<i>NOS3</i> VNTR, <i>VEGF</i> rs2010963	0,6486	0,6486	10/10	0,013*
<i>NOS3</i> VNTR, <i>VEGF</i> rs2010963, <i>NAMPT</i> rs1319501	0,659	0,6168	10/10	0,076

Abreviaturas: CVC: *Cross-validation consistency*; *NAMPT*: Nicotinamida fosforibosiltransferase; MDR: *Multifactor Dimensionality Reduction*; *NOS3*: Sintase endotelial do óxido nítrico 3; *VEGF*: Fator de crescimento endotelial vascular. VNTR: *Variable number tandem repeat*. *P < 0,05

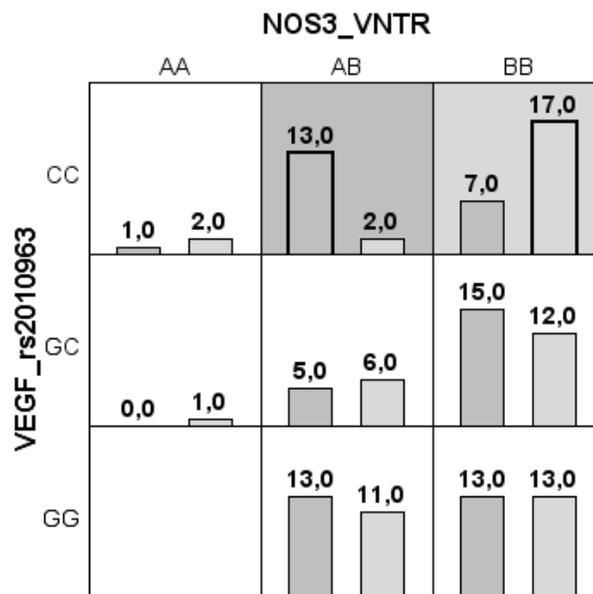


Figura 13: Análise de interação gene-gene quando comparados os grupos de gestantes com PE responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva. Caselas marcadas em cinza claro e escuro correspondem ao grupos de responsivas e não responsivas, respectivamente. O genótipo CC do polimorfismo do *VEGF* rs2010963 combinado ao genótipo AB do polimorfismo de *NOS3* VNTR b/a do polimorfismo *VEGF* rs2010963 foi associado com o grupo de pacientes não responsivas, mas o mesmo genótipo CC de *VEGF* foi associado com o grupo de pacientes responsivas à terapia quando combinado ao genótipo BB do polimorfismo *NOS3* VNTR 27pb.

O modelo de interação que foi mais significativo no MDR quando consideradas pacientes responsivas e não responsivas à terapia anti-hipertensiva foi o modelo que trás interações entre genótipos de polimorfismos de *VEGF* e *NOS3*. O genótipo BB do polimorfismo VNTR 27pb do *NOS3* e sua combinação com o genótipo CC do polimorfismo rs2010936 de *VEGF* interagem entre si em gestantes com pré-eclampsia responsivas. Nesse caso a associação com a resposta ou não resposta ocorre devido a mudança de um alelo do VNTR da *NOS3*, se mantendo o mesmo genótipo do polimorfismo do *VEGF*. A eNOS é a principal sintase do óxido nítrico no sistema vascular (FARAH; MICHEL; BALLIGAND; 2018), ocorrendo a disfunção endotelial quando as células endoteliais perdem ou reduzem a capacidade de liberar NO (FÖRSTERMANN; XIA; LI; 2017). O VNTR com repetições de 27pb tem sua variante b associada com menores quantidades de mRNA da eNOS (DAI *et al.*, 2013).

Em gestantes não responsivas à terapia anti-hipertensiva foi observada interação entre o genótipo AA do VNTR da *NOS3* e a combinação com o mesmo genótipo CC do polimorfismo rs2010936 de *VEGF*. O alelo A desse VNTR já foi associado a alto risco de PE, entretanto, essa variante também está associada a maiores níveis de mRNA da eNOS em comparação com a variante b (DAI *et al.*, 2013).

De fato, haplótipos de eNOS podem afetar a resposta as terapias anti-hipertensivas em pré-eclampsia. O haplótipo “C-Glu-A” envolvendo os polimorfismos rs2070744, rs1799983 e o VNTR b/a, respectivamente, foi associado à resposta a terapia anti-hipertensiva, uma vez que o haplótipo “T-Asp-A”, envolvendo os mesmos polimorfismos foi associado a não responsividade (SANDRIM *et al.*, 2010b).

Os fármacos utilizados para tratar PE são fármacos anti-hipertensivos. A nifedipina, por exemplo, é um bloqueador de canal de cálcio que pode restaurar a biodisponibilidade de NO. A hidralazina, outro fármaco utilizado na PE, mostrou aumentar as concentrações de cGMP nessas gestantes (LUIZON *et al.*, 2017a). Nesse contexto, as pacientes responsivas à terapia anti-hipertensiva possuem o genótipo associado a menores quantidades de mRNA da eNOS. Entretanto, o uso de fármacos anti-hipertensivos pode ter atuado melhorando a biodisponibilidade de NO, melhorando assim a função endotelial. Já o oposto não ocorre com as pacientes não responsivas à terapia, que apesar de possuírem o genótipo associado a maiores quantidades do mRNA da eNOS, não tem a biodisponibilidade de NO, que já é baixa na PE, restaurada pelos fármacos. Essas pacientes por sua vez ainda mostram ter uma pior fisiopatologia quando comparadas as pacientes responsivas à terapia anti-hipertensiva total, como ilustrado na **Tabela 2**. Entretanto são necessários mais estudos para elucidar essas hipóteses.

Pacientes com hipertensão que não respondem ao tratamento médico otimizado, após a exclusão da hipertensão secundária em pacientes que são totalmente aderentes à terapia anti-hipertensiva, são caracterizadas como hipertensos resistentes. Esses pacientes por sua vez apresentam alto risco de complicações e eventos cardiovasculares, se fazendo importante o uso e a pesquisa de biomarcadores para identificar os pacientes com danos precoces em órgãos-alvo (WEI *et al.*, 2018).

9. CONCLUSÃO

Nossos achados mostram que a visfatina/NAMPT tem relação distinta com o nitrito e o sFLT-1 no grupo controle e no grupo PE. Eles sugerem evidência clínica de um efeito inibitório da visfatina/NAMPT na formação de NO na PE e também no grupo de gestantes não responsivas à terapia anti-hipertensiva. As correlações positivas entre a visfatina/NAMPT e o sFLT-1 observadas em pacientes com PE sugerem que as manifestações clínicas da doença podem surgir da interação entre esses dois marcadores.

Nossos achados dão suporte a baixa biodisponibilidade de NO em PE, e sugerem que altos níveis plasmáticos de visfatina/NAMPT não favorecem o aumento da biodisponibilidade de NO em pacientes com PE não responsivas à terapia anti-hipertensiva.

As interações significativas observadas entre genótipos de SNPs dos genes *NAMPT* e *VEGF*, bem como entre genótipos de SNPs dos genes *NAMPT* e *NOS3* sugerem que interações gene-gene na via da visfatina/NAMPT podem afetar o risco à PE e a responsividade à terapia anti-hipertensiva em PE. Nossos achados poderão guiar estudos adicionais de interação gene-gene em vias relevantes para identificação de resposta diferencial à fármacos anti-hipertensivos.

10. REFERÊNCIAS

- ABALOS, Edgardo; DULEY, Lelia; STEYN, D. Wilhelm. Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2014.
- ABDALLA, Said et al. Increased AT 1 receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. **Nature medicine**, v. 7, n. 9, p. 1003, 2001.
- ADALI, Ertan et al. Increased visfatin and leptin in pregnancies complicated by pre-eclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 22, n. 10, p. 873-879, 2009.
- ADYA, Raghu et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signalling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis. **Cardiovascular research**, v. 78, n. 2, p. 356-365, 2007.
- ALFIREVIC, Ana; ALFIREVIC, Zarko; PIRMOHAMED, Munir. Pharmacogenetics in reproductive and perinatal medicine. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 1, p. 65-79, 2010.
- ALPOIM, Patrícia Nessralla et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. **Nitric Oxide**, v. 42, p. 19-23, 2014.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS et al. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' task force on hypertension in pregnancy. **Obstetrics and gynecology**, v. 122, n. 5, p. 1122, 2013.
- ARIFF, Amir et al. Analysis of the Epigenome in Multiplex Pre-eclampsia Families Identifies SORD, DGKI, and ICA1 as Novel Candidate Risk Genes. **Frontiers in genetics**, v. 10, 2019.
- AZEVEDO, Ana Maria Milanez et al. Relationship between asymmetric dimethylarginine, nitrite and genetic polymorphisms: Impact on erectile dysfunction therapy. **Nitric Oxide**, v. 71, p. 44-51, 2017.
- BELO, V. A. et al. The effects of NAMPT haplotypes and metabolic risk factors on circulating visfatin/NAMPT levels in childhood obesity. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 1, p. 130, 2015.
- BENJAMIN, Mina M.; KHALIL, Raouf A. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. In: **Matrix metalloproteinase inhibitors**. Springer, Basel, 2012. p. 209-279.
- BERGSTROM, D. E; Haplotype. **Encyclopedia of Genetics**. Academic Press, 2001, p. 911-912.
- BERZAN, Ecaterina; DOYLE, Ross; BROWN, Catherine M. Treatment of preeclampsia: current approach and future perspectives. **Current hypertension reports**, v. 16, n. 9, p. 473, 2014.

- BOO, Yong Chool et al. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 144-153, 2006.
- BOSIO, Paul M. et al. Maternal plasma vascular endothelial growth factor concentrations in normal and hypertensive pregnancies and their relationship to peripheral vascular resistance. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 184, n. 2, p. 146-152, 2001.
- BOYLE, Alan P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome research**, v. 22, n. 9, p. 1790-1797, 2012.
- BRENNAN, Lesley J.; MORTON, Jude S.; DAVIDGE, Sandra T. Vascular dysfunction in preeclampsia. **Microcirculation**, v. 21, n. 1, p. 4-14, 2014.
- BREW, Keith. Reflections on the evolution of the vertebrate tissue inhibitors of metalloproteinases. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 1, p. 71-87, 2018.
- BREW, Keith; NAGASE, Hideaki. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research**, v. 1803, n. 1, p. 55-71, 2010.
- CAREY, Erica AK et al. AMPK knockdown in placental trophoblast cells results in altered morphology and function. **Stem cells and development**, v. 23, n. 23, p. 2921-2930, 2014.
- CERDEIRA, A. S. et al. Angiogenic factors: potential to change clinical practice in pre-eclampsia?. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 125, n. 11, p. 1389-1395, 2018.
- CHAPPELL, Sally; MORGAN, Linda. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. **Clinical science**, v. 110, n. 4, p. 443-458, 2006.
- CHEN, Juanjuan; KHALIL, Raouf A. Matrix metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia. In: **Progress in molecular biology and translational science**. Academic Press, 2017. p. 87-165.
- CHENG, Daye et al. Vascular Endothelial Growth Factor+ 936C/T, -634G/C, -2578C/A, and -1154G/A Polymorphisms with Risk of Preeclampsia: A Meta-Analysis. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78173, 2013.
- COHEN, Tzafra et al. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 2, p. 736-741, 1996.
- CORDELL, Heather J. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 6, p. 392, 2009.
- DAI, Bingqin et al. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. **Gene**, v. 519, n. 1, p. 187-193, 2013.

- DAUGHERTY, Stacie L. et al. Incidence and prognosis of resistant hypertension in hypertensive patients. **Circulation**, v. 125, n. 13, p. 1635-1642, 2012.
- DAVIGNON, Jean; GANZ, Peter. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. **Circulation**, v. 109, n. 23 suppl 1, p. III-27-III-32, 2004.
- DEMIR, B. et al. The role of homocysteine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in pre-eclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 32, n. 6, p. 525-528, 2012.
- DENG, Aihua; ENGELS, Kevin; BAYLIS, Chris. Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat. **Kidney international**, v. 50, n. 4, p. 1132-1138, 1996.
- DEROANNE, Christophe F. et al. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. **Cancer research**, v. 57, n. 24, p. 5590-5597, 1997.
- DICHI, Isaias et al. **Role of oxidative stress in chronic diseases**. CRC Press, 2014.
- DING, Yaoxian; VAZIRI, Nosratola D. Nifedipine and diltiazem but not verapamil up-regulate endothelial nitric-oxide synthase expression. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 292, n. 2, p. 606-609, 2000.
- EMDIN, Connor A. et al. Phenotypic consequences of a genetic predisposition to enhanced nitric oxide signaling. **Circulation**, v. 137, n. 3, p. 222-232, 2018.
- EREMINA, Vera et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 5, p. 707-716, 2003.
- ESPLIN, M. Sean et al. The use of cDNA microarray to identify differentially expressed labor-associated genes within the human myometrium during labor. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 193, n. 2, p. 404-413, 2005.
- FACEMIRE, Carie S. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 652-658, 2009.
- FASSHAUER, Mathias et al. Serum levels of the adipokine visfatin are increased in pre-eclampsia. **Clinical endocrinology**, v. 69, n. 1, p. 69-73, 2008.
- FERRARA, Napoleone et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. 1996.
- FERRARA, Napoleone; GERBER, Hans-Peter; LECOATER, Jennifer. The biology of VEGF and its receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 669, 2003.
- FERREIRA, A. F. A. *et al.* Maternal serum visfatin at 11–13 weeks' gestation in preeclampsia. **Journal of human hypertension**, v. 27, n. 4, p. 261, 2013.

- FOLK, Diane M. Hypertensive Disorders of Pregnancy: Overview and Current Recommendations. **Journal of midwifery & women's health**, 2018.
- FORSTERMANN, Ulrich; MUNZEL, Thomas. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708-1714, 2006.
- FÖRSTERMANN, Ulrich; XIA, Ning; LI, Huige. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation research**, v. 120, n. 4, p. 713-735, 2017.
- FUKUHARA, Atsunori et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 426-430, 2005.
- FULTON, David et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597, 1999.
- GARCIÉA, Ronald G. et al. Raised C-reactive protein and impaired flow-mediated vasodilation precede the development of preeclampsia. **American journal of hypertension**, v. 20, n. 1, p. 98-103, 2007.
- GARG, Priyanka et al. Estimation of asymmetric dimethylarginine (ADMA), placental growth factor (PLGF) and pentraxin 3 (PTX 3) in women with preeclampsia. **Pregnancy hypertension**, v. 14, p. 245-251, 2018.
- GILBERT, Jeffrey S. et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2008.
- GILBERT, Jeffrey S. et al. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 infusion lowers blood pressure and improves renal function in rats with placental ischemia-induced hypertension. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 380-385, 2010.
- GONÇALVES, Flavia M. et al. Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and haplotypes in women with migraine. **DNA and cell biology**, v. 29, n. 7, p. 357-362, 2010.
- GUO, Hong-Xia et al. Potential urine biomarkers for gestational hypertension and preeclampsia. **Molecular medicine reports**, 2019.
- HAAS, David M. Pharmacogenetics and individualizing drug treatment during pregnancy. **Pharmacogenomics**, v. 15, n. 1, p. 69-78, 2014.
- HAHN, Lance W.; RITCHIE, Marylyn D.; MOORE, Jason H. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene–gene and gene–environment interactions. **Bioinformatics**, v. 19, n. 3, p. 376-382, 2003.
- HAHN, Lance W.; MOORE, Jason H. Ideal discrimination of discrete clinical endpoints using multilocus genotypes. **In silico biology**, v. 4, n. 2, p. 183-194, 2004.

- HASMANN, Max; SCHEMAINDA, Isabel. FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7436-7442, 2003.
- HIRATSUKA, Sachie et al. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9349-9354, 1998.
- HU, Wensheng et al. Serum visfatin levels in late pregnancy and pre-eclampsia. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, v. 87, n. 4, p. 413-418, 2008.
- HUNTER, Alyson et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 965-969, 2000.
- JUNG, Young D. et al. Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 β in human vascular smooth muscle cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **Angiogenesis**, v. 4, n. 2, p. 155-162, 2001.
- KAHN, Steven E.; HULL, Rebecca L.; UTZSCHNEIDER, Kristina M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840, 2006.
- KARUMANCHI, S. Ananth. Angiogenic factors in preeclampsia: from diagnosis to therapy. **Hypertension**, v. 67, n. 6, p. 1072-1079, 2016.
- KITTS, Adrienne et al. The database of short genetic variation (dbSNP). In: **The NCBI Handbook [Internet]. 2nd edition**. National Center for Biotechnology Information (US), 2014.
- KUBLICKIENE, Karolina R. et al. Preeclampsia: Evidence for impaired shear stress-mediated nitric oxide release in uterine circulation. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 183, n. 1, p. 160-166, 2000.
- LAMARCA, Babbette D.; GILBERT, Jeffery; GRANGER, Joey P. Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 982-988, 2008.
- LAMBRECHTS, Diether et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. **Nature genetics**, v. 34, n. 4, p. 383, 2003.
- LASKOWSKA, Marzena. Altered maternal serum matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 in severe early-and late-onset preeclampsia. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- LAURENTI, Ruy; JORGE, Maria Helena Prado de Mello; GOTLIEB, Sabina Léa Davidson. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 449-460, 2004.

- LAVEE, Michal et al. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in midtrimester amniotic fluid prior to the development of preeclampsia. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 85, 2009.
- LEE, W. J. *et al.* Visfatin-induced expression of inflammatory mediators in human endothelial cells through the NF- κ B pathway. **International journal of obesity**, v. 33, n. 4, p. 465, 2009.
- LI, Xiao Feng et al. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 4, p. 1823-1834, 2001.
- LÓPEZ-JARAMILLO, Patricio et al. Cyclic guanosine 3' 3' monophosphate concentrations in pre-eclampsia: effects of hydralazine. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 103, n. 1, p. 33-38, 1996.
- LUIZON, Marcelo R. et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. **Dna and cell biology**, v. 28, n. 7, p. 329-334, 2009.
- LUIZON, Marcelo R. et al. Epistasis among eNOS, MMP-9 and VEGF maternal genotypes in hypertensive disorders of pregnancy. **Hypertension Research**, v. 35, n. 9, p. 917, 2012.
- LUIZON, M. R. et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 polymorphism, plasma TIMP-1 levels, and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. **The pharmacogenomics journal**, v. 14, n. 6, p. 535, 2014.
- LUIZON, Marcelo R. et al. Effects of NAMPT polymorphisms and haplotypes on circulating visfatin/NAMPT levels in hypertensive disorders of pregnancy. **Hypertension Research**, v. 38, n. 5, p. 361, 2015.
- LUIZON, M. R. et al. Gene–gene interactions in the NAMPT pathway, plasma visfatin/NAMPT levels, and antihypertensive therapy responsiveness in hypertensive disorders of pregnancy. **The pharmacogenomics journal**, v. 17, n. 5, p. 427, 2017a.
- LUIZON, Marcelo R. et al. Pharmacogenetics in the treatment of pre-eclampsia: current findings, challenges and perspectives. **Pharmacogenomics**, v. 18, n. 6, p. 571-583, 2017b.
- LUIZON, Marcelo R.; PEREIRA, Daniela A.; TANUS-SANTOS, Jose E. Pharmacogenetic relevance of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and gene interactions. **Pharmacogenomics**, v. 19, n. 18, p. 1423-1435, 2018.
- LUIZON, Marcelo R.; PEREIRA, Daniela A.; SANDRIM, Valeria C. Pharmacogenomics of hypertension and preeclampsia: focus on gene–gene interactions. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 168, 2018.
- MAGLIONE, Domenico et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 20, p. 9267-9271, 1991.

- MAHARAJ, Arindel SR et al. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. **The American journal of pathology**, v. 168, n. 2, p. 639-648, 2006.
- MANNAERTS, Dominique et al. Oxidative stress and endothelial function in normal pregnancy versus pre-eclampsia, a combined longitudinal and case control study. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 18, n. 1, p. 60, 2018.
- MASUYAMA, Hisashi et al. Circulating angiogenic factors in preeclampsia, gestational proteinuria, and preeclampsia superimposed on chronic glomerulonephritis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 194, n. 2, p. 551-556, 2006.
- MASUYAMA, Hisashi et al. Correlation between soluble endoglin, vascular endothelial growth factor receptor-1, and adipocytokines in preeclampsia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 7, p. 2672-2679, 2007.
- MAZAKI-TOVI, Shali et al. Maternal visfatin concentration in normal pregnancy. **Journal of perinatal medicine**, v. 37, n. 3, p. 206-217, 2009.
- MAZAKI-TOVI, Shali et al. Could alterations in maternal plasma visfatin concentration participate in the phenotype definition of preeclampsia and SGA?. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 23, n. 8, p. 857-868, 2010.
- MAYNARD, Sharon E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 5, p. 649-658, 2003.
- MAYRINK, J.; COSTA, M. L.; CECATTI, J. G. Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. **The Scientific World Journal**, v. 2018, 2018.
- MCKINNEY, Brett A. et al. Machine learning for detecting gene-gene interactions. **Applied bioinformatics**, v. 5, n. 2, p. 77-88, 2006.
- MIYAMOTO, Yoshihiro et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a-786T→C mutation associated with coronary spastic angina. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 18, p. 2629-2637, 2000.
- MONTAGNANA, Martina et al. Evaluation of metalloproteinases 2 and 9 and their inhibitors in physiologic and pre-eclamptic pregnancy. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 23, n. 2, p. 88-92, 2009.
- MOORE, Jason H.; WILLIAMS, Scott M. New strategies for identifying gene-gene interactions in hypertension. **Annals of medicine**, v. 34, n. 2, p. 88-95, 2002.
- MOORE, Jason H. et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. **Journal of theoretical biology**, v. 241, n. 2, p. 252-261, 2006.

- MOORE, Jason H. Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 4, n. 6, p. 795-803, 2004.
- MOORE, Jason H. Genome-wide analysis of epistasis using multifactor dimensionality reduction: feature selection and construction in the domain of human genetics. In: **Knowledge Discovery and Data Mining: Challenges and Realities**. IGI Global, 2007. p. 17-30.
- MOORE, J. H. et al. a Flexible Framework For Data Mining And Knowledge Discovery In Psychiatric Genetics. **American Journal Of Medical Genetics-A**, v. 138, n. 1, p. 6, 2009.
- MOORE, Jason H. Detecting, characterizing, and interpreting nonlinear gene–gene interactions using multifactor dimensionality reduction. In: **Advances in genetics**. Academic Press, 2010. p. 101-116.
- MORI, Toshitaka et al. Adipocytokines and endothelial function in preeclamptic women. **Hypertension Research**, v. 33, n. 3, p. 250, 2010.
- MOTULSKY, Arno G. Drug reactions, enzymes, and biochemical genetics. **Journal of the American Medical Association**, v. 165, n. 7, p. 835-837, 1957.
- MUTTER, Walter P.; KARUMANCHI, S. Ananth. Molecular mechanisms of preeclampsia. **Microvascular research**, v. 75, n. 1, p. 1-8, 2008.
- NAVAJAS, R.; CORRALES, F. J.; PARADELA, A. Serum Exosome Isolation by Size-Exclusion Chromatography for the Discovery and Validation of Preeclampsia-Associated Biomarkers. In: **Proteomics for Biomarker Discovery**. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 39-50.
- NEWBY, Andrew C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 614-624, 2006.
- O'BRIEN, Tara E.; RAY, Joel G.; CHAN, Wee-Shian. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. **Epidemiology**, v. 14, n. 3, p. 368-374, 2003.
- OGNJANOVIC, Simona; BRYANT-GREENWOOD, Gillian D. Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 187, n. 4, p. 1051-1058, 2002.
- PARK, John E. et al. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25646-25654, 1994.
- PAVLOVA, Tereza; NOVAK, Jan; BIENERTOVÁ-VAŠKŮ, Julie. The role of visfatin (PBEF/Nampt) in pregnancy complications. **Journal of reproductive immunology**, v. 112, p. 102-110, 2015.
- PEIRÓ, Concepción et al. Visfatin/PBEF/Nampt: a new cardiovascular target?. **Frontiers in pharmacology**, v. 1, p. 135, 2010.

- PENNINGTON, Kathleen A. et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. **Disease models & mechanisms**, v. 5, n. 1, p. 9-18, 2012.
- PERTOVAARA, Liisa et al. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 9, p. 6271-6274, 1994.
- PHIPPS, Elizabeth A. et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. **Nature Reviews Nephrology**, p. 1, 2019.
- POWE, Camille E.; LEVINE, Richard J.; KARUMANCHI, S. Ananth. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. **Circulation**, v. 123, n. 24, p. 2856-2869, 2011.
- PRIOR, Steven J. et al. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 5, p. H1848-H1855, 2006.
- PROGRAM, National High Blood Pressure Education et al. Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 1, p. s1-s22, 2000.
- PUENTE, Xose S. et al. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 7, p. 544, 2003.
- RAHAT, Beenish et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 152, n. 1, p. 11-22, 2016.
- RANA, Sarosh et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p. 137-142, 2007
- RANA, Sarosh et al. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives. **Circulation research**, v. 124, n. 7, p. 1094-1112, 2019.
- REGA, G. et al. Vascular endothelial growth factor is induced by the inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m in human adipose tissue in vitro and in murine adipose tissue in vivo. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 7, p. 1587-1595, 2007.
- REISTER, Frank et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR. **Journal of perinatal medicine**, v. 34, n. 4, p. 272-279, 2006.
- ROBERTS, James M.; HUBEL, Carl A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. **Placenta**, v. 30, p. 32-37, 2009.
- ROBERTS, J. M. et al. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, St. Louis, v. 161, n. 5, p. 1200-1204, Nov. 1989.

- ROMACHO, Tania; SÁNCHEZ-FERRER, Carlos F.; PEIRÓ, Concepción. Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.
- ROMÃO, Mariana et al. Elevated hyaluronan and extracellular matrix metalloproteinase inducer levels in women with preeclampsia. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 289, n. 3, p. 575-579, 2014.
- SALIMI, Saeedeh et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-634G/C polymorphism was associated with severe pre-eclampsia and lower serum VEGF level. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 41, n. 12, p. 1877-1883, 2015.
- SANDRIM, V. C. *et al.* Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 402-407, 2008a.
- SANDRIM, Valeria C. et al. Vascular endothelial growth factor genotypes and haplotypes are associated with pre-eclampsia but not with gestational hypertension. **Molecular human reproduction**, v. 15, n. 2, p. 115-120, 2008b.
- SANDRIM, Valeria C. et al. Interethnic differences in ADMA concentrations and negative association with nitric oxide formation in preeclampsia. **Clinica chimica acta**, v. 411, n. 19-20, p. 1457-1460, 2010a.
- SANDRIM, V. C. et al. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. **The pharmacogenomics journal**, v. 10, n. 1, p. 40, 2010b.
- SANDRIM, Valeria C. et al. Antihypertensive therapy in preeclampsia is not modulated by VEGF polymorphisms. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 291, n. 4, p. 799-803, 2015.
- SARGENT, Ian L.; BORZYCHOWSKI, Angela M.; REDMAN, Christopher WG. NK cells and human pregnancy—an inflammatory view. **Trends in immunology**, v. 27, n. 9, p. 399-404, 2006.
- SASSER, Jennifer M.; MURPHY, Sydney R.; GRANGER, Joey P. Emerging drugs for preeclampsia—the endothelium as a target. 2015.
- SAVVIDOU, Makrina D. et al. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 361, n. 9368, p. 1511-1517, 2003.
- SHAHBAZI, Majid et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 260-264, 2002.
- SILVA, Pâmela Souza et al. Pharmacogenetic implications of the eNOS polymorphisms for cardiovascular action drugs. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 96, n. 2, p. e27-e34, 2011.

- SPEER, Paul D. et al. Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 198, n. 1, p. 112. e1-112. e7, 2008.
- SPRADLEY, Frank T.; PALEI, Ana C.; GRANGER, Joey P. Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 309, n. 11, p. R1326-R1343, 2015.
- STAINES-URIAS, Eleonora et al. Genetic association studies in pre-eclampsia: systematic meta-analyses and field synopsis. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 6, p. 1764-1775, 2012.
- STERNLICHT, Mark D.; WERB, Zena. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, n. 1, p. 463-516, 2001.
- SHWEIKI, Dorit et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, n. 6398, p. 843, 1992.
- SIBAI, B.; DEKKER, G.; KUPFERMINC, M. Preeclampsia. **Lancet**, London, v. 365, n. 9461, p.785-799, Feb. 2005.
- TADDEI, Stefano et al. Restoration of nitric oxide availability after calcium antagonist treatment in essential hypertension. **Hypertension**, v. 37, n. 3, p. 943-948, 2001.
- TANUS-SANTOS, Jose E.; DESAI, Mehul; FLOCKHART, David A. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 11, n. 8, p. 719-725, 2001.
- TAYEBJEE, Muzahir H. et al. Circulating matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1 and-2 levels in gestational hypertension. **American journal of hypertension**, v. 18, n. 3, p. 325-329, 2005.
- TERSIGNI, C. *et al.* Adipokines: new emerging roles in fertility and reproduction. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 66, n. 1, p. 47-63, 2011.
- VALLEJO, Susana et al. Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. **PLoS one**, v. 6, n. 11, p. e27299, 2011.
- VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22-96, 2017.
- VELICKY, Philipp et al. Pregnancy-associated diamine oxidase originates from extravillous trophoblasts and is decreased in early-onset preeclampsia. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 6342, 2018.

- VESELL, Elliot S. Recent progress in pharmacogenetics. In: **Advances in pharmacology**. Academic Press, 1970. p. 1-52.
- VISSE, Robert; NAGASE, Hideaki. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.
- VOGEL, Friedrich. Moderne probleme der humangenetik. In: **Ergebnisse der inneren medizin und kinderheilkunde**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1959. p. 52-125.
- WANG, Alice; RANA, Sarosh; KARUMANCHI, S. Ananth. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. **Physiology**, v. 24, n. 3, p. 147-158, 2009.
- WEI, Fang-Fei et al. Diagnosis and management of resistant hypertension: state of the art. **Nat Rev Nephrol**, v. 14, n. 7, p. 428-441, 2018.
- WHITLEY, G. St J.; CARTWRIGHT, J. E. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. **Placenta**, v. 31, n. 6, p. 465-474, 2010.
- WILLIAMS, Paula Juliet; MORGAN, Linda. The role of genetics in pre-eclampsia and potential pharmacogenomic interventions. **Pharmacogenomics and personalized medicine**, v. 5, p. 37, 2012.
- WILLIAMS, Paula J.; PIPKIN, Fiona Broughton. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 4, p. 405-417, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 158, n. 1, p. 80-3, 1988.
- YAMAWAKI, H. *et al.* Visfatin causes endothelium-dependent relaxation in isolated blood vessels. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 383, n. 4, p. 503-508, 2009.
- YUAN, Jing et al. Circulating asymmetric dimethylarginine and the risk of preeclampsia: a meta-analysis based on 1338 participants. **Oncotarget**, v. 8, n. 27, p. 43944, 2017.
- ZANGER, Ulrich M. Pharmacogenetics—challenges and opportunities ahead. **Frontiers in pharmacology**, v. 1, p. 112, 2010.
- ZEISLER, Harald et al. Predictive value of the sFlt-1: PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 1, p. 13-22, 2016.
- ZENG, Fangfang et al. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. **Scientific reports**, v. 6, p. 23407, 2016.
- ZHANG, Ming-Xiang et al. Effect of 27nt small RNA on endothelial nitric-oxide synthase expression. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 9, p. 3997-4005, 2008.

- ZHENG, Jing-Jie et al. Assessment of ADMA, estradiol, and progesterone in severe preeclampsia. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 4, p. 347-351, 2016.
- ZHU, Jinqiang et al. Endothelial nitric oxide synthase: a potential therapeutic target for cerebrovascular diseases. **Molecular brain**, v. 9, n. 1, p. 30, 2016.
- ZORBA, E. et al. Visfatin serum levels are increased in women with preeclampsia: a case-control study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 25, n. 9, p. 1668-1673, 2012.
- ZULFIKAROGLU, Ebru et al. Plasma visfatin levels in preeclamptic and normal pregnancies. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 281, n. 6, p. 995-998, 2010.

11. ANEXO I



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 24 de julho de 2009

Ofício nº 2380/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ADIPONECTINA E LEPTINA EM MULHERES COM PRÉ-ECLÂMPSIA"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 291ª Reunião Ordinária realizada em 20/07/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5182/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI
JACKELINE DE SOUZA RANGEL MACHADO (Aluna)
Depto. de Ginecologia e Obstetria