

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LARA CARVALHO GODOI

**PRÉ-ECLÂMPZIA GRAVE: VIA DO FATOR TISSULAR E POLIMORFISMOS NO
GENE DO FATOR VII**

Belo Horizonte - MG
2012

LARA CARVALHO GODOI

**PRÉ-ECLÂMPZIA GRAVE: VIA DO FATOR TISSULAR E POLIMORFISMOS NO
GENE DO FATOR VII**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas.

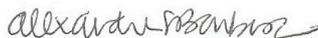
Orientadora: Prof. Dr^a Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Co-orientadora: Prof. Dr^a Karina Braga Gomes Borges.

Belo Horizonte - MG
2012

FOLHA DE APROVAÇÃO**LARA CARVALHO GODOI****"PRÉ-ECLÂMPZIA GRAVE: VIA DO FATOR TISSULAR E POLIMORFISMOS NO GENE DO FATOR VII".**

Tese, como requisito parcial para obter o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e oito de junho de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

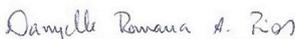
Dr. Alexandre Simões Barbosa - UFMG



Profa. Dra. Milena Soriano Marcolino - UFMG



Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho - UFMG



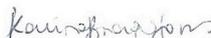
Profa. Dra. Danyelle Romana Alves Rios - UFSJ



Profa. Dra. Maria Carolina Tostes Pintão - Instituto Fleury/SP



Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse - UFMG



Profa. Dra. Karina Braga Gomes - UFMG

Aos que me permitem conhecer as diferentes faces do verdadeiro amor...
Aos meus pais, à minha irmã, ao Carlos e ao meu “amor maior”, que está a caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar com vida e saúde!

À Prof.^a Dr.^a Luci Maria Sant'Ana Dusse, por me orientar e acompanhar em mais uma etapa, reconhecendo sempre os meus limites e me auxiliando na transposição dos obstáculos.

À Prof.^a Dr.^a Karina Braga Gomes Borges, pela orientação, comprometimento com este estudo e pela amizade construída durante estes 4 anos. Você é um exemplo a ser seguido!

À Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Carvalho, exemplo de dedicação e profissionalismo. Serei eternamente grata por conviver e aprender com você!

Às colegas Patrícia Nessralla Alpoim, Fabiana Kalina Marques, Letícia Gonçalves Freitas e Melina de Barros Pinheiro, por dividir comigo a árdua e gratificante tarefa de prospecção das participantes deste estudo.

À Fernanda Fonseca Coelho, por ter se tornado “meu braço direito” na condução dos testes de Biologia Molecular.

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula Salles Moura Fernandes, por estar sempre disponível para colaborar e por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Aos técnicos, alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos dos laboratórios de Hematologia, Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG, por estarem sempre prontos para ajudar e compartilhar.

Às mulheres participantes deste estudo que, voluntariamente, doaram sangue. Obrigada pela confiança depositada!

Às equipes médica e de enfermagem da Maternidade Odete Valadares, do Hospital Público Regional de Betim, do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, do Hospital Municipal Odilon Behrens e da Unidade Básica de Saúde da Família /Guanabara por auxiliar na triagem das gestantes e na coleta de sangue.

Aos bioquímicos e técnicos do laboratório de análises clínicas da Maternidade Odete Valadares, que sempre estiveram dispostos a colaborar na coleta de sangue e na preparação das amostras.

Ao Márcio de Almeida Basques, por acreditar no meu desenvolvimento profissional e acadêmico “simultaneamente”. Trabalhar com você tem sido muito prazeroso!

Ao Prof. Dr. Leonides Rezende Júnior, por me fazer acreditar que os nossos conhecimentos podem ser facilmente aplicados na transposição dos obstáculos. A sua orientação e colaboração foram extremamente valiosos!

À Labtest Diagnóstica SA, pela disponibilização das instalações e equipamentos.

À Ana Luiza Maggi Marcatto pelo auxílio na sensibilização das microplacas.

Aos colegas da Labtest Diagnóstica SA, que sempre torceram pelo sucesso deste estudo e me acompanharam durante toda esta jornada.

Ao Carlos Ranniere, meu grande amigo e companheiro, que nunca mediu esforços para me auxiliar nas coletas, na realização dos testes laboratoriais e para me apoiar em todos os momentos.

À Celene, minha querida irmã, que sempre esteve ao meu lado, disposta a ajudar e a “emprestar” seus talentos.

Aos meus pais, fiéis companheiros e amigos, que sempre estiveram prontos para torcer e apoiar.

Aos familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e torcendo pela realização de mais este sonho. Vocês são muito importantes para mim!

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que, através de pequenos gestos, tornaram possível a realização deste projeto.

*O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.*

Cora Coralina

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE), na forma pura, é caracterizada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria em gestantes normotensas após a vigésima semana de gestação. A PE está associada a um estado de hipercoagulabilidade ainda mais evidente que a condição fisiológica da gravidez. O modelo atualmente aceito para o processo da coagulação destaca o fator tissular (FT) como um componente essencial para iniciar a sequência de reações em cascata, que culmina com a formação do coágulo de fibrina. Quando ocorre lesão vascular, o sangue é exposto ao FT, que se liga ao fator VII (FVII), tornando-o ativado (FVIIa). O complexo FT/FVIIa ativa diretamente os fatores X e IX, o que resulta na geração de trombina e, conseqüentemente, na clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina. O inibidor da via do fator tissular (TFPI) é o principal inibidor endógeno, *in vivo*, da via do FT. Estudos sugerem uma relação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A no gene do FVII e os níveis plasmáticos desse fator. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação dos níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa, a presença de polimorfismos nos genes do FVII e a ocorrência de PE grave. Foram avaliadas 335 mulheres, das quais 109 eram gestantes com PE grave (grupo I), 106 gestantes normotensas (grupo II) e 120 mulheres não gestantes (grupo III). A comparação dos níveis de FT nos três grupos não mostrou diferença (333,91; 290,13 e 392,95 pg/mL para os grupos I, II e III respectivamente). Os níveis plasmáticos de TFPI (83,48; 56,09 e 46,29 ng/mL para os grupos I, II e II respectivamente), FVII (521,88; 294,63 e 134,85 ng/mL para os grupos I, II e II respectivamente) e FVIIa (88,68; 67,78 e 45,28 mU/mL para os grupos I, II e II respectivamente) foram significativamente maiores no grupo I quando comparado aos grupos II ($p < 0,001$; 0,001 e 0,014, respectivamente) e III ($p < 0,001$, nos três casos). A comparação entre os grupos I e II, agrupando a idade gestacional, revelou níveis mais elevados de TFPI e de FVII no grupo I, quando comparado ao grupo II, em todas as faixas de idade gestacional avaliadas. O FVIIa não apresentou diferença nesta comparação. A correlação dos grupos I x II, I x III e II x III por meio da avaliação da curva ROC, revelou que o TFPI, FVII e FVIIa são capazes de distinguir gestantes com PE grave ou normotensas de mulheres não gestantes, mas não são capazes de distinguir gestantes com PE grave de gestantes normotensas. A frequência genotípica dos polimorfismos -

401G/T e -402G/A não apresentou diferença comparando-se os três grupos. Os polimorfismos avaliados não estão associados à alteração dos níveis plasmáticos do FVII nas gestantes com PE grave. O alelo -401T foi mais frequente no grupo com PE grave e mostrou-se associado à redução dos níveis plasmáticos do FVII quando as mulheres foram avaliadas em conjunto.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, Fator tissular, Fator VII, Fator VII ativado, Inibidor da via do fator tissular, Polimorfismos no gene do fator VII.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE), in its pure form, is characterized by the onset of hypertension and proteinuria in normotensive pregnant women, after the twentieth week of pregnancy. The PE is associated with a hypercoagulable state even more evident than the physiological condition of pregnancy. The actual model accepted for the blood coagulation process detaches the tissue factor (TF) as the essential factor to trigger the coagulation cascade pathway, which leads to fibrin blood clot formation. When vascular damage occurs, blood is exposed to TF that binds to factor VII (FVII), activating it (FVIIa). The TF/FVIIa complex activates directly factors X and IX, resulting in thrombin generation and consequently in fibrinogen cleavage into fibrin monomers. The tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is the main endogenous inhibitor, *in vivo*, of the TF pathway. Previous studies suggested a relation between FVII gene polymorphisms, -402GA and -401GT, and its plasma levels. The aim of this study was to evaluate TF, TFPI, FVII and FVIIa plasma levels, the FVII gene polymorphisms and the occurrence of severe PE. A group of 335 women were evaluated, of whom 109 were pregnant with severe PE (group I), 106 normotensive pregnant women (group II) and 120 nonpregnant women (group III). The comparison of the TF levels did not show any difference among the three groups (333,91; 290,13 e 392,95 pg/mL para os grupos I, II e III respectively). The TFPI (83,48; 56,09 e 46,29 ng/mL para os grupos I, II e II respectively), FVII (521,88; 294,63 e 134,85 ng/mL para os grupos I, II e II respectively) e FVIIa (88,68; 67,78 e 45,28 mU/mL para os grupos I, II e II respectively) plasma levels were significantly higher in group I when compared to group II ($p < 0,001$; 0,001 and 0,014, respectively) and III ($p < 0,001$, in all cases). The comparison between groups I and II, grouping by the pregnancy age, showed an increase of TFPI and FVII in group I, when compared to group II, in all ranges of pregnancy age evaluated. FVIIa did not show difference in this comparison. The correlation between the groups I x II, I x III and II x III by evaluating the ROC curve, showed that TFPI, FVII and FVIIa are able to distinguish pregnant with severe PE or normotensive pregnant from nonpregnant women, but they are not able to distinguish pregnant with severe preeclampsia from normotensive pregnant. The genotypic frequency of the polymorphisms -401G/T and -402G/A did not show differences when comparing the three groups. The polymorphisms evaluated are not

associated with changes in FVII plasma levels in pregnant women with severe PE. The allele -401T was more frequent in the group with severe PE and was associated with the decrease of FVII plasma levels when the women were evaluated together.

Keywords: Preeclampsia, tissue factor, factor VII, factor VII activated, tissue factor pathway inhibitor, factor VII gene polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

- 1** Novo modelo da coagulação. (A) Iniciação da coagulação em células que expressam FT. (B) Amplificação do sinal procoagulante a partir da trombina gerada. (C) Propagação da trombina gerada na superfície plaquetária..... **35**
- 2** Padrões de fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonucleases de restrição..... **59**
- 3** Níveis plasmáticos de FT (pg/mL), TFPI (ng/mL), FVII (ng/mL) e FVIIa (mU/mL) nos grupos I (gestantes com PE grave), II (gestantes normotensas) e III (mulheres não gestantes)..... **72**

LISTA DE QUADROS

1	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do segmento genômico do FVII.....	57
2	Volume e concentração de cada um dos componentes utilizados na PCR para amplificação de fragmento genômico do FVII.....	57
3	Condições de reação para amplificação de fragmento genômico específico do FVII..	58
4	Enzimas de restrição utilizadas na digestão do fragmento específico.....	58
5	Condições de digestão do produto de PCR de fragmento genômico do FVII.....	58
6	Interpretação do resultado para o polimorfismo -402G/A, considerando o resultado do polimorfismo -401G/T.....	60

LISTA DE TABELAS

1 Características clínicas das integrantes do estudo	68
2 Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave.....	70
3 Níveis plasmáticos de FT (pg/mL), TFPI (ng/mL), FVII (ng/mL) e FVIIa (mU/mL) para os grupos I, II e III.....	72
4 Níveis plasmáticos de TFPI (ng/mL) para os grupos I e II, agrupados de acordo com a idade gestacional.....	73
5 Níveis plasmáticos de FVII (ng/mL) para os grupos I e II, agrupados de acordo com a idade gestacional.....	74
6 Níveis plasmáticos de FVIIa (mU/mL) para os grupos I e II, agrupados de acordo com a idade gestacional.....	75
7 Área sob a curva para os marcadores hemostáticos FT, TFPI, FVII e FVIIa.....	76
8 Frequência genotípica do polimorfismo -402G/A nos três grupos avaliados.....	77
9 Frequência alélica do polimorfismo -402G/A nos três grupos avaliados.....	77
10 Frequência genotípica do polimorfismo -401G/T nos três grupos avaliados.....	77
11 Frequência alélica do polimorfismo -401G/T nos três grupos avaliados.....	78
12 Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII.....	79
13 Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII.....	79
14 Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo I.	80
15 Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo I.	80
16 Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo II	80
17 Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo II	81
18 Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo III.....	81
19 Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo III.....	82
20 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A.....	83
21 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A, no grupo I	83
22 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A, no grupo II.....	84
23 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A, no grupo III.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADAMTS 13	<i>A Disintegrin and Metalloprotease with eight Thrombospondin-1-like-member 13</i>
ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanina amino transferase
Alt FT	Variante alternativa do fator tissular
AST	Aspartato amino transferase
AT	Antitrombina
AUC	Área sob curva
C	Citosina
Ca ⁺⁺	Íons Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CID	Coagulação intravascular disseminada
CIUR	Crescimento intra-uterino restrito
D-Di	Dímero D
DI	Diferença interquartílica
Diast.	Diastólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF-like	Semelhante ao fator de crescimento epidermal
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>Electromobility Shift Assay</i>
f-TFPI	Forma livre do inibidor da via do fator tissular
FII	Fator II
FIIa	Trombina
FIX	Fator IX
FIXa	Fator IX ativado
FT	Fator tissular
FT/FVII:FVIIa	Complexo fator tissular/fator VII:fator VII ativado

FT/FVIIa	Complexo fator tissular/fator VII ativado
FTa	Fator tissular ativado
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVII:c	Fator VII com atividade coagulante
FVIIa	Fator VII ativado
FVIIa/AT	Complexo fator VII ativado/antitrombina
FVIIag	Fator VII total
FVIII	Fator VIII
FVIII/FvW	Complexo Fator VIII/Fator von Willebrand
FVIIIa	Fator VIII ativado
FvW	Fator vonWillebrand
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXa/FVa	Complexo protrombinase
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII
G	Guanina
Gla	Ácido gama carboxiglutâmico
GP	Glicoproteína
GPG	Ganho de peso na gravidez
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteínas plasmáticas de alta densidade
HELLP	<i>Haemolysis, elevated liver enzyme activity, low platelets</i>
Hm	Hemácia
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular
Ht	Hematócrito
IG	Idade gestacional
IL-1	Interleucina 1
IMC	Índice de massa corporal

KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
LDH	Desidrogenase láctica
LDL	Lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade
LP(a)	Lipoproteína a
LPS	Lipopolissacárides
LRP	Receptor de LDL ligado à proteína
Met.	Metodologia
MP	Micropartículas
MTHFR	Metilenotetrahidrofolatoredutase
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
Oligo A	Oligonucleotídeo iniciador antissenso
Oligo S	Oligonucleotídeo iniciador senso
PA	Pressão arterial
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PAR-2	Receptor ativado por protease tipo 2
PC	Proteína C
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
PDF	Produto de degradação da fibrina
PE	Pré-eclâmpsia
PF3	Fator plaquetário 3
PF4	Fator plaquetário 4
PGI ₂	Prostaciclina
PK	Pré-caliceína
PN	Proteína nexina
PP5	Proteína placentária 5
PS	Proteína S
Q	Glutamina
R	Arginina
R353Q	Substituição de uma arginina por uma glutamina na posição 353 da proteína (fator VII)

RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
rsTF	Fator Tissular recombinante solúvel
Sem.	Semanas
Sist.	Sistólica
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
T	Timina
t-PA	Ativador de plasminogênio tipo tecidual
TAT	Complexo trombina/antitrombina
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TFPI-1	Inibidor da via do fator tissular tipo 1
TFPI-2	Inibidor da via do fator tissular tipo 2
TM	Trombomodulina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo alfa
TP	Tempo de protrombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativado
u-PA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
β -TG	β -tromboglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Pré-eclâmpsia	24
2.2 Fator tissular	27
2.3 Inibidor da via do fator tissular	29
2.4 Fator VII	31
2.5 Polimorfismos no gene do FVII	31
2.6 Coagulação sanguínea	33
2.7 Alterações hemostáticas na gravidez	41
2.7.1 Fator tissular e gravidez	41
2.7.2 Inibidor da via do fator tissular e gravidez	43
2.7.3 Fator VII e gravidez	44
2.8 Alterações hemostáticas na pré-eclâmpsia	45
2.8.1 Fator tissular e pré-eclâmpsia	48
2.8.2 Inibidor da via do fator tissular e pré-eclâmpsia	49
2.8.3 Fator VII e pré-eclâmpsia	50
3 OBJETIVOS	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Aspectos éticos	52
4.2 Casuística	52
4.2.1 Seleção das integrantes do estudo	52
4.2.2 Critérios de inclusão	53
4.2.3 Critérios de exclusão	54
4.3 Material	55
4.3.1 Amostra biológica	55
4.4 Métodos	55
4.4.1 Extração de DNA	55
4.4.2. Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i> - PCR) e polimorfismo de fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - RFLP)	56

4.4.2.1 PCR para amplificação do segmento genômico específico.....	56
4.4.2.2 Polimorfismo de fragmento de restrição	58
4.4.3 Avaliação do perfil hemostático	60
4.4.3.1 Determinação do fator tissular	60
4.4.3.2 Determinação do inibidor da via do fator tissular	61
4.4.3.3 Determinação do fator VII da coagulação.....	62
4.4.3.4 Determinação do fator VII ativado	65
4.5 Análise estatística	66
5 RESULTADOS	68
5.1 Características clínicas das integrantes dos três grupos avaliados.....	68
5.2 Parâmetros laboratoriais e clínicos do Grupo I	69
5.3 Parâmetros hemostáticos dos três grupos avaliados	71
5.4 Frequência dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos três grupos avaliados	76
5.5 Relação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T e os níveis plasmáticos de FVII	78
5.5.1 Níveis plasmáticos de FVII x presença dos polimorfismos -402G/A e - 401G/T.....	78
5.5.2 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -402G/A e - 401G/T.....	82
6 DISCUSSÃO.....	86
6.1 Características clínicas dos três grupos avaliados	86
6.2 Parâmetros laboratoriais do Grupo I	87
6.3 Parâmetros hemostáticos dos três grupos avaliados	89
6.4 Frequência dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos três grupos avaliados	95
6.5 Relação dos polimorfismos -402G/A e -401 G/T e os níveis plasmáticos de FVII.....	96
6.6 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T	98
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	100
8 CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS.....	118

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A pré-eclâmpsia (PE), na sua forma pura, é caracterizada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria em gestantes normotensas, após a vigésima semana de gestação. Clinicamente, é importante distinguir a forma grave da PE, na qual a sintomatologia é mais acentuada, podendo evoluir para manifestações clínicas mais sérias como a eclâmpsia, síndrome HELLP (*Haemolysis, elevated liver enzyme activity, low platelets*) e coagulação intravascular disseminada (CID).

A PE constitui a principal causa de morte materna em diversos países do mundo e contribui significativamente para a prematuridade, o baixo peso fetal e o aumento da mortalidade neonatal. Esta doença está associada a um elevado custo social, uma vez que, frequentemente, resulta na internação da gestante e do recém-nascido por vários dias.

A PE ocorre naturalmente apenas em seres humanos e primatas superiores, e sua etiologia é ainda desconhecida. O único tratamento efetivo para esta doença consiste na interrupção da gravidez e retirada da placenta. Em muitos casos, esta medida precisa ser tomada prematuramente, visando garantir a vida da mãe, do bebê ou de ambos.

A PE está associada a um estado de hipercoagulabilidade ainda mais evidente que a condição fisiológica da gravidez.

O novo entendimento do processo da coagulação destaca o fator tissular (FT) como um componente essencial para disparar a sequência de reações em cascata que culmina com a formação do coágulo de fibrina. Além desta importante função hemostática, o FT tem um papel crucial na gestação, sendo imprescindível para o desenvolvimento embrionário e placentário. O FT é expresso em células de vários órgãos e não está em contato com o sangue em condições fisiológicas. Quando ocorre uma lesão mecânica ou química da parede vascular, o sangue é exposto ao FT, que se liga ao fator VII (FVII), tornando-o ativado (FVIIa). O complexo fator tissular/ fator VII:fator VII ativado (FT/FVII:FVIIa) ativa diretamente os fatores X e IX, na presença de íons cálcio (Ca^{++}), resultando na geração de trombina e, conseqüentemente, na clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina. A localização do FT na membrana celular permite que o coágulo permaneça fixado ao local da lesão, o que pode explicar porque a coagulação não dissemina do seu local

de início. O inibidor da via do fator tissular ou *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) é o principal inibidor endógeno, *in vivo*, da via do FT.

Estudos sugerem uma relação entre a presença dos polimorfismos -401G/T e -402G/A no gene do FVII e os níveis plasmáticos desse fator. O alelo -401T está associado à redução dos níveis plasmáticos de FVII e o alelo -402A está associado ao aumento desses.

Sabendo que a PE cursa com um estado de hipercoagulabilidade ainda mais exacerbado que aquele fisiológico da gravidez de risco habitual, é importante investigar se mulheres carreadoras destes polimorfismos apresentam uma predisposição a tal doença.

Uma grande limitação dos estudos referentes à PE é representada pela dificuldade do seu diagnóstico precoce. Vários marcadores laboratoriais têm sido propostos para este fim. Embora alguns exames auxiliares façam parte da monitorização da gestante com suspeita de PE, efetivamente o diagnóstico é feito pela medida da pressão arterial e determinação da proteinúria. Considerando a dificuldade diagnóstica da doença, a rigidez na aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, bem como a eliminação de todos os casos duvidosos é fundamental para a segurança na constituição do grupo de gestantes com PE.

A avaliação laboratorial de marcadores hemostáticos está sujeita a erros na fase pré-analítica. No presente estudo, cuidados foram tomados no ato da coleta de sangue, no processo de separação e armazenamento das amostras de plasma e nos procedimentos adotados para as análises laboratoriais, de modo a minimizar os erros pré-analíticos.

Sabendo que alguns parâmetros hemostáticos sofrem alterações ao longo da gestação, a idade gestacional é de fundamental importância para a comparação dos resultados obtidos e estabelecimento das conclusões.

A principal motivação para a realização deste estudo foi contribuir para o entendimento das alterações hemostáticas na PE, associadas à via do fator tissular, por meio da avaliação dos níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa. Além disso, a associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A no gene do FVII e a ocorrência de PE na forma grave foi investigada.

Cumprе ressaltar que uma vasta revisão da literatura revelou que os polimorfismos -401G/T e -402G/A foram avaliados em pacientes com doença coronariana, tromboembolismo venoso, câncer e em outras populações. No entanto,

não foram encontrados estudos que investigaram tais polimorfismos em gestantes com PE, o que confere ineditismo ao presente estudo.

Considerando a importância atribuída recentemente à via do fator tissular no processo hemostático e a exacerbação da coagulação na PE, torna-se extremamente relevante conduzir estudos objetivando o maior entendimento do processo de coagulação nessa doença. Considerando, ainda, que a PE é uma doença de caráter multifatorial e que os fatores genéticos podem estar associados à sua ocorrência, é importante esclarecer tal associação. O estabelecimento do potencial de marcadores laboratoriais para monitorar a condição hemostática de pacientes com PE poderá contribuir para a adoção de medidas importantes para sua monitoração.

Sabendo da complexidade da PE, bem como das lacunas existentes na literatura com relação à sua etiologia, diagnóstico e tratamento, este estudo se justifica plenamente, podendo gerar conhecimentos adequados à nossa realidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pré-eclâmpsia

A PE caracteriza-se pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria, após a vigésima semana de gestação, em gestante previamente normotensa.

De acordo com o *Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (2000) e o *The American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG Practice Bulletin* (2002), os parâmetros para diagnóstico da PE são:

- Hipertensão: pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg, em no mínimo duas ocasiões. O intervalo entre as medições não deve ser inferior a duas horas ou superior a uma semana.
- Proteinúria: excreção de proteína $\geq 0,3$ g em urina de 24 horas ou ≥ 30 mg/dL ($\geq +1$ pelo método qualitativo de fita) em amostras isoladas.

Na ausência de proteinúria, pode-se suspeitar de PE quando a hipertensão gestacional estiver acompanhada de edema que acomete mãos e/ou face, cefaleia, distúrbios visuais, dor abdominal, plaquetopenia e/ou alteração da atividade das enzimas hepáticas.

Clinicamente, é importante diagnosticar a forma grave da PE, cujos parâmetros para diagnóstico consistem em (PERET *et al.*, 2009):

- Hipertensão: pressão arterial sistólica ≥ 160 mmHg ou pressão arterial diastólica ≥ 110 mmHg, em no mínimo duas ocasiões. O intervalo entre as medições não deve ser inferior a seis horas ou superior a uma semana.
- Proteinúria: excreção de proteína ≥ 2 g em urina de 24 horas ou $\geq +2$ pelo método qualitativo de fita, em amostras isoladas (coletadas em intervalo de no mínimo 4 horas), ou outros sinais e/ou sintomas de lesão de órgãos alvo.

Na PE grave, a gestante pode apresentar oligúria, com eliminação de menos de 500 mL de urina em 24 horas, distúrbios visuais ou cerebrais, edema pulmonar ou cianose e trombocitopenia. A PE pode evoluir para casos ainda mais complexos como a eclâmpsia (caracterizada por hipertensão, proteinúria, edema e convulsões, que podem evoluir para o coma), a síndrome HELLP (caracterizada por hemólise,

alteração das enzimas hepáticas e plaquetopenia), ou para a CID (*WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY*, 2000).

Embora alguns exames auxiliares façam parte da monitorização da gestante com suspeita de PE, o diagnóstico é feito efetivamente pela medida da pressão arterial e determinação da proteinúria.

A medida da pressão arterial está sujeita a alterações associadas à postura corporal e ausência de repouso prévio e mostra-se elevada se a gestante estiver ansiosa ou estressada.

A proteinúria é normalmente detectada por meio de fita reagente, uma vez que a determinação em urina de 24 horas é um método demorado. A detecção da proteinúria por meio de fita reagente pode fornecer resultados falsamente positivos se a urina estiver muito alcalina ou contaminada com amônia quaternária, clorhexidina bem como pelo corrimento vaginal (DAVEY e MACGILLIVRAY, 1988). Isto demonstra a dificuldade diagnóstica da PE, o que pode resultar em assistência médica não apropriada durante o pré-natal, além de constituir um fator de confusão importante no estudo desta doença.

Um estudo conduzido por Lindheimer *et al.* (1975) revela que a análise de material obtido por biópsia renal mostrou a presença de outras doenças renais em 20 a 40% dos casos diagnosticados como PE.

Embora os sintomas da PE se manifestem após a vigésima semana de gestação, atualmente tem sido aceito que a patogênese é estabelecida muito antes e ocorre em duas fases. A primeira fase se dá nas primeiras 12 semanas de gestação quando ocorre diferenciação dos trofoblastos, invasão da decídua e remodelamento das artérias espiraladas de forma defeituosa. Isto resulta na entrada abrupta do sangue materno no espaço intervilo que danifica mecanicamente os sinciotrofoblastos. A segunda fase, que ocorre no segundo ou terceiro trimestres, resulta da hipoperfusão e isquemia placentária. A placenta isquêmica libera citocinas e radicais livres do oxigênio que induz em disfunção endotelial materna sistêmica e a excessiva resposta inflamatória (KHONG *et al.*, 1986; WALKER, 2000).

A PE afeta a gestante e o feto e o único tratamento definitivo consiste na interrupção da gravidez. Em muitas das vezes esta medida é tomada prematuramente, visando garantir a vida da mãe, do bebê ou de ambos. Estudos randomizados têm sido desenvolvidos visando a obtenção de uma alternativa terapêutica para a PE e incluem o uso de aspirina, heparina, concentrado de

antitrombina, agentes anti-plaquetas, cálcio, L-arginina, óleo de peixe ou de vitaminas. No entanto, todos estes estudos apresentam limitações, especialmente em relação ao número de gestantes avaliadas e os resultados mostram pouco ou nenhum benefício (AAGAARD-TILLERY e BELFORT, 2005).

A PE ocorre naturalmente apenas em seres humanos e primatas superiores. No entanto, vários modelos animais têm sido utilizados para induzir a doença, mas, em nenhum desses são observadas todas as alterações que ocorrem em humanos (MCCARTHY *et al.*, 2011).

A PE constitui a principal causa de morte materna em diversos países do mundo e contribui significativamente para a prematuridade, o baixo peso fetal e o aumento da mortalidade neonatal. Esta doença é mais comum em primigestas, em mulheres múltíparas que engravidaram de um novo parceiro e em mulheres submetidas à fertilização *in vitro* (na qual foram utilizados óvulos de outra mulher), na gravidez múltipla, em diabéticas e na presença de mola hidatiforme, o que sugere que a presença da placenta é necessária e suficiente para causar a doença. A PE está associada a um elevado custo social, pois, via de regra, resulta na internação da gestante e/ou do recém-nascido por um longo período (WALKER, 2000).

Embora muito estudada, a etiologia da PE ainda não está esclarecida. Várias manifestações como a resistência à insulina, a trombofilia, a estimulação do sistema nervoso simpático, a alteração na resposta imune e a alteração no sistema renina-angiotensina são sugeridas como responsáveis pelo desenvolvimento da PE. Na prática, a lesão e o espasmo vascular e, conseqüentemente, a hipoperfusão placentária são as manifestações mais características da doença (WALKER, 2000; KANAYAMA *et al.*, 2003).

A PE está associada à vasoconstrição arteriolar, que aumenta a resistência ao fluxo sanguíneo e, dessa forma, explica o aparecimento de hipertensão. Com o aumento da resistência periférica e a ocorrência da hipertensão, o volume plasmático é reduzido, por perdas para o espaço extravascular, resultando no aparecimento do edema e na hemoconcentração. A hemoconcentração, por sua vez, compromete a velocidade do fluxo sanguíneo, predispondo à ativação das plaquetas e dos fatores de coagulação. As plaquetas ativadas medeiam a ligação de leucócitos, promovendo a ativação de neutrófilos e a conseqüente produção de radicais livres do oxigênio, que contribuem para a lesão endotelial. Além disso, a

interação plaqueta-monócito resulta em um aumento da expressão do FT do monócito e na ativação da coagulação (ROBERTS e LAIN, 2002).

2.2 Fator tissular

O FT é o ativador fisiológico primário da coagulação sanguínea. Este fator, conhecido também como fator III da coagulação, tromboplastina tecidual ou CD142 é uma glicoproteína transmembrana composta por três domínios distintos. O primeiro deles é constituído por 19 aminoácidos e está localizado no citoplasma da célula, o segundo, transmembrana, possui 23 resíduos e o maior deles, extracelular, possui 219 resíduos (DOSHI e MARMUR, 2002; KRIKUN *et al.*, 2009). O domínio extracelular é o mais importante para a atividade hemostática, por conter a região para a interação com o FVII e FVIIa. A porção transmembrana é necessária para a estabilização da molécula e a porção citoplasmática ainda não tem a sua função completamente determinada (HIGASHI e IWANAGA, 1998; PRICE *et al.*, 2004).

O FT é expresso constitutivamente no subendotélio vascular, nas células musculares lisas da parede do vaso e nas células de vários órgãos, como cérebro, pulmão, rim, baço e fígado e não está em contato com o sangue em condições fisiológicas (BUTENAS *et al.*, 2005). No entanto, estas células não expressam FT funcional e não dispõem de estoques intracelulares desse fator. Em resposta a estímulos, estas células expressam FT ativo via transcrição (WILCOX *et al.*, 1989). Estes estímulos incluem lipopolissacárides (LPS), linfócitos ativados, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) oxidadas, fator plaquetário 4 (PF4), P-selectina, homocisteína, dentre outras. Normalmente, o FT está internalizado nas células e sua concentração circulante é muito baixa e insuficiente para ativar o FVII (PRICE *et al.*, 2004).

As células que expressam FT regulam essa expressão por um mecanismo denominado *encryption*, que consiste no aumento significativo da atividade do FT na célula, sem um aumento concomitante do antígeno FT. O *encryption* resulta de estímulos dados por Ca^{++} , peróxido de hidrogênio, ciclohexamida ou *in vitro*, por sucessivos ciclos de congelamentos e descongelamentos das células, dentre outros.

Estes estímulos promovem alterações na morfologia celular, na expressão de lípidos da membrana, bem como alterações na própria molécula de FT. A regulação deste fenômeno é devida, em parte, à dimerização de moléculas de FT na membrana das células, uma vez que os dímeros de FT são inativos. A reversão dos dímeros em monômeros resgata a atividade do FT (BACH e MOLDOW, 1997).

Quando ocorre lesão mecânica ou química da parede vascular, o sangue é exposto ao FT, que se liga ao FVII, tornando-o ativado. Esta ligação é acelerada por fosfolípidos e ácidos, tais como a fosfatidilserina. O complexo FT/FVII:FVIIa ativa diretamente os fatores X (FX) e IX (FIX), na presença de Ca^{++} , resultando na geração de trombina (FIIa) e, conseqüentemente, na clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina. A localização do FT na membrana celular permite que o coágulo permaneça fixado ao local da lesão, o que pode explicar porque a coagulação não dissemina do seu local de início (NEMERSON, 1992).

A expressão e a função do FT na superfície celular são controladas por dois principais mecanismos, o primeiro deles é a *encryption* e o segundo é liderado pelos inibidores específicos presentes no plasma, particularmente o TFPI (MACKMAN, 1995; BACH e MOLDOW, 1997; RAO e PENDURTHI *apud* KRIKUN *et al.*, 2009).

Sob condições patológicas, tais como aterosclerose e alguns tipos de câncer ou inflamação, as células endoteliais e os monócitos circulantes, em resposta a vários estímulos, expressam FT em suas superfícies (SMITH, 2009). Várias substâncias, tais como endotoxina, fator de necrose tumoral tipo alfa (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e componentes do sistema de complementos são responsáveis por essa indução de expressão (BEVILACQUA *et al.*, 1986; SAADI *et al.*, 1995).

Outra fonte de FT na circulação é representada pelas micropartículas (MP). As MP são pequenas vesículas derivadas da membrana de células ativadas ou apoptóticas. As MP circulantes apresentam proteínas específicas das células de origem e são, em geral, derivadas de plaquetas, leucócitos e células endoteliais (LECHNER e WELTERMANN, 2008). Estão presentes na circulação de indivíduos saudáveis e aumentadas em algumas condições patológicas como septicemia, doença de Chron e PE (GONZALEZ-QUINTERO *et al.*, 2003; BOULANGER *et al.*, 2008).

Bogdanov *et al.* (2003) clonaram uma variante alternativa do FT (Alt FT), que ocorre naturalmente. Esta isoforma solúvel é derivada do processamento alternativo do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) primário, cujo exon 5 foi excluído. O

RNA_m do Alt FT expressa uma proteína composta de 206 aminoácidos, é solúvel e não contém os aminoácidos 166-218, normalmente codificados pelo exon 5. Se o Alt FT apresenta atividade pró-coagulante ainda não está claro. Esta variante do FT não apresenta os resíduos de cisteínas nas posições 186 e 209 necessários para a formação da ponte de dissulfeto e *de-encryption* desse fator, etapa proposta como fundamental para a transição entre as duas formas (MACKMAN, 2009).

Atualmente, vários estudos têm mostrado que o FT não desempenha somente o papel de iniciador do processo de coagulação sanguínea, mas está associado, também, a vários outros processos celulares, tais como crescimento, mobilidade e ativação celular (GIRARDI, 2011a).

2.3 Inibidor da via do fator tissular

O TFPI é o principal inibidor endógeno, *in vivo*, da via do fator tissular. Possui múltiplos domínios ativos do tipo *Kunitz*, o que possibilita a inibição do fator X ativado (FXa) e do complexo fator tissular/fator VII ativado (FT/FVIIa) (BROZE e JR, 1995; DOSHI e MARMUR, 2002).

Dois subtipos de TFPI já foram descritos, mas apesar de compartilharem sequências e estruturas homólogas, são proteínas distintas, codificadas por genes localizados em cromossomos diferentes (ENJYOJI *et al.*, 1993; MIYAGI *et al.*, 1996). O inibidor da via do fator tissular tipo 1 (TFPI-1) é sintetizado pelas células do endotélio microvascular e o inibidor da via do fator tissular tipo 2 (TFPI-2) ou proteína placentária 5 (PP5) é produzido principalmente pelos sinciciotrofblastos e é comumente encontrado no sangue periférico de gestantes (UDAGAWA *et al.*, 1998; BAJAJ *et al.*, 1999; UDAGAWA *et al.*, 2002). O TFPI-2 inibe fortemente a tripsina, a plasmina, a calicreína plasmática, o fator IX ativado (FIXa) e o complexo FT/FVIIa, mas exerce um efeito inibitório fraco na atividade do FXa (SPRECHER *et al.*, 1994; PETERSEN *et al.*, 1996).

Aproximadamente 85% do TFPI total está presente na superfície do endotélio vascular e pode ser liberado desse, principalmente sob influência da heparina, para então circular na sua forma livre (f-TFPI) e fisiologicamente ativa (PETERSEN *et al.*, 1996; BAJAJ *et al. apud* ABDEL GADER *et al.*, 2006). O TFPI circulante encontra-se

associado principalmente às LDL, às lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HDL) e à lipoproteína (a) [LP(a)] (NOVOTNY *et al.*, 1989; LESNIK *et al.*, 1993). As plaquetas armazenam aproximadamente 10% do total de TFPI presente no sangue e liberam esse inibidor após estimulação pela trombina ou outros agonistas (NOVOTNY *et al.*, 1988).

O mecanismo de ação inibitória, exercido pelo TFPI-1, pode ocorrer de duas formas distintas. No primeiro, o FXa se une ao TFPI, em uma primeira etapa e, em seguida, o complexo TFPI/Xa se une ao complexo FT/FVIIa, em uma reação dependente de Ca^{++} . O TFPI reconhece o FXa mais efetivamente quando este último encontra-se associado ao fator V ativado (FVa), Ca^{++} e fosfolípidos (complexo protrombinase) (HUANG *et al. apud* BROZE e JR, 1995). No segundo, o TFPI liga-se a um complexo pré-formado, composto pelo FXa, FVIIa e FT (BROZE e JR, 1995). A interação entre o TFPI e o FXa é aumentada quando esses se ligam simultaneamente à mesma molécula de heparina. Sendo assim, a inibição do FXa pelo TFPI é potencializada pela heparina (WESSELSCHMIDT *et al. apud* BROZE e JR, 1995).

A depuração plasmática do TFPI é realizada principalmente pelo fígado e pelos rins (PALMIER *et al.*, 1992). O receptor de LDL ligado à proteína (LRP) e o sulfato de heparan ligam-se à molécula de TFPI, promovendo a degradação e consequente depuração plasmática desse inibidor. No entanto, é sabido que a interação entre o TFPI e o LRP nos rins, bem como no fígado, pode ser inibida por proteínas de 39 kDa, resultando no prolongamento do tempo de meia-vida do TFPI (NARITA *et al.*, 1995).

O nível plasmático de TFPI aumenta em idosos, gestantes, em casos de septicemia e câncer e pode estar diminuído na CID (BROZE e JR, 1995; SCAZZIOTA e ALTMAN, 1996). Admite-se que nos processos inflamatórios a concentração plasmática de TFPI está alterada, mas o mecanismo ainda não está bem definido (EREZ *et al.*, 2010).

Os níveis plasmáticos de TFPI parecem ser influenciados também pelos níveis de albumina urinária. Leurs *et al.* (1997) observaram níveis elevados de TFPI em pacientes diabéticos insulino-dependentes que apresentavam albuminúria quando comparados aos pacientes diabéticos insulino-dependentes sem albuminúria.

2.4 Fator VII

O FVII é uma serino protease sintetizada pelo fígado e liberada na sua forma inativa para a corrente sanguínea. Esta glicoproteína de cadeia única e peso molecular igual a 50 kDa é composta por quatro domínios. O primeiro deles, amino-terminal, contém 10 resíduos de ácido gama carboxiglutâmico (Gla) e é responsável por mediar, na presença de Ca^{++} , a interação desse fator com os fosfolípidos e com o FT. O segundo e terceiro domínios são semelhantes ao fator de crescimento epidermal (EGF-like), constituídos por seis resíduos de cisteína ligados por pontes de dissulfeto e importantes para estabilização e orientação da molécula. O quarto e último é um domínio serino protease, carboxi-terminal, homólogo ao da tripsina, e essencial para a atividade catalítica da molécula (HIGASHI e IWANAGA, 1998).

A clivagem da ligação peptídica entre os resíduos arginina-152 e isoleucina-153 converte o zimógeno FVII, de cadeia única, em sua forma ativa, o FVIIa (HIGASHI e IWANAGA, 1998).

A produção do FVII funcional é dependente da vitamina K e a ativação deste fator ocorre, principalmente, na presença de FT (POLLAK *et al.*, 1996).

Níveis plasmáticos elevados de FVII têm sido identificados como indicadores de risco para a doença cardiovascular (HEINRICH *et al.*, 1994; GIRELLI *et al.*, 2000). O *Northwick Park Heart Study* mostrou que o FVII é um marcador independente de infarto agudo em homens saudáveis (MEADE *et al.*, 1980; MEADE *et al.*, 1986; KEN-DROR *et al.*, 2010), e especialmente nos processos coronarianos fatais (MEADE *et al.*, 1993). No entanto, dois grandes estudos prospectivos (JUNKER *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997), bem como outros estudos isolados (SANDSET *et al.*, 1989; VARIZI *et al.*, 1992) não demonstraram essa relação.

2.5 Polimorfismos no gene do FVII

O gene codificador do FVII está localizado no cromossomo 13, região 13q34, é composto por 9 exons e 8 introns, e possui 12,8 kb (MIAO *et al.*, 1992).

Vários polimorfismos já foram identificados no gene do fator FVII, responsáveis por alterar os níveis de FVII total (FVIIag), FVII com atividade coagulante (FVII:c) ou FVIIa no plasma (MARCHETTI *et al.*, 1993; LINDMAN *et al.*, 2005a).

O polimorfismo 5`F7, caracterizado pela inserção de 10 bp na posição -323 (-323P0/10) e a substituição de uma timina (T) por uma citosina (C) na posição -122 (-122T/C) foram um dos primeiros polimorfismos descritos (MARCHETTI *et al.*, 1993; POLLAK *et al.*, 1996; VAN`T HOOFT *et al.*, 1999; LINDMAN *et al.*, 2005a). Inicialmente acreditava-se que o polimorfismo -323P0/10 influenciava a taxa de transcrição do FVII (POLLAK *et al.*, 1996). No entanto, estudos utilizando *Electromobility Shift Assay* (EMSA) comprovaram que os polimorfismos -323P0/10 e -122T/C não afetam a interação com fatores de transcrição, bem como não interferem na transcrição do FVII (VAN`T HOOFT *et al.*, 1999).

Dois *single nucleotide polymorphisms* (SNP), localizados na região promotora do gene do FVII, que consistem na substituição de uma guanina (G) por uma T na posição -401 (-401G/T) e a substituição de uma G por uma adenina (A) na posição -402 (-402G/A) já foram descritos. No entanto, poucos estudos foram realizados até então visando a caracterização destes polimorfismos (POLLAK *et al.*, 1996; VAN`T HOOFT *et al.*, 1999; LINDMAN *et al.*, 2005a).

van`t Hooft *et al.* (1999) relataram que o alelo -401T está associado à redução da taxa basal de transcrição, o que provoca a redução da concentração plasmática de FVII, e o alelo -402A está associado ao aumento da transcrição e, conseqüentemente, ao aumento dos níveis plasmáticos de FVII. Este mesmo estudo demonstrou que indivíduos homocigotos para o alelo -402A apresentaram níveis mais elevados de FVII que indivíduos heterocigotos para o mesmo alelo.

Campo *et al.* (2006) demonstraram que a presença do alelo -402A em homocigose está associada a um aumento de 40% nos níveis de FVII.

Por outro lado, Carew *et al.* (2003) reportaram que o polimorfismo -402G/A não está associado ao aumento da atividade transcricional do gene do FVII e sugeriram que o alelo -402A está em forte desequilíbrio de ligação com outros alelos localizados na região promotora, -630G e -670C. Estes alelos seriam parte de um extenso haplótipo que está associado ao aumento da atividade transcricional *in vitro*, o que, conseqüentemente, alteraria os níveis de FVII:c *in vivo*. Contrariamente,

Lindman *et al.*, (2005a) não excluíram a hipótese de que a presença do alelo -402A aumenta, independentemente, os níveis plasmáticos de FVII.

Outro polimorfismo descrito para o gene do FVII consiste na troca de uma G por uma A, resultando na substituição de uma arginina (R) por uma glutamina (Q) na posição 353 da proteína (R353Q). Indivíduos portadores do alelo Q possuem níveis diminuídos de FVII quando comparados aos portadores do alelo R (GREEN *et al.*, 1991; BERNARDI *et al.*, 1996; GIRELLI *et al.*, 2000). Esta observação tem levado à hipótese de que o alelo Q possa proteger o indivíduo de eventos trombóticos (LINDMAN *et al.*, 2004).

Os polimorfismos -401G/T e R353Q estão associados a uma pronunciada redução dos níveis de FVII, o que sugere um forte desequilíbrio de ligação entre os alelos (LINDMAN *et al.*, 2005a).

Estudos recentes têm demonstrado que, além da presença de SNPs modulando os níveis de FVII, a metilação das ilhas CpG podem explicar variações nesses níveis, mas o mecanismo pelo qual isto ocorre não está completamente elucidado (FRISO *et al.*; 2012).

2.6 Coagulação sanguínea

O processo de coagulação sanguínea envolve células, plaquetas e a ativação coordenada e específica de uma série de enzimas (ou fatores da coagulação) presentes no plasma sob a forma inativa. Os fatores, ao tornarem-se ativados, resultam na ativação dos fatores subsequentes, em um mecanismo em cascata, cujo último estágio consiste da quebra do fibrinogênio em monômeros de fibrina. Estes monômeros polimerizam-se espontaneamente, dando origem ao polímero de fibrina, unidade básica da malha de fibrina. Posteriormente, os polímeros adquirem coesão e estabilidade, originando a malha de fibrina estável que aumenta acentuadamente a viscosidade do sangue, alterando seu estado físico de líquido para gel. Os fatores da coagulação são numerados por algarismos romanos de I a XIII, excetuando o número VI (SCAZZIOTA e ALTMAN, 1996).

O modelo atualmente aceito para o mecanismo da coagulação incorpora a superfície celular ao processo e reforça o papel central do FT (PRICE *et al.*, 2004). Esse modelo sugere que a coagulação *in vivo* ocorre em fases sobrepostas distintas, com participação de dois tipos diferentes de células, aquelas que expressam FT e plaquetas. O novo modelo propõe, também, que os fatores da coagulação, quando ativados, permanecem localizados no sítio da lesão, onde as plaquetas se tornam ativadas e agregam entre si, resultando na formação do tampão plaquetário e do coágulo de fibrina. Dessa forma, sempre que ocorre lesão celular, há liberação de FT que ativa o FVII. O FVII, uma vez ativado, desencadeia a cascata da coagulação que culmina com a formação do coágulo de fibrina e tamponamento do local lesado. Dessa forma, garante a hemostasia, ou seja, a manutenção do sangue no estado líquido dentro do leito vascular (SMITH, 2009).

A ação das plaquetas é decisiva na formação do coágulo de fibrina e ocorre em três etapas: 1. Adesão ao local lesado, por meio da glicoproteína (GP) de superfície GPIb/IX, que se liga ao fator von Willebrand (FvW) e ao subendotélio vascular; 2. Agregação, por meio do fibrinogênio plasmático, que se liga à GPIIb/IIIa, permitindo que as plaquetas permaneçam ligadas entre si, na presença de Ca^{++} ; 3. Secreção de substâncias contidas nos grânulos densos, como a adenosina difosfato (ADP), o Ca^{++} , a serotonina, e de proteínas produzidas pelos grânulos α , como a β -tromboglobulina (β -TG) e PF4. Durante a fase de secreção, o fator plaquetário-3 (PF3), um fosfolípide da membrana, é exposto e participa da ativação de fatores plasmáticos da coagulação (HANDIN *et al.*, 1995; LORENZI, 1999).

Segundo o novo modelo da coagulação, o processo de formação do coágulo ocorre em três estágios: 1. Iniciação da coagulação em células que expressam FT; 2. Amplificação do sinal procoagulante a partir da trombina gerada e 3. Propagação da trombina gerada na superfície plaquetária (**FIGURA 1**).

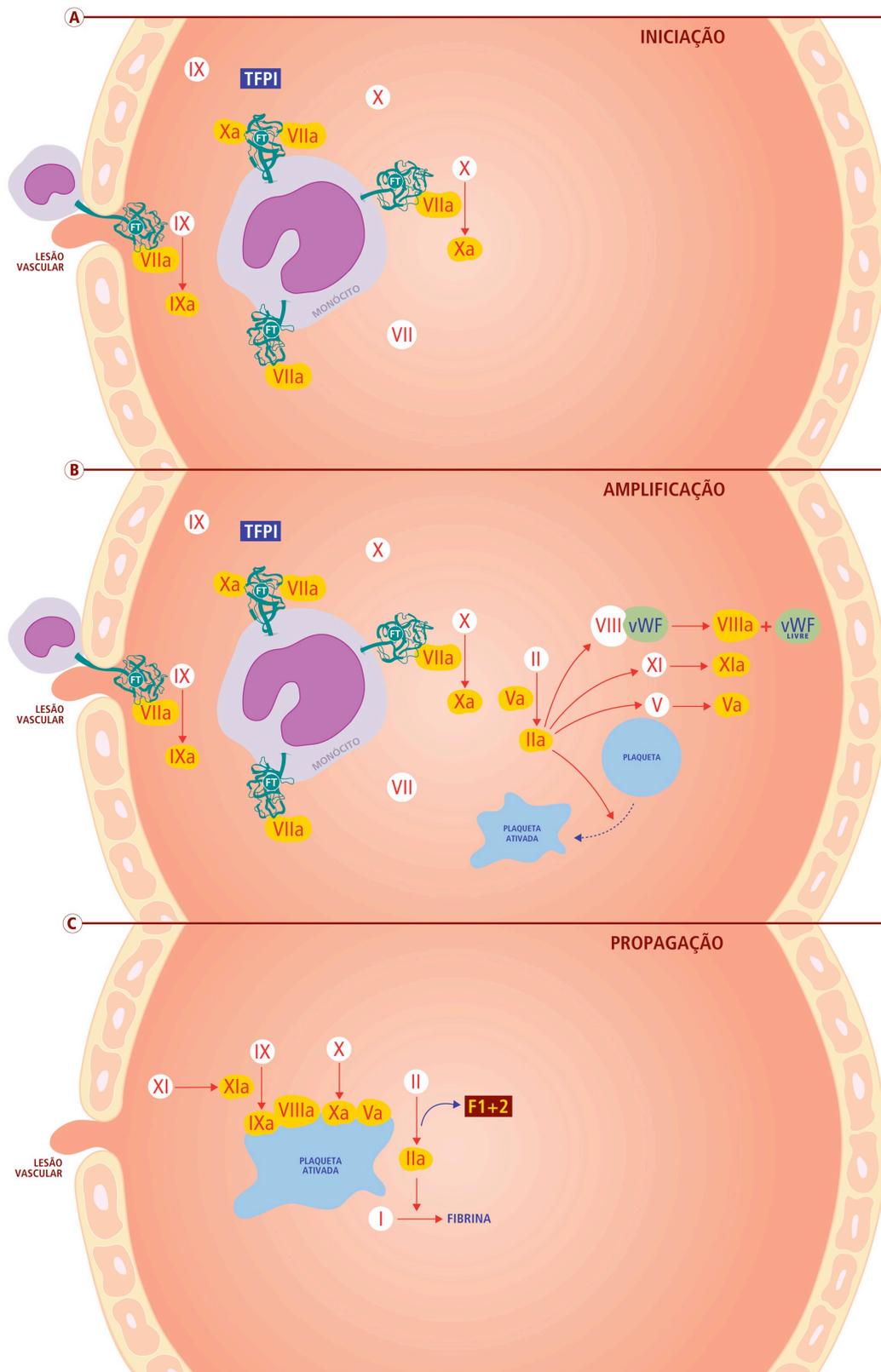


FIGURA 1 - Novo modelo da coagulação. (A) Iniciação da coagulação em células que expressam FT. (B) Amplificação do sinal procoagulante a partir da trombinagemada gerada. (C) Propagação da trombinagemada na superfície plaquetária (Adaptado de HOFFMAN e MONROE, 2007).

O primeiro estágio tem início com a lesão de células teciduais, inclusive as células endoteliais, seguida da liberação de FT para o sangue circulante. O FT liga-se ao FVIIa, que está em pequena quantidade na circulação, formando o complexo FT/FVIIa (PRICE *et al.*, 2004; SMITH, 2009).

O FVII está disponível no sangue em sua forma ativa e inativa em estado de equilíbrio, sendo que, em indivíduos normais, aproximadamente 1% está na forma ativa (MORRISSEY *et al.*, 1993). Na ausência de FT como cofator, o FVIIa tem uma pequena atividade proteolítica sobre os fatores IX e X (TEN CATE *et al.*, 1993). O complexo FT/FVIIa formado induz mudança conformacional no domínio proteolítico do FVII inativo circulante, permitindo, assim, uma amplificação da atividade do complexo FT/FVIIa e ativação de pequena quantidade dos fatores IX e X, na superfície de células que expressam FT (HIGASHI e IWANGA, 1998; PRICE *et al.*, 2004; HOFFMAN e MONROE, 2007; SMITH, 2009).

Os fatores IXa e Xa formados desempenham funções distintas na iniciação da coagulação sanguínea (HOFFMAN *et al.*, 1995). O FXa interage com seu cofator, o FVa, na superfície celular e forma o complexo protrombinase, que cliva a protrombina, gerando uma pequena quantidade de trombina (HOFFMAN e MONROE, 2007; SMITH, 2009). O FXa pode também ativar diretamente o fator V (FV), embora isso ocorra lentamente (SMITH, 2009). O FXa que se dissocia da membrana das células que expressam FT é rapidamente inativado pelo TFPI ou pela antitrombina (AT). Assim, o FXa tem atuação restrita à superfície celular, na qual foi gerado (SMITH, 2009).

Por outro lado, o FIXa dissocia-se da superfície celular e difunde-se pelo sangue circulante alcançando a superfície das plaquetas ativadas, localizadas nas proximidades da lesão. Na superfície das plaquetas, uma vez que o FIXa não é inibido pelo TFPI e muito lentamente inibido pela AT, liga-se aos receptores plaquetários e interage com seu cofator, o fator VIII ativado (FVIIIa), ativando diretamente o FX (RAWALA-SHEIKH *et al.*, 1992; HOFFMAN, 2003; HOFFMAN e MONROE, 2007; SMITH, 2009).

A pequena quantidade de trombina formada é suficiente para ativar plaquetas que extravasaram do espaço intravascular para o local lesado, bem como para ativar os fatores V e VIII (HOFFMAN e MONROE, 2007).

É importante destacar que a ativação da via do FT ocorre em níveis reduzidos, a todo momento, no espaço extravascular. Admite-se que proteínas da

coagulação deixam o vaso sanguíneo, atravessam os tecidos e podem ser encontradas na linfa. Sendo assim, o FVII, bem como os fatores IX e X, podem estar presentes no espaço extravascular e serem ativados, mesmo na ausência de lesão vascular. Esse fato explica os níveis reduzidos de fatores ativados presentes no sangue de indivíduos saudáveis. Esse processo basal não culmina com a formação do coágulo de fibrina porque alguns componentes da coagulação, como plaquetas e o complexo Fator VIII/Fator von Willebrand (FVIII/FvW) são mantidos dentro do espaço vascular e só entram em contato com o espaço extravascular e com as células que expressam FT em caso de lesão endotelial (BAUER *et al.*, 1989; BAUER *et al.*, 1990; LE *et al.*, 1998; HOFFMAN, 2003).

A pequena quantidade de FIIa gerada na superfície das células que expressam FT, durante a fase de iniciação, é responsável por iniciar a fase seguinte, a de amplificação. A ligação da trombina a receptores plaquetários específicos gera uma profunda alteração na superfície da plaqueta, que adquire características procoagulantes e permite a liberação do conteúdo dos grânulos. Os grânulos plaquetários contêm um grande número de substâncias importantes para a coagulação e agonistas que ativam mais plaquetas no local da lesão vascular (SMITH, 2009). Em adição à ativação das plaquetas, a trombina gerada na primeira fase ativa os fatores V, VIII e XI (FXI), dissocia o complexo FVIII/FvW, liberando o FvW para mediar a adesão plaquetária (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN e MONROE, 2007; SMITH, 2009).

Um número limitado de plaquetas é ativado na fase de amplificação e a liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários promove o recrutamento de mais plaquetas para o local da lesão, sendo assim, a fase de propagação ocorre na superfície de plaquetas ativadas. A expressão de ligantes na membrana das plaquetas promove a agregação plaquetária, que é mediada pelo fibrinogênio. O FIXa gerado na fase de iniciação, devido à ativação do FIX pelo complexo FT/FVIIa, pode se ligar ao FVIIIa, gerado na fase de amplificação, na superfície plaquetária. Adicionalmente, o FIXa pode ser gerado devido à clivagem do FIX pelo fator XI ativado (FXIa) (gerado na fase de amplificação) na superfície plaquetária. O FIXa forma, então, o complexo tenase com FVIIIa na superfície da plaqueta e é capaz de ativar o FX. Como o FXa gerado na superfície de células que expressam o FT, durante a fase de iniciação, é rapidamente inibido pelo TFPI e pela AT ao sair da superfície dessas células, a maior parte do FXa é gerado diretamente na superfície

plaquetária, pelo complexo tenase. O FXa gerado na superfície plaquetária liga-se rapidamente ao FVa, ativado pela trombina na fase de amplificação e cliva a protrombina em trombina. A atividade do complexo protrombinase (FXa/FVa) resulta na geração abrupta de trombina que promove a lise de grande quantidade de fibrinogênio em monômeros de fibrina. Os monômeros de fibrina solúveis, posteriormente polimerizam, resultando no coágulo de fibrina insolúvel (HOFFMAN, 2003; HOFFMAN e MONROE, 2007; SMITH, 2009).

Esse novo modelo da coagulação substituiu o descrito na década de 1960, por dois diferentes grupos de pesquisadores (MACFARLANE, 1964; DAVIE e RATNOFF, 1964). Este modelo admitia a ocorrência da coagulação por duas vias distintas, extrínseca e intrínseca, que culminavam em uma via comum; para explicar o mecanismo da coagulação sanguínea. No modelo clássico, considerava-se que simultaneamente à ativação das plaquetas, os fatores da coagulação tornam-se ativados sequencialmente, de modo que a ativação de um fator implica na ativação de outro e, assim, sucessivamente, culminando com a formação do coágulo de fibrina. No entanto, falhas nesse modelo foram se tornando evidentes nos últimos 40 anos.

Evidências mostram que as vias extrínseca e intrínseca não ocorriam de forma independente como implícito neste modelo. Diversas manifestações clínicas de deficiências de fatores da coagulação contradiziam o modelo proposto (SMITH, 2009). Tal modelo não podia explicar, por exemplo, porque a ativação do FX pelo complexo FT/FVIIa não poderia compensar a deficiência do complexo FIXa/FVIIIa (HOFFMAN e MONROE, 2007). Além disso, pacientes com deficiências em componentes iniciais da via intrínseca como fator XII (FXII), cininogênio de alto peso molecular (HMWK) ou pré-caliceína (PK), essenciais para ativação do FXII, apresentavam TTPA prolongado, mas não manifestavam clinicamente tendência à hemorragia (GAILANI e RENNÉ, 2007). Além disso, não era capaz de explicar também porque uma via extrínseca intacta não poderia compensar a deficiência dos fatores FVIII e FIX (componentes da via intrínseca da coagulação), na hemofilia A e B, respectivamente (GAILANI e RENNÉ, 2007). De forma semelhante, a deficiência de FVII pode estar associada a sangramento em pacientes que possuem uma via intrínseca perfeitamente funcionante (MORRISSEY e MUTCH, 2006).

Por outro lado, Østerud e Rapaport (1977) evidenciaram experimentalmente que o complexo FT/FVIIa mediava a ativação de FX e FIX, indicando, assim, que o FT exercia papel fundamental na iniciação da coagulação. Biggs e MacFarlane (1951), observaram que os fatores VIII e IX eram essenciais para otimizar a formação do coágulo de fibrina ao realizar o TP de um plasma no qual foi adicionado pequena quantidade de FT.

Todos estes questionamentos, reforçados pelas evidências experimentais, levaram à proposição de um novo modelo para o mecanismo da coagulação.

Até o momento, as evidências indicam que o único iniciador relevante da coagulação *in vivo* é o FT (SMITH, 2009).

No entanto, o modelo clássico da coagulação continua sendo útil na interpretação de testes laboratoriais que objetivam avaliar possíveis alterações da coagulação. Dessa forma, deficiências de fatores da via extrínseca ou comum podem ser identificadas utilizando o tempo de protrombina (TP), enquanto deficiências de fatores da via intrínseca ou comum refletem em um prolongamento do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA). Além disso, este modelo permitiu o estudo, identificação e o melhor entendimento de propriedades específicas de alguns complexos procoagulantes e de inibidores específicos da coagulação (SMITH, 2009).

Em condições fisiológicas, é admitido atualmente que o processo da coagulação envolve a ativação de apenas uma pequena quantidade de cada fator da coagulação presentes no plasma na forma inativa. A proporção e extensão da geração de fatores ativados são reguladas cuidadosamente por um grupo de proteínas inibidoras que funcionam como anticoagulantes naturais. Os anticoagulantes naturais permitem que a coagulação se processe localmente, em resposta à lesão vascular e evitam que se torne um processo sistêmico e potencialmente perigoso. Os anticoagulantes naturais de maior importância são a AT, proteína C (PC) e proteína S (PS), que atuam sobre a trombina formada e o TFPI que inativa o FXa e o complexo FT/FVIIa (HANDIN *et al.*, 1995).

Uma vez ocorrida a reconstituição da parede vascular, o coágulo de fibrina é lisado, de modo a garantir o restabelecimento do fluxo sanguíneo (LORENZI, 1999).

A enzima central do mecanismo fibrinolítico é a plasmina, que lisa o fibrinogênio e a fibrina e, desta forma, limita o processo trombótico. A plasmina é derivada de um zimógeno inativo, o plasminogênio, que pode ser ativado

fisiologicamente, tanto por um mecanismo extrínseco, como intrínseco. As duas principais substâncias responsáveis pela ativação extrínseca do sistema fibrinolítico são o ativador de plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e ativador de plasminogênio tipo uroquinase - u-PA (LORENZI, 1999).

O sistema fibrinolítico pode lisar especificamente a fibrina (fibrinólise) ou ser menos específico e atuar também sobre o fibrinogênio (fibrinogenólise). Os produtos de degradação do fibrinogênio ou da fibrina (PDF) podem ser detectados no plasma e sua concentração indicará a magnitude da fibrinólise ou da fibrinogenólise (SCAZZIOTA e ALTMAN, 1996).

O menor fragmento resultante da degradação da fibrina pela plasmina é o dímero D (D-Di). Este constitui um indicador sensível da formação de fibrina e de sua digestão, e tem sido utilizado para avaliar alterações fibrinolíticas secundárias e distingui-las da fibrinólise primária (FAREED *et al.*, 1998).

A ação do sistema fibrinolítico, de forma semelhante ao da coagulação, é controlada por inibidores específicos, em condições fisiológicas. Os principais inibidores da fibrinólise são o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), a α_2 -antiplasmina, a α_2 -macroglobulina e a α_1 -antitripsina (LORENZI, 1999).

Nas últimas três décadas, tornou-se evidente a participação ativa das células endoteliais, que revestem internamente o vaso sanguíneo e estão em contato íntimo com o sangue, no processo hemostático. Estas células atuam tanto na coagulação, favorecendo a ativação plaquetária e a formação do coágulo, quando ocorre exposição do coágulo subendotelial, quanto na anticoagulação, favorecendo a ação da PC, PS e da AT (LORENZI, 1999).

As principais ações anticoagulantes do endotélio vascular incluem expressão de trombomodulina (TM), com conseqüente ativação do mecanismo da PC, expressão de sulfato de heparan e aumento da afinidade da AT pela trombina, liberação do t-PA, síntese do TFPI, da proteína nexina (PN), de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI_2) e conseqüente estimulação da vasodilatação e inibição plaquetária (LORENZI, 1999).

A ação procoagulante do endotélio resulta da liberação de FT, síntese de FvW, síntese de fibronectina, liberação de fator ativador de plaquetas (PAF), síntese de FVII e PAI-1 (LORENZI, 1999).

2.7 Alterações hemostáticas na gravidez

A gravidez normal está associada a alterações complexas da hemostasia, que resultam em um estado de hipercoagulabilidade sanguínea crescente e que é máxima no momento do parto. A hipercoagulabilidade visa uma ação eficaz na zona de inserção placentária no momento do parto, de modo a prevenir uma hemorragia excessiva. Sabe-se que o fluxo placentário em um feto a termo é de cerca de 700 mL/min e este aporte sanguíneo é bruscamente interrompido no momento do parto, exigindo uma ação eficiente do mecanismo hemostático para tamponar os vasos rompidos (BRENNER, 2004; HOLMES e WALLACE 2005).

As alterações hemostáticas na gravidez compreendem um aumento dos fatores da coagulação, que são dependentes da vitamina K (fatores II, VII, IX e X), do fator VIII, do FvW, do FT e do fibrinogênio (BONNAR *et al.*, 1970; STIRLING *et al.*, 1984, GIRARDI, 2011a). A origem do aumento dos fatores da coagulação ainda não está completamente elucidada e, provavelmente, é multifatorial. As alterações hormonais podem ser responsáveis, pelo menos em parte, por esses aumentos, uma vez que níveis elevados dos fatores VII, X (POLLER e THOMPSON 1966) e do fibrinogênio (MEADE *et al.*, 1976) foram observados em mulheres que faziam uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal.

2.7.1 Fator tissular e gravidez

O FT é uma molécula crucial na gestação, sendo imprescindível para o desenvolvimento embrionário e placentário. No entanto, a expressão aumentada deste fator pode provocar lesão da placenta e complicações gestacionais em mulheres, tais como abortos, trabalho de parto pré-termo e PE (GIRARDI, 2011a).

Kuczynski *et al.* (2002), em um estudo que envolveu gestantes entre a 36^a e a 40^a semana de gestação demonstraram que a placenta é um órgão rico em FT, com concentração igual a 31,17 ng/mg de proteína total, quando comparada ao plasma que tem aproximadamente 0,004 ng/mg de proteína total e ao miométrio, que possui cerca de 7,40 ng/mg de proteína total. Nas mulheres não gestantes, também

incluídas neste estudo, a concentração de FT no plasma foi igual a 0,003 ng/mg de proteína total. Estes pesquisadores propuseram que os níveis elevados de FT na placenta em relação aos encontrados no sangue indicam o papel relevante desse fator na gestação.

Nas placentas humanas, de outros primatas e de roedores, o sangue materno está em contato direto com os trofoblastos, que são ricos em FT, no entanto, não há ativação exacerbada da coagulação (WILLIAMS, 1966; FLECK *et al.*, 1990; GIRARDI, 2011a). Uma provável explicação para este fato é o aumento da expressão de TFPI, que pode ter um papel crucial para a manutenção da hemostasia na gravidez (GIRARDI, 2011a). Entretanto, resultados conflitantes têm sido reportados em relação à síntese de TFPI pelos trofoblastos (BUTZOW *et al.*, 1988; UDAGAWA *et al.*, 2002; GIRARDI, 2011b).

Admite-se que o FT tem outros efeitos biológicos além de contribuir para a manutenção da hemostasia placentária local e possui um papel importante no desenvolvimento de vasos sanguíneos e na embriogênese (RUF e MUELLER, 1996; CARMELIET *et al.*, 1997; ABE *et al.*, 1999; GIRARDI, 2011b). Estudos realizados em camundongos geneticamente modificados, com comprometimento da expressão de FT, reforçaram esta hipótese. Cerca de 90% dos embriões homozigotos para o gene inativado do FT morreram ainda no útero. A inativação do gene do FT resultou em alteração da circulação do saco vitelino para o embrião e, conseqüentemente, na morte embrionária. Além disso, os vasos vitelinos não expressaram alfa actina de músculo liso, uma proteína que participa da organização da parede vascular. Os embriões que sobreviveram, apesar da ausência de FT na placenta, apresentaram anormalidades na zona labiríntica, principal sítio de troca sanguínea entre a mãe e o feto (EDGINGTON *et al.*, 1991; CARMELIET e COLLEN, 1996; ERLICH *et al.*, 1999).

Estudos em humanos confirmaram a importância do FT no desenvolvimento embrionário. Sabendo que os fatores de coagulação não atravessam a placenta, a distribuição generalizada de FT nos embriões e a ausência de FVII, sugerem que o FT tem funções adicionais à de iniciador do processo de coagulação (GIRARDI, 2011a).

Erez *et al.* (2010) observaram atividade plasmática aumentada de FT e níveis plasmáticos diminuídos de TFPI em gestantes em trabalho de parto pré-termo. Em um estudo anterior, os mesmos pesquisadores haviam encontrado níveis e atividade

de FT elevados no líquido amniótico de pacientes com perda fetal (EREZ *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos realizados em humanos reportou aumento dos níveis plasmáticos de FT, no entanto, não foi realizada a avaliação da atividade desse fator ou avaliação do processo de coagulação nas mulheres envolvidas. A maioria dos estudos concluiu que o aumento dos níveis plasmáticos e placentários de FT contribui para um estado de hipercoagulabilidade patológico que pode resultar em complicações da gestação. No entanto, ainda não está claro se o FT é a causa ou a consequência destas alterações gestacionais (GIRARDI, 2011a).

A expressão exacerbada de FT em camundongo foi associada ao aumento de deposição de fibrina e diminuição do fluxo sanguíneo placentário, o que sugere que a ativação da coagulação desempenha um importante papel na patogênese de complicações gestacionais (REDECHA *et al.*, 2009).

Estudos conduzidos em camundongos sugeriram que o FT desempenha um papel pró-inflamatório que contribui para a patogênese das complicações gestacionais (REDECHA *et al.*, 2007; REDECHA *et al.*, 2008; REDECHA *et al.*, 2009). Sabe-se que o FT, quando complexado ao FVIIa, FVIIa-FXa, FXa e trombina atua como um fator pró-inflamatório mediante a sinalização dos receptores ativados por proteases (PAR), indução da expressão de TNF- α , IL-1 e moléculas de adesão (RUF *et al.*, 2003).

2.7.2 Inibidor da via do fator tissular e gravidez

A concentração plasmática média de TFPI total aumenta durante a primeira metade da gravidez, até a 20^a semana de gestação, tende a estabilizar até o final da gestação e decresce durante o parto (USZYNSKI *et al.*, 2001; SARIG *et al.*, 2005).

Kuczynski *et al.* (2002) realizaram um estudo em mulheres que estavam entre a 36^a e 40^a semana de gestação e que apresentavam diferentes complicações obstétricas, exceto PE. Os resultados deste estudo demonstraram que a placenta é rica em TFPI total. A concentração de TFPI total no miométrio foi igual a 4,50 ng/mg de proteína total e no plasma igual a 0,70 ng/mg de proteína total, enquanto na

placenta foi igual a 13 ng/mg de proteína total. A concentração plasmática de TFPI total, em mulheres não gestantes foi igual a 1,12 ng/mg de proteína total.

Contrariamente ao TFPI-1, que está amplamente distribuído nos tecidos fetais e placentários (sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto, trofoblasto e endotélio vascular), o TFPI-2 é exclusivo e muito abundante no sinciciotrofoblasto (UDAGAWA *et al.*, 2002).

A expressão de TFPI-2 aumenta com a progressão da gestação, enquanto a expressão de TFPI é constante. Admite-se que o TFPI-2 mantém o fluxo sanguíneo nas intervilosidades placentárias, de forma semelhante ao TFPI no sistema vascular (UDAGAWA *et al.*, 2002).

A concentração plasmática de TFPI-2 aumenta gradualmente até a 36ª semana de gestação, atinge seu nível máximo neste período, permanece estável até o parto e decresce no puerpério (SEPPALA *et al.*, 1979; OBIEKWE e CHARD, 1981; OBIEKWE *et al.*, 1982; BUTZOW *et al.*, 1988).

2.7.3 Fator VII e gravidez

Vários estudos relataram um aumento de FVII e outros fatores da coagulação durante a gravidez (POLLER e THOMPSON, 1966; BONNAR *et al.*, 1970; DALAKER e PRYDZ, 1984; STIRLING *et al.*, 1984; DEVIES *et al.*, 1997; MOERLOOSE *et al.* 1998).

Dalaker e Prydz (1984) observaram um aumento, em torno de duas a quatro vezes, da atividade de FVII no plasma de gestantes normotensas, comparando-se a mulheres não gestantes. Resultados semelhantes foram relatados por Devies *et al.* (1997) e Moerloose *et al.* (1998) que avaliaram a atividade de FVII em gestantes normotensas e observaram que a elevação dos níveis plasmáticos de FVII está associada ao aumento da idade gestacional.

Poller e Thompson (1966) sugeriram que este aumento pode ser decorrente das alterações hormonais, uma vez que níveis elevados dos fatores VII foram observados em mulheres que faziam uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal.

Níveis plasmáticos elevados de FVIIa foram observados em gestantes normotensas quando essas foram comparadas a mulheres não gestantes (MORRISSEY *et al.*, 1993). Resultados condizentes foram relatados por Moerloose *et al.* (1998), que observaram um aumento progressivo dos níveis plasmáticos de FVIIa durante a gestação.

Miller *et al.* (2005) demonstraram uma relação entre a elevação dos níveis plasmáticos de FVII, a presença do polimorfismo -402G/A e a ocorrência de perda fetal em um grupo de gestantes. Embora neste estudo não esteja clara a inclusão de mulheres com PE, sabe-se que esta condição clínica está, em grande parte, associada à perda fetal.

2.8 Alterações hemostáticas na pré-eclâmpsia

A PE está associada a um estado de hipercoagulabilidade ainda mais evidente que a condição fisiológica da gravidez. Deposição de fibrina no subendotélio dos glomérulos renais, nas artérias espirais e lesões oclusivas na vasculatura placentária foram relatadas em mulheres com PE. Tem sido sugerido que as manifestações clínicas da doença são secundárias à hipoperfusão resultante da formação de trombos na microcirculação placentária e do excesso de deposição de fibrina em vários órgãos maternos, comprometendo a função desses (ESTELLÉS *et al.*, 1998).

Durante a gestação, os trofoblastos sintetizam e secretam grande quantidade de substâncias, algumas das quais desempenham papel importante na regulação da coagulação placentária e sistêmica e na regulação do sistema fibrinolítico (TENG *et al.*, 2009). Como exemplo, pode-se destacar o t-PA e o u-PA, que são sintetizados pelos trofoblastos e têm como função principal ativar o plasminogênio em plasmina. No entanto, os trofoblastos sintetizam também os PAI, que inibem a ação do t-PA e do u-PA, permitindo, dessa forma, a manutenção do equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise (ANTEBY *et al.*, 2004).

A expressão aumentada de PAI-1 pode inibir a degradação da fibrina e, conseqüentemente, favorecer a deposição dessa nas vilosidades e prejudicar a troca de nutrientes na placenta (FENG *et al.*, 2001).

Os níveis plasmáticos de FvW e PAI-1 também encontram-se aumentados em gestantes com PE, quando comparados à gravidez de risco habitual, o que sugere a presença de lesão endotelial nessa doença (ROUSSEAU *et al.*, 2009).

Gestantes com PE apresentam, também, níveis diminuídos de t-PA quando comparadas a gestantes normotensas, o que acarreta uma diminuição da atividade do sistema fibrinolítico nessa doença (TENG *et al.*, 2009).

Rousseau *et al.* (2009) encontraram níveis aumentados de TM em gestantes normotensas se comparados ao de mulheres não gestantes, mas uma elevação ainda maior foi observada na PE. O achado pode ser explicado por uma lesão endotelial mais pronunciada na PE se comparada à gestação de risco habitual.

Níveis plasmáticos aumentados de D-Di foram observados na PE grave, mas não na PE leve, quando esses dois grupos foram comparados com um grupo de gestantes normotensas (SCHJETLEIN *et al.*, 1997; DUSSE, 1999; ROUSSEAU *et al.*, 2009). Essa observação reforça que a coagulação intravascular está ainda mais exacerbada na PE grave.

Níveis aumentados do complexo trombina/antitrombina (TAT) e diminuídos de AT foram observados na PE grave e leve (SCHJETLEIN *et al.*, 1997). Estes pesquisadores propuseram que a trombina é formada em excesso e a AT é mais consumida nestas duas formas clínicas da doença, em consequência da exacerbação da coagulação. No entanto, Dusse (1999) não encontrou diferença comparando os níveis plasmáticos de AT em gestantes com PE grave, PE leve e normotensas.

Resultados conflitantes têm sido encontrados em relação à concentração de fibrinogênio na PE. Alguns estudos relataram que gestantes com diagnóstico de PE apresentam concentração aumentada de fibrinogênio (AZNAR *et al.*, 1986). Ho e Yang (1992) reportaram que a concentração de fibrinogênio estava aumentada no segundo trimestre, quando gestantes com PE foram comparadas a gestantes normotensas, mas o mesmo não foi observado no terceiro trimestre. Por outro lado, Bonnar *et al.* (1971) e Dusse (1999) não observaram diferença nos níveis plasmáticos de fibrinogênio quando compararam gestantes com PE e normotensas. Thorburn *et al.* (1982) evidenciaram um decréscimo da concentração de fibrinogênio na PE assim como Schjetlein *et al.* (1997), que relataram também uma diminuição ainda mais pronunciada na PE grave. O decréscimo da concentração de fibrinogênio

pode ser atribuído ao consumo exacerbado de tal proteína (SCHJETLEIN *et al.*, 1997).

Um desequilíbrio na relação FvW e ADAMTS13 (*A Desintegrin and Metalloprotease with eight thrombospondin-1-like-member 13*), que é a enzima responsável pela quebra dos grandes multímeros de FvW na circulação, tem sido evidenciado (ALPOIM *et al.*, 2011a; STEPANIAN *et al.*, 2011), o que concorre para a formação de trombos, especialmente na microvasculatura placentária e renal.

A exata influência dos fatores de risco genéticos e ambientais na ocorrência de PE ainda não está bem definida, embora vários estudos sugiram que mulheres com trombofilias podem ter uma predisposição à ocorrência de PE (ACOG PRACTICE BULLETIN No. 33, 2002).

Estudos recentes indicam que alterações das proteínas envolvidas na coagulação, anticoagulação e fibrinólise podem predispor o indivíduo a estados trombofílicos e podem estar relacionadas também à PE, principalmente no que se refere ao processo de formação da placenta (DE MAAT *et al.*, 2004).

A alteração na concentração e atividade das proteínas envolvidas na coagulação, anticoagulação e fibrinólise está intimamente relacionada aos polimorfismos nos genes responsáveis pela codificação dessas.

Yamada *et al.* (2000) e Fabbro *et al.* (2003) relataram uma frequência maior do alelo 4G, do gene codificador do inibidor do PAI-1, em mulheres com PE. No entanto, De Maat *et al.* (2004) observaram uma frequência alélica semelhante quando compararam gestantes com PE e normotensas. Diferença entre as populações estudadas pode explicar as conclusões divergentes dos dois estudos.

Laasanen *et al.* (2002) estudaram a relação do polimorfismo que consiste na substituição de uma G por uma A na posição -455 do gene codificador do fibrinogênio (-455G/A), e da inserção de 10 bp na posição 323 no gene codificador do FVII e o desenvolvimento de PE em mulheres finlandesas. Era esperado que a mutação no gene do fibrinogênio constituísse um fator de risco para a PE e a inserção de 10 bp no gene do FVII constituísse um fator de proteção, pois estas mutações predispõem ao aumento da concentração de fibrinogênio e à diminuição da concentração de FVII, respectivamente. No entanto, não foi observada relação significativa entre os polimorfismos estudados e a ocorrência de PE. Os autores admitiram que o estudo pudesse apresentar limitações devido ao número reduzido de mulheres avaliadas.

Estudos conduzidos por Dalmáz *et al.* (2006) e Dusse *et al.* (2007) demonstraram que a presença das mutações G1691A no gene do fator V (fator V Leiden), G20210A no gene do fator II (FII) e C677T no gene da metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR) não aumentam o risco de PE em mulheres brasileiras. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos realizados com mulheres italianas, holandesas e alemãs. No entanto, foi observado em mulheres israelenses, um aumento, de três a cinco vezes, na incidência de PE em portadoras de fator V Leiden, bem como de mutações no gene do FII (G20210A) e da MTHFR (KUPFERMINC *et al.*, 2000).

Uma revisão sistemática e meta-análise recente revelou a associação do grupo sanguíneo AB e a ocorrência de PE (ALPOIM *et al.*, 2011b).

Com relação aos fatores de risco adquiridos, uma revisão sistemática e meta-análise recente revelou a associação da presença de anticorpos antifosfolípidos e a ocorrência de PE (GIRARDI, 2011a).

2.8.1 Fator tissular e pré-eclâmpsia

Níveis elevados de FT foram encontrados no plasma e em placentas de gestantes com PE quando comparadas a gestantes normotensas (BELLART *et al.*, 1999; DI PAOLO *et al.*, 2003; EREZ *et al.*, 2008; ROUSSEAU *et al.*, 2009; TENG *et al.*, 2010). O aumento da expressão de FT foi associado ao aumento dos níveis plasmáticos de ácido ribonucléico RNAm do FT, sugerindo, assim, o aumento da síntese de FT pelos trofoblastos em gestantes com PE (DI PAOLO *et al.*, 2003).

No entanto, resultados contraditórios foram relatados por Freeman *et al.* (2008) e Dusse *et al.* (2011a), que não observaram diferença significativa comparando os níveis plasmáticos de FT em mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com diagnóstico de PE.

Estellés *et al.* (1998) e Teng *et al.* (2009) verificaram que em gestantes com PE, a expressão gênica e os níveis plasmáticos e placentários de FT e PAI-1 apresentavam-se aumentados, o que poderia favorecer o estado de hipercoagulabilidade observado nessa doença.

A liberação de MP, provenientes dos sinciotrofoblastos, pode também contribuir com a elevação dos níveis plasmáticos de FT na PE. As MP são liberadas da camada externa da placenta, diretamente na circulação sanguínea materna. No terceiro trimestre da gestação, devido ao aumento do volume placentário e na PE, a liberação das MPs encontra-se ainda mais elevada (DUSSE *et al.*, 2011b).

Níveis elevados de fator tissular ativo (FTa) e de f-TFPI, bem como uma relação FTa/f-TFPI aumentada, encontrados na PE, evidenciaram um estado de hipercoagulabilidade ainda maior nessa doença e podem explicar uma formação descontrolada de trombina e a consequente oclusão das artérias espirais e dos capilares renais (ROUSSEAU *et al.*, 2009).

A expressão, em células endoteliais, dos receptores ativados por proteases tipo 2 (PAR-2), está aumentada em gestantes com PE (BELLART *et al.*, 1999). A elevação da expressão de PAR-2 e FT sugere que mecanismos independentes da coagulação podem estar envolvidos na patogênese da PE. No entanto, ainda não está claro se o FT, expresso em patologias gestacionais, ativa o processo de coagulação ou inicia a sinalização de eventos não hemostáticos (GIRARDI, 2011a).

2.8.2 Inibidor da via do fator tissular e pré-eclâmpsia

A revisão dos estudos da literatura revela resultados divergentes relativos aos níveis plasmáticos de TFPI em gestantes com PE, comparados aos de gestantes normotensas.

Schjetlein *et al.* (1999) e Abdel Gader *et al.* (2006) observaram um aumento da concentração de TFPI livre em gestantes com PE quando comparadas a gestantes normotensas. Resultados discordantes foram obtidos por Rousseau *et al.* (2009), que não encontraram diferença nos níveis plasmáticos de f-TFPI quando comparando-se os dois grupos.

Abdel Gader *et al.* (2006) e Dusse *et al.* (2008) relataram que não houve diferença nos níveis plasmáticos de TFPI total quando compararam gestantes com PE e normotensas. Resultados contraditórios foram reportados por Freeman *et al.*

(2008) e Erez *et al.* (2008), que obtiveram níveis aumentados de TFPI total em gestantes com PE.

Níveis diminuídos de TFPI-1 e TFPI-2 foram encontrados por Teng *et al.* (2010), em gestantes com PE grave, quando comparadas a gestantes normotensas.

Sabe-se que os níveis plasmáticos de TFPI são influenciados pela concentração plasmática de lípidos e pelos níveis de albumina urinária (NOVOTNY *et al.*, 1989; LESNIK *et al.*, 1993; LEURS *et al.*, 1997). A hiperlipidemia é comumente observada na PE e a albuminúria é uma das principais alterações dessa doença, o que justificaria a alteração dos níveis de TFPI.

2.8.3 Fator VII e pré-eclâmpsia

Uma revisão dos estudos da literatura revela que apenas cinco estudos avaliaram os níveis plasmáticos de FVII na PE.

Dusse *et al.* (2011a) demonstraram que os níveis plasmáticos de FVII em gestantes com PE estavam mais elevados que em gestantes normotensas.

Resultados contraditórios foram reportados por Djelmis *et al.* (1997), Schjetlein *et al.* (1999) e Freeman *et al.* (2008), que não observaram diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII quando compararam gestantes com PE e normotensas e Øian *et al.* (1985) que observaram atividade diminuída de FVII em gestantes com PE quando comparadas a gestantes normotensas.

Spiezia *et al.*, 2011 avaliaram os níveis plasmáticos do complexo fator VIIa/antitrombina (FVIIa/AT) em gestantes com PE e normotensas e verificaram uma diminuição desse complexo em ambos os grupos, em relação ao intervalo de referência obtido para a população local. Estes pesquisadores propuseram que a redução do complexo FVIIa/AT pode resultar do consumo desse, em função da exacerbação da coagulação na gestação normal ou patológica.

Apenas um estudo avaliou os níveis de FVIIa na PE. Neste estudo não foi encontrada diferença entre os níveis de FVIIa em gestantes com PE e normotensas (DUSSE *et al.*, 2011a).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar se há associação dos níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa, a presença de polimorfismos no gene do FVII e a ocorrência de PE na forma grave.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa em gestantes com PE grave, gestantes normotensas e mulheres não gestantes.
- Genotipar os polimorfismos -401G/T e -402G/A nos três grupos.
- Comparar a frequência dos polimorfismos -401G/T e -402G/A em gestantes com PE grave, gestantes normotensas e mulheres não gestantes.
- Investigar se há associação entre a presença dos polimorfismos -401G/T e -402G/A e os níveis plasmáticos de FVII em gestantes com PE grave, gestantes normotensas e mulheres não gestantes.
- Investigar se há associação dos níveis dos fatores hemostáticos e a ocorrência de PE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi previamente analisado sob o ponto de vista ético e formal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - ETIC 47/08 (**ANEXO A**). Foi também analisado e aprovado pela Diretoria do Hospital Público Regional de Betim (HPRB) / Betim - MG (**ANEXO B**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - Parecer FHEMIG: N° 77/08, CAAE: 00.40.0.287.203-0 (**ANEXO C**), pela gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara / Betim - MG (**ANEXO D**), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal Odilon Behrens / Belo Horizonte - MG - Parecer: 0681.0.000.216-11 (**ANEXO E**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte / Belo Horizonte - MG (**ANEXO F**).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa foi feito pelos pesquisadores, no momento da coleta do sangue, utilizando-se linguagem clara, a todas as mulheres participantes do estudo. Todas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (**ANEXO G**).

4.2 Casuística

4.2.1 Seleção das integrantes do estudo

O estudo constituiu-se de três grupos. O grupo I foi composto por gestantes com diagnóstico de PE grave (n=109), o grupo II, por gestantes normotensas (n=106) e o grupo III, por mulheres não gestantes e normotensas (n=120). As gestantes do primeiro grupo foram selecionadas na Maternidade Odete Valadares / Belo Horizonte - MG, no Hospital Público Regional de Betim / Betim - MG, no

Hospital Municipal Odilon Behrens / Belo Horizonte - MG e no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte / Belo Horizonte - MG. As mulheres dos segundo e terceiro grupos foram selecionadas na Unidade Básica de Saúde da Família - Guanabara / Betim - MG. Os dados clínicos e laboratoriais de interesse, de cada uma das participantes do estudo, foram coletados em ficha individual padronizada (**ANEXO H**), a partir do cartão de pré-natal e/ou prontuário médico e durante a entrevista presencial.

4.2.2 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão das gestantes com PE grave (grupo I) foram:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 160 x 110 mmHg, aferida em duas medidas com intervalo de, no mínimo, 2 horas e após repouso;
- Proteinúria superior a 2 g em urina de 24 horas ou maior que (++) pelo método qualitativo de fita, em amostra isolada de urina.

A presença de alguns dos sintomas clínicos e achados clínico-laboratoriais também foi considerada pela equipe obstétrica para definir o diagnóstico de PE grave, como:

- Dor epigástrica ou no abdome superior;
- Alterações visuais (escotoma ou fotopsia);
- Exacerbação dos reflexos tendinosos profundos, sendo aferidos dois reflexos (patelar e de membros superiores);
- Cefaleia persistente ou incapacitante;
- Alterações comportamentais;
- Dispneia e sinais de congestão pulmonar;
- Volume urinário menor que 500 mL em 24 horas ou 100 mL em 4 horas (2 medidas);
- Trombocitopenia (número de plaquetas $< 100.000 \text{ mm}^3$);
- Elevação das enzimas hepáticas;

- Presença de esquisócitos no filme sanguíneo;
- Crescimento intra-uterino restrito (CIUR).

O diagnóstico de PE grave foi feito pela equipe obstétrica da Maternidade Odete Valadares, do Hospital Público Regional de Betim, do Hospital Municipal Odilon Behrens ou da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

Para o grupo das gestantes normotensas (grupo II) e mulheres não gestantes (grupo III) os critérios de inclusão foram:

- Pressão sistólica/diastólica igual ou inferior a 120 x 80mmHg e sem história pregressa de hipertensão e PE;
- Ausência de proteinúria conhecida.
- Ausência dos sintomas clínicos e achados clínico-laboratoriais relatados anteriormente (ver item 4.2.2)

4.2.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão comuns aos três grupos foram:

- Obesidade (Índice de Massa Corporal > 30);
- Relato de presença de doenças intercorrentes como distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e infectocontagiosas, diabetes, câncer e hipertensão crônica;
- Trabalho de parto avançado;
- Presença de sangramento de qualquer natureza.

As integrantes dos três grupos avaliados pertenciam à mesma classe social.

A idade gestacional (IG) das gestantes dos grupos I e II foi pareada, assim como a idade das participantes dos três grupos.

4.3 Material

4.3.1 Amostra biológica

Foram coletadas, de cada participante do estudo, duas amostras de sangue venoso, sendo 5 mL em citrato de sódio a 3,2 g% e 5 mL em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), diretamente em tubos do sistema *Vacurette*®, devidamente identificados. As amostras colhidas em EDTA foram destinadas à extração de DNA (ácido desoxirribonucléico) para investigação dos polimorfismos previstos neste estudo. As amostras colhidas em citrato foram imediatamente centrifugadas durante 15 minutos, a 3500 rpm, à temperatura ambiente (utilizando-se centrífuga FANEN EXCELSA® II - Excelsa™ II Centrifuge, Modelo 206 BL, São Paulo, Brasil, centrífuga CELM®, São Paulo, Brasil ou centrífuga FANEN, *São Paulo, SP*), para obtenção de plasma, o qual foi imediatamente aliquotado em tubos criogênicos devidamente identificados. As alíquotas de plasma foram armazenadas à temperatura de aproximadamente -80°C até o momento da realização dos testes laboratoriais.

4.4 Métodos

4.4.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir do sangue total, utilizando-se o conjunto de reagentes para extração de DNA “*Magnex DNA*” (Labtest Diagnóstica SA, *Minas Gerais, Brasil*), seguindo-se rigorosamente as instruções de uso do fabricante. Uma alíquota de 100 µL da amostra de sangue foi transferida para um tubo estéril do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e incubada, à temperatura ambiente, com uma solução de lise de hemácias, durante 5 minutos. Após a lise das hemácias, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm, durante 1 minuto, em microcentrífuga (FANEN, *São*

Paulo, SP). O sobrenadante foi descartado e o sedimento de leucócitos ressuspenso em 270 μL de solução de lise celular, 200 μL de tampão quelante e 2 μL de proteinase K, seguindo-se com homogeneização em vórtex e incubação a 56°C durante 5 minutos. Posteriormente foram adicionados ao tubo do tipo *Eppendorf*, 100 μL de tampão de extração e 10 μL de resina magnética, seguindo-se com homogeneização e repouso durante 5 minutos a 56°C. Neste período de repouso, o DNA liga-se à partícula magnética. Em seguida, o tubo do tipo *Eppendorf* foi colocado em estante magnética e a solução foi separada das partículas magnéticas por meio de pipeta. A solução foi descartada e as partículas, ligadas ao DNA, permaneceram aderidas à parede do tubo. Em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão de lavagem às partículas magnéticas ligadas ao DNA, homogeneizado em vórtex e o tubo foi colocado novamente na estante magnética para que a solução separasse das partículas. A solução foi posteriormente descartada lavando-se as partículas mais duas vezes com tampão de lavagem. Após o descarte da solução utilizada na última lavagem o tubo permaneceu aberto, à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados às partículas magnéticas 50 μL do tampão de eluição e realizada incubação à 70°C, durante 10 minutos. Neste período de incubação o DNA se desprende da partícula. Após o tempo de incubação, o tubo foi colocado na estante magnética e a solução, contendo DNA foi separada das partículas utilizando uma pipeta e transferida para outro tubo do tipo *Eppendorf*.

4.4.2. Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction - PCR*) e polimorfismo de fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP*)

4.4.2.1 PCR para amplificação do segmento genômico específico

A PCR, seguida da digestão com endonucleases de restrição (RFLP), foi realizada para investigação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A na região

promotora do gene do FVII, segundo o protocolo descrito por van't Hooft *et al.* (1999), com pequenas adaptações.

Para a PCR, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*Integrated DNA Technologies®*, Coralville, IA), desoxirribonucleotídeos (*Fermentas®*, Burlington, NJ), tampão (*Phoneutria®*, Belo Horizonte, MG) e Taq polimerase 5U/μL (*Phoneutria®*, Belo Horizonte, MG), em volume final de 30 μL de reação. As reações foram conduzidas em termociclador (*Techne TC-312*, Burlington, NJ).

Os oligonucleotídeos utilizados encontram-se listados no **Quadro 1**, os volumes de cada um dos componentes da PCR encontram-se listados no **Quadro 2** e as condições de reação encontram-se descritas no **Quadro 3**.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do segmento genômico do FVII

Polimorfismo	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antissenso
Gene do FVII ¹	5'- GTT GAC ATT CCC CAT GGG AC-3'	5'-GGC TCA CCT AAG AAA CCA GC-3'

¹van't Hooft *et al.* 1999
FVII: Fator VII da coagulação

Quadro 2 - Volume e concentração de cada um dos componentes utilizados na PCR para amplificação de fragmento genômico do FVII

Componentes	Volume por reação (μL)	Concentração final
	FVII	FVII
Água	17,6	-
Tampão 10x	3,0	1x
dNTPs (10mM)	3,0	30nM
Oligo S 100mM (1:10)	2,0	20nM
Oligo A 100mM (1:10)	2,0	20nM
Taq polimerase (5U/μL)	0,4	0,07U/μL
DNA (≈40ng/μL)	2,0	2,7ng/μL
Volume Total:	30	

FVII: Fator VII da coagulação
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos
Oligo S e A: Oligonucleotídeo iniciador senso e Oligonucleotídeo iniciador antissenso
DNA: Ácido desoxirribonucleico

Quadro 3 - Condições de reação para amplificação de fragmento genômico específico do FVII

	Temperatura (°C)	Tempo (segundos)	Ciclos
Desnaturação inicial	94	180	35
Anelamento	69	60	
Extensão	72	120	
Desnaturação	94	30	
Extensão final	72	600	

4.4.2.2 Polimorfismo de fragmento de restrição

Após a realização da PCR, uma alíquota da reação de amplificação foi digerida com endonuclease de restrição específica, em temperatura adequada, como mostram os **Quadros 4 e 5**.

Quadro 4 - Enzimas de restrição utilizadas na digestão do fragmento específico

Polimorfismo	Endonuclease de restrição
Gene do FVII ¹	<i>BsI</i> (10U/μL)*
	<i>Tai</i> (Maell) (10U/μL)**

¹van't Hooft *et al.* 1999

* New England Biolabs Inc, Ipswich, MA ou Fermentas Life Science, Burlington, NJ

** Fermentas Life Science, Burlington, NJ

Quadro 5 - Condições de digestão do produto de PCR de fragmento genômico do FVII

Componentes	Volume por reação (μL)		Concentração final		Temperatura da reação	
	<i>BsI</i>	<i>Tai</i>	<i>BsI</i>	<i>Tai</i>	<i>BsI</i>	<i>Tai</i>
Água	8,8	9,0	-	-	55°C	65°C
Tampão 10x	2,0	2,0	1x	1x		
Enzima de restrição	1,2	1,0	0,6U/μL	0,5U/μL		
Produto de PCR	8,0	8,0	-	-		
Volume Total:	20	20				

Os fragmentos obtidos após digestão foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e, posteriormente, corados com nitrato de prata (SANTOS *et al.*, 1993). O controle da qualidade dos reagentes e de todo o processo da reação

foi feito utilizando um branco de reação, que contém todos os reagentes, exceto o DNA, e passa por todas as etapas de PCR-RFLP.

Os diferentes padrões dos fragmentos obtidos após eletroforese podem ser observados na **Figura 2**.

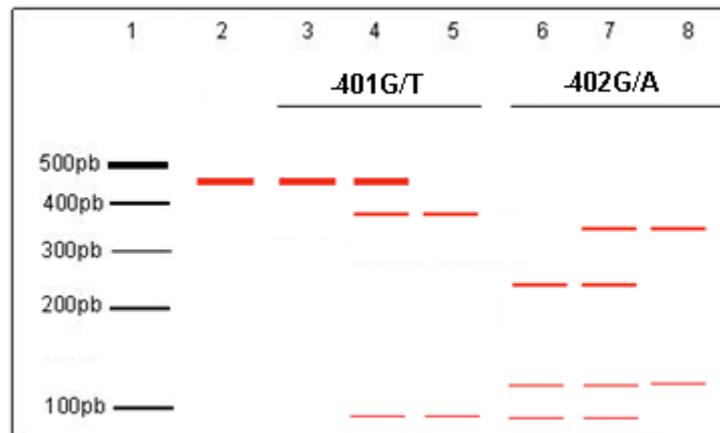


Figura 2 - Padrões de fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonucleases de restrição

Perfil de fragmentos:

1. Padrão de peso molecular;
2. Produto da PCR para amplificação de um segmento específico do gene do Fator VII (467pb);
3. Carreador do genótipo GG do polimorfismo -401G/T no gene do Fator VII (467pb);
4. Carreador do genótipo GT do polimorfismo -401G/T no gene do Fator VII (467, 370 e 97pb);
5. Carreador do genótipo TT do polimorfismo -401G/T no gene do Fator VII (370 e 97pb);
6. Carreador do genótipo GG do polimorfismo -402G/A no gene do Fator VII (253,121 e 93pb);
7. Carreador do genótipo GA do polimorfismo -402G/A no gene do Fator VII (346, 253, 121 e 93pb);
8. Carreador do genótipo AA do polimorfismo -402G/A no gene do Fator VII (346 e 121pb);

Cumprе ressaltar que para detectar o polimorfismo -402G/A foi utilizada a enzima *BsI*, que cliva o fragmento obtido na PCR quando uma G está presente na posição -402 e outra na posição -401. Na presença do alelo T na posição -401, ocorre a perda do sítio de restrição da enzima *BsI*. Dessa forma, é sempre necessário identificar o polimorfismo -401G/T, em associação ao -402G/A.

No **Quadro 6** pode-se visualizar a interpretação do resultado após genotipagem simultânea dos polimorfismos -401G/T e -402G/A.

Quadro 6 - Interpretação do resultado para o polimorfismo -402G/A, considerando o resultado do polimorfismo -401G/T

Digestão com <i>Taï</i> (-401 G/T)	Digestão com <i>Bs</i> <i>l</i> (-402 G/A)	Resultado Final (-402G/A)
Genótipo GG (467pb)	Genótipo GG (93, 121, 253pb)	Genótipo GG para o polimorfismo -402 G/A
Genótipo GG (467pb)	Genótipo GA (93, 121, 253, 346pb)	Genótipo GA para o polimorfismo -402 G/A
Genótipo GG (467pb)	Genótipo AA (121, 346pb)	Genótipo AA para o polimorfismo -402 G/A
Genótipo GT (97, 370, 467pb)	Genótipo GA (93, 121, 253, 346pb)	Genótipo GG para o polimorfismo -402 G/A
Genótipo GT (97, 370, 467pb)	Genótipo AA (121, 346pb)	Genótipo GA para o polimorfismo -402 G/A
Genótipo TT (97, 370pb)	Genótipo AA (121, 346pb)	Genótipo GG para o polimorfismo -402 G/A

4.4.3 Avaliação do perfil hemostático

4.4.3.1 Determinação do fator tissular

A determinação da concentração plasmática do FT foi feita pelo método *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) de captura, empregando-se o conjunto diagnóstico IMUBIND[®] Tissue Factor ELISA Kit 845 (AMERICAN Diagnostica Inc, *Stamford, CT*), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na ligação do FT presente no plasma a ser testado, ao anticorpo monoclonal (anti FT humano) adsorvido à superfície da microplaca. Após a etapa de incubação da amostra, a microplaca é lavada para retirar os antígenos que não se ligaram e, em seguida, um anticorpo monoclonal biotinizado (anti FT) é adicionado. Este último liga-se a um determinante antigênico do FT, distinto daquele ligado ao anticorpo adsorvido na microplaca. Após incubação, uma segunda lavagem é realizada para retirar o excesso de anticorpo biotinizado. A etapa seguinte consiste da adição do conjugado estreptavidina-peroxidase para completar a formação do complexo de detecção anticorpo-enzima, seguida de incubação e nova lavagem. A revelação do FT capturado na primeira

etapa é feita por meio da reação da enzima peroxidase com o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), na presença de peróxido de hidrogênio. Essa reação resulta na formação de um produto corado e é interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de FT no plasma.

As etapas de lavagem foram realizadas em lavadora de microplacas (EW-2006 - B4B Ltd - *China*) e a leitura da reação de ELISA foi feita utilizando-se leitor de microplacas (ER-2006 Reader - B4B Ltd - *China*).

A concentração de FT de cada amostra foi obtida interpolando-se a absorbância lida em uma curva de calibração. A curva foi construída, conforme orientação do fabricante, em programa Microsoft Office Excel, plotando-se no eixo "x" a concentração de cada um dos calibradores fornecidos pelo fabricante (50, 100, 200, 500 e 1000 pg/mL) e no eixo "y" a média das absorbâncias obtidas para cada calibrador.

De acordo com informações do fabricante, ainda não foi estabelecida a faixa de valores de referência para o fator tissular em plasma humano.

4.4.3.2 Determinação do inibidor da via do fator tissular

A determinação da concentração plasmática do TFPI foi feita pelo método ELISA de captura, empregando-se o conjunto diagnóstico IMUBIND® Total TFPI ELISA Kit 849 (AMERICAN Diagnostica Inc, *Stamford, CT*), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste é o mesmo descrito para o FT, diferindo-se deste último somente em relação ao anticorpo imobilizado na microplaca (anticorpo policlonal anti TFPI) e à composição do biotinilado (anticorpo monoclonal biotinilado anti TFPI).

As etapas de lavagem foram realizadas em lavadora de microplacas (EW-2006 - B4B Ltd - *China*) e a leitura da reação de ELISA foi feita utilizando-se leitor de microplacas (ER-2006 Reader - B4B Ltd - *China* ou Stat Fax 4200 - Awareness Technologies - *USA*).

A concentração de TFPI de cada amostra foi obtida interpolando-se a absorbância lida em uma curva de calibração. A curva foi construída, conforme

orientação do fabricante, em programa Microsoft Office Excel, plotando-se no eixo “x” a concentração do calibrador fornecido pelo fabricante (5,0 ng/mL), e as quatro diluições sucessivas desse, preparadas no momento do uso, correspondentes a 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 ng/mL e no eixo “y” a média das absorbâncias obtidas para cada calibrador.

4.4.3.3 Determinação do fator VII da coagulação

A determinação da concentração plasmática do FVII foi feita pelo método ELISA de captura, empregando-se o produto desenvolvido *in house*.

4.4.3.3.1 Sensibilização da microplaca

Microplacas de poliestireno (MaxiSorp™ Nunc Immuno Module/Strip Plates, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura (Capture Antibody FVII-EIA-C - Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN) diluído 1:100 em tampão bicarbonato 0,1 M, pH 9,5, conforme instrução do fornecedor do anticorpo. A cada poço da microplaca foram adicionados 100 µL da solução de sensibilização.

Após 22 horas de incubação entre 2-8°C, os anticorpos não ligados foram removidos por meio de lavagens sucessivas. A primeira etapa de lavagem foi realizada utilizando-se, em cada poço da placa, 250 µL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 150 mM, contendo *Tween* 20 0,05% e para a segunda etapa utilizou-se 250 µL de solução NaCl 150 mM. As etapas de lavagem foram realizadas em lavadora de microplacas (EW-2006 - B4B Ltd - China).

Em seguida à lavagem foi feito o bloqueio, adicionando a cada poço da microplaca 250 µL da solução de bloqueio (NaCl 150 mM, albumina bovina 1% e sacarose 10%) e, posteriormente, incubação por duas horas à temperatura ambiente (entre 15 e 30°C). Após a incubação, a solução de bloqueio foi desprezada, a

microplaca foi colocada dentro de saco plástico limpo e seco, juntamente com sílica gel e submetida à secagem à temperatura ambiente.

4.4.3.3.2 Realização do ensaio

As amostras de plasma citratado armazenadas a -80°C foram submetidas a descongelamento em banho-maria a 37°C durante 30 minutos, antes de serem testadas. Após o descongelamento, as amostras foram suavemente homogeneizadas e diluídas 1:41 em solução diluente de amostras contendo 8,0 g/L de NaCl, 1,15 g/L de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), 0,2 g/L de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 0,2 g/L de cloreto de potássio (KCl) e *Tween* 20 0,05%, pH 7,4.

O calibrador (Human Factor VII - HFVII 1007 - Enzyme Research Laboratories, *South Bend, IN*) foi reconstituído conforme instrução do fabricante, posteriormente diluído com solução diluente de amostra e determinado em duplicata (ver item 4.4.3.3.3).

Após adição de 100 μL dos calibradores ou amostras-teste diluídas a cada um dos poços, a microplaca foi coberta com plástico adesivo e incubada durante 60 minutos à temperatura ambiente (entre 15 e 30°C). Seguindo-se à incubação, foram realizadas lavagens sucessivas com o objetivo de retirar os antígenos que não se ligaram ao anticorpo adsorvido na microplaca. Cada um dos poços da microplaca foi lavado cinco vezes com 250 μL de solução de lavagem (8,0 g/L de NaCl, 1,15 g/L de Na_2HPO_4 , 0,2 g/L de KH_2PO_4 , 0,2 g/L de KCl e *Tween* 20 0,2%, pH 7,4). As etapas de lavagem foram realizadas em lavadora de microplacas (EW-2006 - B4B Ltd - *China*). A etapa subsequente do ensaio consistiu na adição de 100 μL do anticorpo conjugado à peroxidase a cada um dos poços de reação e incubação à temperatura ambiente (entre 15 e 30°C) durante 1 hora. O conjugado foi preparado pela diluição 1:100 do anticorpo de detecção (Detecting Antibody FVII-EIA-D - Enzyme Research Laboratories, *South Bend, IN*) conforme instrução do fornecedor, em solução diluente de conjugado (Horseradish Peroxidase Diluent HRPD-1000 - Moss, *Pasadena, MD*) previamente diluída 1:2 com solução salina 150 mM. Após a incubação com o anticorpo conjugado foram realizadas cinco lavagens, utilizando-se

a solução de lavagem e lavadora de microplacas (EW-2006 - B4B Ltd - *China*). Para revelação da reação foram adicionados a cada poço da microplaca 100 µL de TMB (Ultra Sensitive Substrate 2,08 mmol/L TMBUS-1000 - Moss, *Pasadena, MD*), seguida de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente (ente 15 e 30°C). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. A cor amarela formada após a adição da solução de parada foi lida em 490 nm. A leitura da absorbância deve ser realizada em até 10 minutos após a interrupção da reação.

A concentração de FVII de cada amostra foi obtida interpolando-se a absorbância lida em uma curva de calibração. A curva foi construída em programa Microsoft Office Excel, plotando-se no eixo “x” a concentração do calibrador e as diluições sucessivas desse e no eixo “y” a média das absorbâncias obtidas para cada calibrador.

4.4.3.3 Validação do ensaio

Para validação do produto desenvolvido *in house* foi realizada a avaliação da repetitividade e reprodutibilidade do teste, homogeneidade da placa e resposta da curva de calibração, conforme indicado pelo fornecedor do calibrador.

A repetitividade do teste foi avaliada por meio da determinação de três amostras nativas em triplicata. Foi obtido um coeficiente de variação intraensaio médio igual a 9,3%.

A reprodutibilidade do teste foi avaliada ensaiando a mesma amostra em quatro diferentes placas. A diferença da concentração obtida para a amostra foi igual a 5,4%.

Para avaliar a homogeneidade da microplaca, várias amostras foram aplicadas em diferentes posições. A diferença média obtida foi igual a 9,3%.

O erro total analítico aceitável, baseado nos componentes mínimos da Variação Biológica é $<\pm 16,1\%$ para o fator VII da coagulação (RICOS *et al.*, 1999).

Para validação da curva de calibração, o calibrador foi reconstituído conforme indicação do fabricante, obtendo-se, desta forma, um material com concentração igual a 0,57 mg/mL. Após reconstituição, o material foi diluído com solução diluente

de amostras, para que fossem obtidos os pontos de calibração com concentrações iguais a 57,00; 28,50; 14,25; 7,13; 3,56 e 1,78 ng/mL. Depois de ensaiado (ver item 4.4.3.3.2) a absorbância obtida para o calibrador de nível mais alto foi >1,000, conforme recomendado pelo fabricante.

Para um teste inicial de diluição de amostras, três amostras nativas com concentrações distintas foram diluídas 1:20, 1:40 e 1:80, conforme indicação do fornecedor de anticorpos e ensaiadas conforme descrito no item 4.4.3.3.2. Os resultados obtidos foram avaliados e concluiu-se que a diluição de aproximadamente 1:40 era a mais adequada para ser aplicada ao teste, tendo em vista os pontos definidos para a curva de calibração.

As placas sensibilizadas foram utilizadas logo após a finalização da etapa de sensibilização, sendo assim, não foi necessário avaliar a estabilidade da fase sólida. Os reagentes aplicados no ensaio também foram preparados imediatamente antes do uso.

4.4.3.4 Determinação do fator VII ativado

A determinação quantitativa da atividade do FVIIa foi feita pelo método coagulométrico, empregando-se o conjunto diagnóstico STACLOT® VIIa-rTF 00281 (Diagnostica Stago SAS, *Asnières sur Seine, France*), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

As amostras a serem testadas foram diluídas com um tampão fornecido pelo fabricante. Em seguida, o tempo de coagulação foi determinado incubando-se a amostra diluída com o plasma deficiente em FVII, com o reagente contendo Fator Tissular recombinante solúvel (rsTF) e fosfolípidos e adicionando-se cloreto de cálcio (CaCl₂). O princípio do teste se baseia na propriedade do rsTF atuar como cofator específico para o FVIIa. Dessa forma, na presença de FVIIa, fosfolípidos e cálcio o rsTF promove a coagulação do plasma. Neste sistema, o tempo de formação do coágulo tem relação inversa com os níveis plasmáticos de FVIIa. O rsTF não ativa o FVII, conseqüentemente, o FVII presente no plasma não interfere na determinação de FVIIa.

O ensaio foi realizado no coagulômetro Coagulator 2 (Organon Teknika, Oss, NL).

A atividade de FVIIa de cada amostra foi determinada interpolando-se o tempo de formação do coágulo em uma curva de calibração. A curva foi construída conforme orientação do fabricante, em programa Microsoft Office Excel, plotando-se no eixo "x" a concentração de cada calibrador (mU/mL) e no eixo "y" a respectiva média do tempo de formação do coágulo (segundos) obtida para cada calibrador.

4.5 Análise estatística

O cálculo amostral para os parâmetros hemostáticos foi realizado utilizando-se o programa G Power 3.1.2, considerando-se um poder estatístico entre 0,80 e 0,90. As médias consideradas para os cálculos foram baseadas em estudo piloto de amostras. Para cada grupo, calculou-se a média e o desvio-padrão. A comparação dos três grupos foi realizada por ANOVA. O cálculo amostral revelou que para a determinação plasmática de FT seriam necessárias 20 integrantes por grupo; para TFPI, 30 por grupo; para FVII, 10 por grupo e para FVIIa, 15 por grupo.

Para o cálculo amostral da frequência dos polimorfismos, utilizou-se o programa G Power 3.1.2, considerando-se um poder estatístico igual a 0,80. As proporções consideradas para os cálculos foram baseadas em estudo piloto de amostras. Para a pesquisa do polimorfismo -401G/T no gene do FVII seriam necessárias 507 integrantes por grupo e para o polimorfismo -402G/A seriam necessários 287 integrantes por grupo.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa SPSS (versão 13.0) e GENEPOP (RAYMOND e ROUSSET, 1995).

A normalidade dos dados foi testada pelo método de *Shapiro-Wilk*.

Os dados não paramétricos estão apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75%). A comparação das variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foi feita pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Quando foi detectada diferença entre os grupos, esses foram comparados dois a dois pelo método *Mann-Whitney*.

A comparação das variáveis que apresentaram distribuição normal foi feita pelo Teste *T de Student* (dois grupos) ou teste ANOVA/LSD (três grupos).

A comparação das variáveis categóricas foi feita pelo teste do qui-quadrado (χ^2) de Pearson exato ou assintótico.

Um valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A área sob a curva (AUC) foi avaliada utilizando-se o programa SPSS (versão 13.0). Foram considerados AUC=0,5 como hipótese nula e um valor de $p \leq 0.05$ estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas das integrantes dos três grupos avaliados

As características clínicas comuns às integrantes dos três grupos avaliados neste estudo estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Características clínicas das integrantes do estudo

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}
Idade (anos)	26	24	25	-	-	-	0,164 ¹
DI	(10)	(9)	(9)				
(n)	(109)	(106)	(120)				
IMC (Kg/m²)	24,0	23,6	21,8	0,280 ²	0,001 ²	0,026 ²	0,003 ¹
DI	(6,5)	(6,1)	(5,4)				
(n)	(73)	(97)	(103)				
IG (sem)	33	33	-	0,956 ²	-	-	-
DI	(5)	(6)					
(n)	(107)	(106)					
GPG (Kg)	12,7	10,0	-	0,004 ²	-	-	-
DI	(7,9)	(7,0)					
(n)	(79)	(101)					
Nº primigestas^A	56	43	-	0,112 ³	-	-	-
(n)	(109)	(106)					
Nº de abortos^A	21	23	-	0,659 ³	-	-	-
(n)	(109)	(106)					
PA sist (mmHg)	170	110	120	<0,001 ²	<0,001 ²	<0,001 ²	<0,001 ¹
DI	(20)	(0)	(10)				
(n)	(108)	(103)	(100)				
PA diast (mmHg)	110	70	80	<0,001 ²	<0,001 ²	<0,001 ²	<0,001 ¹
DI	(15)	(0)	(10,5)				
(n)	(108)	(103)	(100)				

DI: diferença interquartilica (25%-75%); IMC: índice de massa corporal; IG: idade gestacional; sem: semanas; GPG: ganho de peso na gestação; PA: pressão arterial; sist: sistólica; diast: diastólica.

^Δp: (Kruskal- Wallis¹/Mann-Whitney²) e Teste χ^2 assintótico³.

^A Números absolutos.

p¹: grupo I x grupo II; p²: grupo I x grupo III; p³: grupo II x grupo III; p⁴: grupo I x grupo II x grupo III.

As características clínicas das participantes dos grupos I e II foram obtidas a partir dos prontuários médicos e do cartão de pré-natal. Os dados das participantes do grupo III foram obtidos durante a entrevista para preenchimento da ficha clínica.

A comparação da idade das integrantes dos três grupos revelou que não houve diferença significativa entre os mesmos ($p=0,164$). A idade gestacional também não diferiu significativamente comparando-se os grupos I e II ($p=0,956$).

O índice de massa corporal dos grupos I e II, apresentado antes da gestação, mostrou diferença significativa ao se comparar os grupos I e III ($p=0,001$) e os grupos II e III ($p=0,026$). Não foi observada diferença significativa ao comparar os grupos I e II ($p=0,280$).

O ganho de peso na gravidez foi significativamente superior no grupo I quando comparado ao grupo II ($p=0,004$).

Os valores da pressão sistólica e diastólica foram diferentes comparando-se os três grupos avaliados, sendo maior no grupo I e menor no grupo II.

5.2 Parâmetros laboratoriais e clínicos do Grupo I

Os dados laboratoriais das gestantes com PE grave, obtidos a partir dos prontuários médicos, estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave

Parâmetros	Média/Mediana	DP/IQ (25-75%)	Intervalo de referência ¹
Número de hemácias x 10 ³ /mL ^A	4040 (n=98)	3770 - 4370	4200 a 5500
Hemoglobina (g/dL) ^B	11,9 (n=107)	1,54	12 a 16
Hematócrito (%) ^B	36,2 (n=106)	4,42	37 a 47
Número de plaquetas x 10 ³ /mL ^A	173 (n=105)	129 - 237	140 a 440
Contagem global de leucócitos /mm ³ ^B	10966 (n=74)	3461	4300 a 10000
AST (U/L) ^A	25,0 (n=104)	19,5 - 35,5	<31
ALT (U/L) ^A	18,0 (n=104)	11,0 - 29,0	<34
Ácido úrico (mg/dL) ^B	5,59 (n=96)	1,38	2,6 a 6,0
Bilirrubina total (mg/dL) ^A	0,33 (n=32)	0,29 - 0,49	0 a 2,0
Bilirrubina indireta (mg/dL) ^A	0,25 (n=30)	0,11 - 0,39	-
Bilirrubina direta (mg/dL) ^A	0,10 (n=30)	0,04 - 0,20	0 a 0,2
LDH (U/L) (Met. Piruvato → Lactato) ^A	446 (n=81)	340 - 562	200 a 480
LDH (U/L) (Met. Lactato → Piruvato) ^B	258 (n=18)	77,9	125 a 220
Ureia (mg/dL) ^A	24,0 (n=81)	16 - 33	15 a 39
Creatinina (mg/dL) ^A	0,8 (n=88)	0,6 - 0,9	0,6 a 1,1
Proteinúria (g/24hrs) ^B	3,56 (n=46)	2,49	<0,15
Proteinúria fita ^C	n=81		Negativa
Negativa	03 (3,7%)	-	
Positiva			
+	04 (4,9%)	-	
++	20 (24,7%)	-	
+++	23 (28,4%)	-	
++++	31 (38,3%)	-	

AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina amino transferase; LDH: desidrogenase láctica; Met: metodologia.

^A Dados não-paramétricos, apresentados como mediana (intervalo interquartil 25-75% - IQ).

^B Variáveis que seguem a normalidade. Dados apresentados como média ± desvio padrão (DP).

^C Números absolutos.

¹ BURTIS *et. al.*, 2006; WINTROBE *et al.*, 1981.

Os parâmetros do hemograma, as enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e desidrogenase láctica (LDH), as bilirrubinas direta, indireta e total, bem como o ácido úrico, a creatinina e a ureia apresentaram média ou mediana dentro do intervalo de referência ou bem próximas desse. A proteinúria de 24 horas revelou-se elevada neste grupo, tendo sido avaliadas 46 pacientes.

Com relação à sintomatologia clínica, 58 (53,2%) gestantes relataram cefaleia, 24 (22%) relataram epigastria, 21 (19,3%) relataram escotoma e 09 (8,3%) apresentaram reflexo patelar aumentado.

Foi observado que 44 gestantes apresentaram edema em graus variados, sendo: + em 10 gestantes (22,7%), ++ em 14 (31,8%), +++ em 13 (29,5%) e ++++ em 07 gestantes (15,9%).

A terapia anti-hipertensiva incluiu o uso de nifedipina para 73 (67%) gestantes, metildopa para 43 (39,4%) gestantes e hidralazina para 16 (14,7%) gestantes do grupo I. Para prevenir as crises convulsivas foi administrado sulfato de magnésio para 36 (33%) e para induzir a maturação pulmonar do feto, visando a interrupção da gestação, foi administrado corticoide para 39 (35,8%) gestantes desse grupo.

Apesar da internação hospitalar e das tentativas terapêuticas de controlar a hipertensão e as convulsões, três (2,8%) gestantes foram diagnosticadas com síndrome HELLP e três (2,8%) apresentaram eclâmpsia.

No grupo de gestantes com diagnóstico de PE grave havia oito casos (7,3%) de gravidez gemelar, enquanto no grupo II não houve nenhum caso.

5.3 Parâmetros hemostáticos dos três grupos avaliados

Foi realizada a avaliação dos níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa das integrantes dos três grupos estudados.

A **Tabela 3** e a **Figura 3** mostram os resultados de FT, TFPI, FVII e FVIIa obtidos para as gestantes com PE grave (grupo I), gestantes normotensas (grupo II) e mulheres não gestantes (grupo III).

Tabela 3 - Níveis plasmáticos de FT (pg/mL), TFPI (ng/mL), FVII (ng/mL) e FVIIa (mU/mL) para os grupos I, II e III

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}
FT	333,91	290,13	392,95	-	-	-	0,491 ¹
DI	(204,24)	(226,40)	(220,08)				
(n)	(59)	(49)	(50)				
TFPI	83,48	56,09	46,29	<0,001 ²	<0,001 ²	0,942 ²	<0,001 ¹
DI	(77,73)	(56,17)	(56,09)				
(n)	(79)	(80)	(79)				
FVII	521,88	294,63	134,85	0,001 ²	<0,001 ²	<0,001 ²	<0,001 ¹
DI	(643,66)	(364,55)	(133,24)				
(n)	(94)	(98)	(104)				
FVIIa	88,68	67,78	45,28	0,014 ⁴	<0,001 ⁴	0,009 ⁴	<0,001 ³
DP	(36,16)	(23,71)	(16,51)				
(n)	(20)	(22)	(19)				

FT: níveis plasmáticos de fator tissular (pg/mL); TFPI: níveis plasmáticos do inibidor da via do fator tissular (ng/mL); FVII: níveis plasmáticos do fator VII da coagulação (ng/mL); FVIIa: níveis plasmáticos do fator VII ativado (mU/mL); DI: diferença interquartilica (25%-75%); DP: desvio padrão.

^Δp: *Kruskal-Wallis*¹/*Mann-Whitney*² e *ANOVA*³/*LSD*⁴.

p¹: grupo I x grupo II; p²: grupo I x grupo III; p³: grupo II x grupo III; p⁴: grupo I x grupo II x grupo III.

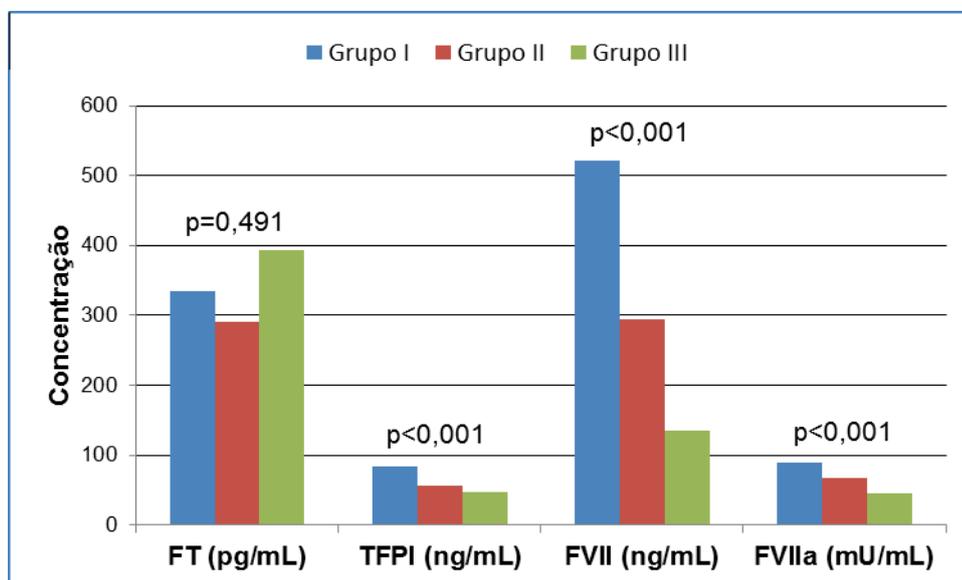


Figura 3 - Níveis plasmáticos de FT (pg/mL), TFPI (ng/mL), FVII (ng/mL) e FVIIa (mU/mL) nos grupos I (gestantes com PE grave), II (gestantes normotensas) e III (mulheres não gestantes).

Não foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de FT, comparando-se os três grupos estudados.

Comparando-se as medianas relativas à concentração plasmática de TFPI, observou-se diferença significativa entre os grupos I e II (p^1) e entre os grupos I e III (p^2). Não houve diferença entre os grupos II e III (p^3).

A comparação dos níveis plasmáticos de FVII e FVIIa, revelou diferença significativa entre as medianas obtidas para o grupo I x grupo II (p^1), grupo I x grupo III (p^2) e grupo II x grupo III (p^3).

A **Tabela 4** mostra os resultados de TFPI obtidos para as gestantes dos grupos I (PE grave) e grupo II (normotensas), agrupados de acordo com a idade gestacional.

Tabela 4 - Níveis plasmáticos de TFPI (ng/mL) para os grupos I e II, agrupados de acordo com a idade gestacional.

	Grupo I	Grupo II	p^A
TFPI - IG \geq 30 sem. (DI) (n)	83,04 (80,80) (71)	48,64 (55,74) (60)	<0,001
TFPI - IG \geq 31 sem. (DI) (n)	83,26 (80,89) (62)	48,64 (56,03) (54)	<0,001
TFPI - IG \geq 32 sem. (DI) (n)	79,64 (86,11) (54)	49,10 (61,12) (45)	0,002
TFPI - IG \geq 33 sem. (DI) (n)	74,99 (88,44) (46)	43,44 (60,39) (38)	0,002
TFPI - IG \geq 34 sem. (DI) (n)	66,02 (79,73) (36)	40,19 (72,36) (31)	0,018

TFPI: Níveis plasmáticos do inibidor da via do fator tissular (ng/mL); IG: idade gestacional; sem.: semanas; DI: diferença interquartilica (25%-75%).

^Ap: *Mann-Whitney*.

A comparação dos níveis plasmáticos de TFPI revelou diferença significativa entre as medianas obtidas para o grupo I x grupo II, independente da idade gestacional das participantes.

A **Tabela 5** mostra os resultados de FVII obtidos para as gestantes dos grupos I (PE grave) e grupo II (normotensas) agrupados de acordo com a idade gestacional.

Tabela 5 - Níveis plasmáticos de FVII (ng/mL) para os grupos I e II, agrupados de acordo com a idade gestacional.

	Grupo I	Grupo II	p^A
FVII - IG ≥ 30 sem. (DI)	542,09 (681,35)	314,62 (384,13)	0,004
(n)	(82)	(75)	
FVII - IG ≥ 31 sem. (DI)	532,27 (682,65)	298,93 (365,58)	0,007
(n)	(70)	(69)	
FVII - IG ≥ 32 sem. (DI)	525,14 (708,61)	325,94 (378,68)	0,046
(n)	(61)	(60)	
FVII - IG ≥ 33 sem. (DI)	579,12 (755,65)	298,23 (337,46)	0,009
(n)	(50)	(52)	
FVII - IG ≥ 34 sem. (DI)	618,10 (784,90)	294,36 (312,27)	0,003
(n)	(39)	(44)	

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); IG: idade gestacional; sem.: semanas; DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Ap: *Mann-Whitney*.

A comparação dos níveis plasmáticos de FVII revelou diferença significativa entre as medianas obtidas para o grupo I x grupo II, independente da idade gestacional das participantes do grupo I e II.

A **Tabela 6** mostra os resultados de FVIIa obtidos para as gestantes dos grupos I (PE grave) e grupo II (normotensas) agrupados de acordo com a idade gestacional.

Tabela 6 - Níveis plasmáticos de FVIIa (mU/mL) para os grupos I e II, agrupados de acordo com a idade gestacional.

	Grupo I	Grupo II	p^A
FVIIa - IG ≥ 30 sem. (DP)	86,74 (37,14)	72,49 (22,73)	0,174
(n)	(18)	(18)	
FVIIa - IG ≥ 31 sem. (DP)	86,72 (38,20)	72,91 (23,71)	0,229
(n)	(16)	(16)	
FVIIa - IG ≥ 32 sem. (DP)	83,95 (40,83)	74,64 (23,47)	0,459
(n)	(14)	(15)	
FVIIa - IG ≥ 33 sem. (DP)	83,15 (44,61)	77,39 (27,31)	0,728
(n)	(11)	(10)	
FVIIa - IG ≥ 34 sem. (DP)	89,80 (49,16)	85,16 (30,14)	0,843
(n)	(08)	(06)	

FVIIa: níveis plasmáticos de FVIIa (mU/mL); IG: idade gestacional; sem.: semanas; DP: desvio padrão.

^Ap: *Teste T.*

Ao se fazer o agrupamento dos grupos I e II de acordo com a idade gestacional, não foi observada diferença significativa entre os níveis de FVIIa em gestantes com PE grave x gestantes normotensas.

A **Tabela 7** mostra os resultados da curva ROC, obtidas para os níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa nos grupos I x II, I x III e II x III.

Tabela 7 - Área sob a curva para os marcadores hemostáticos FT, TFPI, FVII e FVIIa

Marcadores hemostáticos	AUC	p	Intervalo de Confiança - 95%	
			Inferior	Superior
Grupos I x II				
FT	0,591	0,087	0,421	0,761
TFPI	0,671	0,083	0,508	0,835
FVII	0,624	0,085	0,458	0,790
FVIIa	0,730	0,077	0,579	0,882
Grupos I x III				
FT	0,419	0,374	0,237	0,600
TFPI	0,841	<0,001	0,712	0,970
FVII	0,957	<0,001	0,885	1,029
FVIIa	0,900	<0,001	0,793	1,006
Grupos II x III				
FT	0,348	0,097	0,169	0,527
TFPI	0,766	0,004	0,619	0,912
FVII	0,897	<0,001	0,799	0,995
FVIIa	0,780	0,002	0,640	0,920

AUC: área sob a curva; FT: fator tissular, TFPI: inibidor da via do fator tissular; FVII: fator VII da coagulação; FVIIa: fator VII ativado.

Ao avaliar os grupos I x II não foi observada diferença significativa na área sob a curva obtida para os marcadores hemostáticos avaliados.

Para os grupos I e III e os grupos II e III observou-se que a curva obtida para os marcadores TFPI, FVII e FVIIa são significativamente diferente da hipótese nula (AUC=0,5). Para o FT não foi observada diferença significativa.

5.4 Frequência dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos três grupos avaliados

A frequência alélica e genotípica dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos grupos I, II e III está apresentada nas **Tabelas 8 a 11**, respectivamente.

Tabela 8 - Frequência genotípica do polimorfismo -402G/A nos três grupos avaliados

Genótipo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}
GG	81 (74,3%)	66 (64,1%)	74 (64,3%)	0,115	0,105	1,000	0,163
GA	26 (23,9%)	33 (32,0%)	36 (31,3%)				
AA	02 (1,8%)	04 (3,9%)	05 (4,4%)				
TOTAL	109 (100%)	103 (100%)	115 (100%)				

^Δp: Teste χ^2

p¹: grupo I x grupo II; p²: grupo I x grupo III; p³: grupo II x grupo III; p⁴: grupo I x grupo II x grupo III.

Não houve diferença na frequência genotípica nos três grupos avaliados.

Tabela 9 - Frequência alélica do polimorfismo -402G/A nos três grupos avaliados

Alelo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}
G	188 (86,2%)	165 (80,1%)	184 (80,0%)	0,121	0,105	1,000	0,155
A	30 (13,8%)	41 (19,9%)	46 (20,0%)				
TOTAL	218 (100%)	206 (100%)	230 (100%)				

^Δp: Teste χ^2

p¹: grupo I x grupo II; p²: grupo I x grupo III; p³: grupo II x grupo III; p⁴: grupo I x grupo II x grupo III.

Não houve diferença na frequência alélica ao se comparar os grupos I, II e III.

Tabela 10 - Frequência genotípica do polimorfismo -401G/T nos três grupos avaliados

Genótipo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}
GG	60 (55,0%)	74 (71,9%)	73 (63,5%)	0,057	0,259	0,410	0,135
GT	43 (39,5%)	23 (22,3%)	37 (32,2%)				
TT	06 (5,5%)	06 (5,8%)	05 (4,3%)				
TOTAL	109 (100%)	103 (100%)	115 (100%)				

^Δp: Teste χ^2

p¹: grupo I x grupo II; p²: grupo I x grupo III; p³: grupo II x grupo III; p⁴: grupo I x grupo II x grupo III.

A frequência genotípica para o polimorfismo -401G/T não apresentou diferença ao se comparar os grupos I, II e III.

Tabela 11 - Frequência alélica do polimorfismo -401G/T nos três grupos avaliados

Alelo	Grupo I	Grupo II	Grupo III	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}
G	163 (74,8%)	171 (83,0%)	183 (79,6%)	0,039	0,276	0,406	0,110
T	55 (25,2%)	35 (17,0%)	47 (20,4%)				
TOTAL	218 (100%)	206 (100%)	230 (100%)				

^Δp: Teste χ^2

p¹: grupo I x grupo II; p²: grupo I x grupo III; p³: grupo II x grupo III; p⁴: grupo I x grupo II x grupo III.

A frequência do alelo T foi maior no grupo I quando comparado ao II (p¹=0,039). Não houve diferença ao se comparar os grupos I e III (p²=0,276) e II e III (p³=0,406).

A distribuição dos genótipos se comportou conforme esperado para a população, considerando o equilíbrio de Hardy-Weinberg (p=0,902).

5.5 Relação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T e os níveis plasmáticos de FVII

5.5.1 Níveis plasmáticos de FVII x presença dos polimorfismos -402G/A e -401G/T

Visando investigar a associação entre os níveis plasmáticos de FVII e a presença dos polimorfismos no gene do FVII, foi realizada a análise contemplando todas as participantes do estudo e, posteriormente, cada grupo individualmente.

Os dados obtidos são apresentados nas **Tabelas 12 a 19**.

Tabela 12 - Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII

Genótipo -402G/A	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 196)	250,33 (389,38)	0,817	0,037	0,532
GA (n= 88)	250,30 (472,66)			
AA (n= 09)	251,28 (725,25)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartilica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis*.

p¹: GG x GA x AA.

Tabela 13 - Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII

Genótipo -401G/T	FVII (DI)	p ^{1Δ}	p ^{2Δ}	p ^{3Δ}	p ^{4Δ}	Correlação de Spearman	
						r	p
GG (n= 184)	273,92 (443,36)	0,069	0,029	0,207	0,031	-0,146	0,012
GT (n= 93)	226,26 (278,28)						
TT (n= 16)	170,38 (375,40)						

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartilica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis/Mann-Whitney*.

p¹: GG x GT; p²: GG x TT; p³: GT x TT; p⁴: GG x GT x TT.

Ao avaliar o polimorfismo -402G/A e os níveis plasmáticos de FVII não foi observada diferença significativa para os diferentes genótipos (p=0,817), bem como não foi observada correlação significativa entre as duas variáveis (p=0,532).

Os níveis plasmáticos de FVII foram significativamente diferentes quando comparados os genótipos GG x TT (p=0,029). Quando foram comparados os genótipos GG x GT (p=0,069) e GT x TT (p=0,207) os níveis plasmáticos de FVII não apresentaram diferença significativa. Além disso, foi observada uma correlação negativa fraca com os níveis de FVII (p= 0,012 e r= -0,146).

Tabela 14 - Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo I

Genótipo -402G/A	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 70)	405,99 (468,64)	0,078	0,152	0,144
GA (n= 23)	709,29 (901,34)			
AA (n= 01)	-			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp: *Mann-Whitney*.

p¹: GG x GA.

Tabela 15 - Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo I

Genótipo -401G/T	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 52)	575,71 (547,69)	0,082	-0,200	0,053
GT (n= 36)	366,71 (755,81)			
TT (n= 06)	208,24 (528,79)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis*.

p¹: GG x GT x TT.

Os níveis plasmáticos de FVII, para o grupo I, não foram significativamente diferentes quando foram avaliados os genótipos dos polimorfismos -402G/A ($p=0,078$) e -401G/T (0,082).

A correlação entre os polimorfismos -402G/A e -401G/T e os níveis plasmáticos de FVII também não foi significativa ($p=0,144$ e 0,053, respectivamente).

Tabela 16 - Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo II

Genótipo -402G/A	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 62)	261,93 (350,80)	0,064	0,190	0,062
GA (n= 31)	314,62 (471,05)			
AA (n= 04)	876,70 (938,86)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis*.

p¹: GG x GA x AA.

Tabela 17 - Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo II

Genótipo -401G/T	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 70)	321,25 (494,04)	0,132	-0,205	0,044
GT (n= 22)	242,88 (233,72)			
TT (n= 05)	172,61 (357,37)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis*.

p¹: GG x GT x TT.

Para as gestantes do grupo II, os níveis plasmáticos de FVII não foram significativamente diferentes quando associados aos diferentes genótipos dos polimorfismos -402G/A e -401G/T (p=0,064 e 0,132, respectivamente).

Para o polimorfismo -401G/T foi observada uma correlação negativa com os níveis de FVII (p= 0,044 e r= -0,205).

Para o polimorfismo -402G/A não foi observada correlação significativa (p=0,062).

Tabela 18 - Presença do polimorfismo -402G/A e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo III

Genótipo -402G/A	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 64)	140,06 (135,29)	0,967	-0,010	0,920
GA (n= 34)	140,90 (149,07)			
AA (n= 04)	151,45 (175,56)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis*.

p¹: GG x GA x AA.

Tabela 19 - Presença do polimorfismo -401G/T e níveis plasmáticos de FVII nas gestantes do Grupo III

Genótipo -401G/T	FVII (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG (n= 62)	157,92 (123,53)	0,185	-0,144	0,150
GT (n= 35)	139,56 (146,93)			
TT (n= 05)	78,29 (218,49)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp: *Kruskal- Wallis*.

p¹: GG x GT x TT.

Para as mulheres não gestantes (grupo III), os níveis plasmáticos de FVII não foram significativamente diferentes quando associados aos diferentes genótipos dos polimorfismos -402G/A e -401G/T (p=0,967 e 0,185, respectivamente).

A correlação entre os polimorfismos -402G/A e -401G/T e os níveis plasmáticos de FVII não foi significativa (p=0,920 e 0,150, respectivamente).

5.5.2 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T

Com o objetivo de investigar a associação dos polimorfismos do gene do FVII e a influência desses nos níveis plasmáticos de FVII, todas as mulheres participantes do estudo foram distribuídas de acordo com os genótipos, independente do grupo ao qual pertenciam.

Os dados obtidos são apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20 - Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A

Genótipo -401/-402	FVII (DI)	p ^{1A}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG/GG	283,72 (427,12) (n= 107)	0,223	0,105	0,072
GG/GA	267,62 (526,43) (n= 68)			
GG/AA	251,28 (725,25) (n= 09)			
GT/GG	215,83 (278,28) (n= 73)			
GT/GA	236,96 (340,53) (n= 20)			
TT/GG	170,38 (375,40) (n= 16)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI diferença interquartílica (25%-75%).

^Ap¹: *Kruskal- Wallis*

Não foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII quando os polimorfismos -401G/T e -402G/A foram associados.

A associação de genótipos não mostrou correlação com os níveis plasmáticos de FVII (p=0,072).

Foi avaliada também, em cada um dos grupos isoladamente, a influência da associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A nos níveis plasmáticos de FVII. (Tabelas 21 a 23).

Tabela 21 - Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A, no grupo I

Genótipo -401/-402	FVII - Grupo I (DI)	p ^{1A}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG/GG	548,10 (401,93) (n= 34)	0,148	0,220	0,033
GG/GA	709,29 (856,96) (n= 17)			
GG/AA	-			
GT/GG	366,71 (723,46) (n= 30)			
GT/GA	603,96 (901,52) (n= 06)			
TT/GG	208,24 (528,79) (n= 06)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Ap¹: *Kruskal- Wallis*

Para o genótipo GG/AA não foi possível realizar o cálculo de média, bem como a análise de dados, devido ao pequeno número de gestantes carreadoras desse genótipo.

Para as gestantes do grupo I não foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII quando foram associados os polimorfismos -401G/T e -402G/A.

A associação de genótipos mostrou correlação com os níveis plasmáticos de FVII ($p=0,033$ e $r=0,220$).

Tabela 22 - Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A, no grupo II

Genótipo -401/-402	FVII - Grupo II (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG/GG	287,37 (438,20) (n= 39)	0,145	0,244	0,016
GG/GA	322,58 (510,97) (n= 27)			
GG/AA	876,70 (938,86) (n= 04)			
GT/GG	302,91 (201,32) (n= 04)			
GT/GA	212,03 (238,79) (n= 18)			
TT/GG	172,61 (357,37) (n= 05)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp¹: *Kruskal- Wallis*

Para as gestantes dos grupos II não foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII quando foram associados os polimorfismos -401G/T e -402G/A.

A associação de genótipos mostrou correlação com os níveis plasmáticos de FVII ($p=0,016$ e $r=0,244$), sendo maior no grupo com genótipo GG/AA.

Tabela 23 - Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -401G/T e -402G/A, no grupo III

Genótipo -401/-402	FVII - Grupo III (DI)	p ^{1Δ}	Correlação de Spearman	
			r	p
GG/GG	161,57 (136,15) (n= 34)	0,560	0,072	0,469
GG/GA	140,90 (117,56) (n= 24)			
GG/AA	151,45 (175,56) (n= 04)			
GT/GG	139,56 (126,58) (n= 25)			
GT/GA	155,32 (205,84) (n= 10)			
TT/GG	78,29 (218,49) (n= 05)			

FVII: níveis plasmáticos de FVII (ng/mL); DI: diferença interquartílica (25%-75%).

^Δp¹: *Kruskal- Wallis*

Para as gestantes dos grupos III não foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII quando foram associados os polimorfismos -401G/T e -402G/A.

A associação de genótipos não mostrou correlação com os níveis plasmáticos de FVII ($p=0,469$).

6 DISCUSSÃO

6.1 Características clínicas dos três grupos avaliados

A análise das características clínicas das participantes dos grupos avaliados (**Tabela 1**) revelou que não houve diferença quando foi comparada a idade das integrantes dos três grupos.

A comparação das gestantes com PE grave (grupo I) e normotensas (grupo II) revelou que não houve diferença significativa na IG, no número de primigestas, no número de abortos e no IMC pré-gestacional. No grupo de gestantes com diagnóstico de PE grave havia oito casos (7,3%) de gravidez gemelar, enquanto no grupo II não houve nenhum caso.

Dentre os fatores de risco para a PE destaca-se a gestação múltipla, a ocorrência dessa doença em gestação anterior, a hipertensão crônica, o diabetes pré-gestacional, a obesidade, a idade superior a 35 anos, a presença de doença vascular, a síndrome de anticorpos antifosfolípidos e a primigestação (SIBAI *et al.*, 1997; CONDE-AGUDELO e BELIZÁN, 2000; CUNNINGHAM *et al.*, 2000; WALKER, 2000; SIBAI *et al.*, 2000).

A idade gestacional, o número de primigestas e o IMC pré-gestacional das gestantes dos grupos I e II foram pareados, assim como a idade das participantes dos três grupos, com o objetivo de minimizar a influência destes fatores nas análises específicas deste estudo. Com o mesmo propósito, não foram incluídas neste estudo mulheres com doenças vasculares e autoimunes e distúrbios da coagulação.

O ganho de peso na gestação foi significativamente superior no grupo I quando comparado ao grupo II. Cunningham *et al.* (2000) relataram que o aumento de peso na gestação de aproximadamente 500 g por semana é considerado normal, no entanto, o ganho ponderal de 1 kg ou mais em qualquer semana, ou 3 kg em um mês, leva à suspeita de PE. O caráter súbito do ganho de peso, ao invés de um aumento distribuído ao longo da gestação é característico desta doença. O ganho ponderal é quase totalmente devido à retenção hídrica excessiva e, geralmente, é demonstrável antes de sinais vitais visíveis de edema. No entanto, é importante

lembrar que o edema é um achado frequente na gestação e atualmente não é mais considerado um parâmetro para diagnóstico de PE.

A comparação dos níveis pressóricos revelou um aumento desses nas gestantes com PE grave (grupo I), em relação às gestantes normotensas (grupo II) e mulheres não gestantes (grupo III). Este achado era esperado, uma vez que pressão sistólica/diastólica igual ou superior a 160 x 110 mmHg constitui um dos critérios de inclusão do grupo I.

A comparação dos grupos II e III revelou uma diminuição significativa dos níveis pressóricos nas gestantes normotensas em relação a mulheres não gestantes. Este achado está em acordo com dados relatados por outros autores. Apesar do aumento do ritmo cardíaco e do volume sanguíneo, fisiologicamente ocorre uma diminuição sistêmica da resistência vascular, com consequente redução da pressão arterial, durante o segundo trimestre e início do terceiro, período gestacional em que se encontravam a maioria das gestantes normotensas incluídas neste estudo (REISS *et al.*, 1987; CUNNINGHAM *et al.*, 2000).

Apesar da internação hospitalar e das terapias específicas para controle da hipertensão e das convulsões, quatro (3,7%) pacientes foram diagnosticadas com síndrome HELLP e três (2,8%) apresentaram eclâmpsia.

Com relação à sintomatologia clínica, 58 (53,2%) pacientes relataram cefaleia, 24 (22%) relataram epigastralgia, 21 (19,3%) relataram escotoma e 09 (8,3%) apresentaram reflexo patelar aumentado. Acredita-se que a cefaleia e o escotoma estejam relacionados ao vasoespasm das arteríolas cerebrais e retiniana, respectivamente. A epigastralgia provavelmente resulta de necrose hepatocelular, do edema e isquemia que distende a cápsula de Glisson (CUNNINGHAM *et al.*, 2000).

6.2 Parâmetros laboratoriais do Grupo I

A mediana da contagem de hemácias (Hm) e as médias dos valores de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) das gestantes com PE, obtidas por meio dos dados coletados dos prontuários médicos, estavam abaixo ou no limiar inferior do intervalo de referência ($4.040 \times 10^3/\text{mL}$, 11,9 g/dL e 36,2% respectivamente). A

anemia, em geral, por carência nutricional ou pela expansão do volume intravascular, é frequentemente observada na gestação. No entanto, não foi objetivo deste estudo avaliar a ocorrência de anemia.

Das três gestantes que evoluíram para síndrome HELLP, uma apresentou anemia intensa ($3.180 \times 10^3/\text{mL}$, 9,4 g/dL e 28,6% para Hm, Hb e Ht, respectivamente), uma apresentou apenas hipocromia e a terceira não apresentou alterações desses parâmetros. A interpretação do eritrograma na PE grave é complexa, devido à possível ocorrência de edema que favorece a hemoconcentração e mascara os valores reais de Hm, Hb e Ht.

A mediana dos valores da contagem de plaquetas (173.000/mL) foi próxima ao limiar inferior do intervalo de referência (140.000 a 440.000/mL) (WINTROBE *et al.*, 1981). Diversos estudos relataram uma plaquetopenia na PE (DUBE *et al.*, 1975; CARON *et al.*, 1991; CADROY *et al.*, 1993; DUSSE, 1999). No entanto, no presente estudo, não foi possível fazer a comparação da contagem de plaquetas entre os grupos avaliados, uma vez que este parâmetro não foi obtido para os grupos II e III.

Os parâmetros bioquímicos das gestantes com PE grave, também coletados dos prontuários médicos, apresentaram média ou mediana dentro do intervalo de referência ou bem próximas desse (**Tabela 2**).

Os parâmetros que avaliam a função hepática mostraram média e medianas dentro do intervalo de referência, exceto o valor de LDH que se mostrou próxima ao limite superior. Esta enzima catalisa a conversão de lactato a piruvato e está presente em alta concentração nas hemácias. A elevação dos seus níveis plasmáticos é um indicativo de hemólise. No entanto, a LDH é também um marcador de lesão celular (ACOG PRACTICE BULLETIN No. 33, 2002; BURTIS *et al.*, 2006).

As três gestantes com PE grave que evoluíram para síndrome HELLP apresentaram os seguintes resultados para os marcadores de função hepática: AST (63U/L, 144U/L e 39U/L); ALT (59U/L, 112U/L e 32U/L); LDH (1393U/L, 1286U/L e 699U/L) e contagem de plaquetas (32.000/mL, 66.000/mL e 100.000/mL).

Um dos critérios de inclusão das gestantes com PE grave neste estudo foi a proteinúria superior a 2 g em urina de 24 horas ou maior que (++) pelo método qualitativo de fita, em amostra isolada de urina. No entanto, três pacientes apresentaram proteinúria negativa e quatro apresentaram (+) pelo método qualitativo de fita. Essas pacientes foram diagnosticadas, pela equipe obstétrica, com quadro

de PE grave com base nos níveis pressóricos e na sintomatologia clínica (ver item 4.2.2).

Embora estudos relatem que na PE grave, em consequência do vasoespasma, pode ocorrer um aumento da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, o que acarretaria uma diminuição da concentração plasmática da creatinina (ACOG PRACTICE BULLETIN No. 33, 2002), a mediana da creatinina está dentro do intervalo de referência.

6.3 Parâmetros hemostáticos dos três grupos avaliados

Neste estudo foi realizada a avaliação da via do FT, por meio da determinação dos níveis plasmáticos de FT, TFPI, FVII e FVIIa das integrantes dos três grupos estudados.

A comparação dos níveis plasmáticos de FT não revelou diferença significativa entre os três grupos avaliados, como mostra a **Tabela 3**. Além disso, as gestantes dos grupos I e II foram avaliadas em conjunto, sem distinguir a idade gestacional, uma vez que não há na literatura estudos que sugerem a alteração do FT ao longo da gestação. Em concordância com os resultados do presente estudo, Freeman *et al.* (2008) e Dusse *et al.* (2011a), em estudos que não fizeram a distinção da forma clínica da doença, relataram que não houve diferença nos níveis plasmáticos de FT comparando mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com diagnóstico de PE.

Paradoxalmente, Erez *et al.* (2008), em um estudo sem distinção da forma clínica da doença e Teng *et al.* (2010), incluindo apenas gestantes com PE grave, observaram um aumento significativo de FT plasmático em gestantes com PE se comparadas a gestantes normotensas. Em concordância com estes pesquisadores, Rousseau *et al.* (2009), que avaliaram gestantes com PE, sem distinguir a forma clínica da doença, relataram que a atividade do FT, bem como a concentração de f-TFPI, estavam aumentadas em gestantes com diagnóstico de PE quando comparadas a gestantes normotensas e mulheres não gestantes.

A distinção da forma clínica da PE é essencial para estabelecer comparações entre os níveis de fatores hemostáticos em gestantes com essa doença e em

gestantes normotensas. Dusse (1999) avaliou nove parâmetros hemostáticos em gestantes com PE grave, PE leve e normotensas. Apenas dois destes, contagem de plaquetas e níveis plasmáticos de PAI-1, estavam significativamente alterados nas gestantes com PE leve quando comparadas às gestantes normotensas, enquanto cinco parâmetros (níveis plasmáticos de TM, t-PA, PAI-1, D-Di e contagem de plaquetas) estavam alterados em gestantes com PE grave quando comparadas às normotensas. A comparação destes parâmetros entre gestantes com PE grave e PE leve revelou que os níveis plasmáticos de TM, t-PA e D-Di estavam mais elevados e o número de plaquetas estava diminuído na PE grave.

O FT total de gestantes pode não ser fielmente refletido pela concentração plasmática deste marcador. Sabe-se que a circulação útero-placentária apresenta um estado de hipercoagulabilidade que visa proteger a circulação materna e fetal, bem como evitar uma hemorragia excessiva no momento de separação da placenta (HIGGINS *et al.*, 1998). Além disso, o fluido amniótico, a placenta e a decídua produzem grande quantidade de FT durante a gestação (KUCZYNSKI *et al.*, 2002), sendo assim, o plasma pode não ser a amostra ideal para se determinar o FT durante a gestação. Considerando também que o FT existe na sua forma ativa e inativa, os níveis plasmáticos de “antígeno” de FT podem não representar a real atividade de FT no plasma.

A comparação dos níveis plasmáticos de FT em gestantes normotensas e mulheres não gestantes também têm revelado resultados contraditórios. Bellart *et al.* (1998) e Holmes e Wallace (2005) relataram que não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de FT ao comparar gestantes normotensas e mulheres não gestantes. Resultados contraditórios foram obtidos por Uszynski *et al.* (2001) e Rousseau *et al.* (2009), que observaram respectivamente um aumento significativo dos níveis plasmáticos de FT e elevação da atividade do FT em gestantes normotensas.

A avaliação da concentração de FT em placenta também apresentou resultados divergentes. López-Ramírez *et al.* (2006) não observaram diferença significativa na concentração de FT em placentas de gestantes com PE grave e normotensas. No entanto, resultados contrários foram relatados por Estellés *et al.* (1998) que observaram aumento da concentração de FT em placenta de gestantes com PE grave.

Sabe-se que a gravidez está associada a alterações complexas da hemostasia, que resultam em um estado de hipercoagulabilidade crescente ao longo da gestação e é máximo no momento do parto. Este estado de hipercoagulabilidade constitui uma adaptação fisiológica do organismo materno para prevenir a ocorrência de hemorragia durante e após a separação da placenta (CATARINO *et al.*, 2008). De fato, estudos prévios mostraram um aumento crescente dos fatores da coagulação ao longo da gestação (POLLER e THOMPSON, 1966; BONNAR *et al.*, 1970; DALAKER e PRYDZ, 1984; STIRLING *et al.*, 1984; DEVIES *et al.*, 1997; MOERLOOSE *et al.* 1998). Dessa forma, os níveis plasmáticos de FVII e FVIIa foram avaliados considerando a idade gestacional das mulheres dos grupos I e II.

A avaliação do principal inibidor *in vivo* da via do FT, o TFPI, revelou diferença entre os grupos I e II e entre os grupos I e III. As gestantes dos grupos I e II foram avaliadas em conjunto, sem distinguir a idade gestacional (**Tabela 3** e **Figura 3**) e foram também agrupadas de acordo com a idade gestacional, (**Tabela 4**), uma vez que um estudo prévio mostrou que os níveis de TFPI variam ao longo da gestação (USZYNSKI *et al.*, 2001; SARIG *et al.*, 2005). O grupo I apresentou níveis mais elevados de TFPI em relação ao grupo III e em relação ao grupo II, independente da idade gestacional. A comparação das medianas dos grupos II e III não revelou diferença (**Tabela 3**).

Estudos anteriores revelaram resultados contraditórios referentes aos níveis plasmáticos e placentários de TFPI na PE. Schjetlein *et al.* (1999) observaram um aumento da concentração de TFPI livre em gestantes com PE quando comparadas a gestantes normotensas. No entanto, Abdel Gader *et al.* (2006) não observaram diferença nos níveis plasmáticos de TFPI total comparando gestantes com PE e normotensas, ambas no 3º trimestre de gestação. Os níveis de TFPI livre foram significativamente maiores nas gestantes com PE. Estes pesquisadores sugeriram que o mecanismo responsável pela elevação dos níveis de TFPI livre provavelmente tem caráter multifatorial, pois se sabe que os níveis circulantes de um marcador hemostático mantém um perfeito equilíbrio entre produção, consumo e degradação.

Resultados divergentes aos obtidos por Abdel Gader *et al.* (2006) foram reportados por Erez *et al.* (2008), os quais observaram que a concentração plasmática de TFPI total foi significativamente maior em pacientes com PE se comparadas às gestantes normotensas e concluíram que este marcador está

independentemente associado à doença. Em concordância com estes resultados, Freeman *et al.* (2008) também relataram níveis aumentados de TFPI total na PE.

No entanto, Rousseau *et al.* (2009) não encontraram diferença nos níveis de TFPI livre em gestantes com PE e normotensas. Dusse *et al.* (2008) também não observaram diferença entre os níveis plasmáticos de TFPI em gestantes normotensas, gestantes com PE e mulheres não gestantes.

Níveis diminuídos de TFPI-1 e TFPI-2 foram observados por Teng *et al.* (2010) quando compararam gestantes com PE e normotensas.

Cumprе ressaltar que os estudos citados não incluíram apenas a forma grave da PE e não agruparam as gestantes de acordo com a idade gestacional, como no presente estudo. A interpretação dos níveis plasmáticos de TFPI na PE exige cuidado. Sabe-se que a depuração plasmática de TFPI é realizada pelos rins e pelo fígado (PALMIER *et al.*, 1992). Sabe-se, ainda, que a proteinúria é uma característica comum da PE e que o TFPI tem um baixo peso molecular (≈ 38 kDa) (DONAHUE *et al.*, 2006) e, dessa forma, poderia ser facilmente excretado pelos rins, semelhantemente à albumina (60 kDa), o que provocaria uma redução dos seus níveis plasmáticos. Paradoxalmente, a redução do fluxo renal sanguíneo e da taxa de filtração glomerular foram relatadas na PE (MORAN *et al.*, 2004), o que poderia reduzir o *clearance* renal de TFPI e aumentar a concentração plasmática deste marcador.

Além disso, a redução dos trofoblastos, decorrente da isquemia e anóxia, manifestações clínicas comuns da PE, pode também ser responsável pela diminuição dos níveis placentários de TFPI e, conseqüentemente, dos níveis plasmáticos totais desse inibidor, tendo em vista que a placenta é a principal fonte de TFPI-2 durante a gestação (OGAWA *et al.*, 2007; TENG *et al.*, 2010).

Admite-se que aproximadamente 50% a 80% do TFPI está presente no endotélio (NOVOTNY *et al.*, 1989; SANDSET, 1996). O TFPI plasmático representa somente uma pequena fração do TFPI endógeno e, portanto, pode não refletir seu potencial funcional (DUSSE *et al.*, 2008).

Embora o presente estudo tenha revelado um aumento de TFPI plasmático na PE grave, as considerações acerca da depuração, produção placentária e local de estocagem do TFPI reforçam o cuidado que se deve ter ao interpretar os níveis plasmáticos de TFPI total na PE.

A comparação dos níveis plasmáticos de FVII revelou diferença entre as medianas obtidas para os grupos I x II, I x III e II x III (**Tabela 3 e Figura 3**), independente da idade gestacional das mulheres dos grupos I e II, como mostra a **Tabela 5**. Os níveis plasmáticos de FVII foram mais elevados no grupo I quando comparado aos grupos II e III e mais elevados no grupo II quando comparado ao grupo III (**Tabela 3**).

Em concordância com os resultados do presente estudo, Dusse *et al.* (2011a), ao avaliar mulheres inglesas, reportaram que os níveis plasmáticos de FVII foram mais elevados em gestantes com PE quando comparadas a gestantes normotensas ou mulheres não gestantes. A sensibilidade e especificidade diagnóstica deste teste, relatada por estes pesquisadores, foi de 90 e 80%, respectivamente.

Contrariamente, Djelmis *et al.* (1997) avaliaram 32 gestantes com PE grave e 36 normotensas no 3º trimestre de gestação, e não observaram diferença nos níveis plasmáticos de FVII. Schjetlein *et al.* (1999) avaliaram gestantes com PE, sem distinguir a forma clínica da doença e gestantes normotensas, sem definir a idade gestacional, e também não observaram diferenças nos níveis de FVII. Freeman *et al.* (2008) avaliaram 32 gestantes com PE (sem distinguir a forma clínica) e 32 gestantes normotensas no 3º trimestre de gestação e não observaram diferença nos níveis de FVII:c quando os dois grupos foram comparados. Por outro lado, Øian *et al.* (1985), avaliaram a atividade de FVII em 11 gestantes com PE grave e 18 gestantes normotensas e verificaram que essa está diminuída nas gestantes com PE.

Sabe-se que vários fatores podem influenciar os níveis plasmáticos das proteínas da coagulação, como a função hormonal e a resposta imune, as quais desempenham um papel importante no desenvolvimento da PE (ØIAN *et al.*, 1985; GIRARDI, 2011a).

A comparação dos níveis plasmáticos de FVIIa revelou diferença entre as médias obtidas para os grupos I x II, I x III e II x III (**Tabela 3 e Figura 3**). Os níveis plasmáticos de FVIIa foram mais elevados no grupo I quando comparado aos grupos II e III e mais elevados no grupo II quando comparado ao grupo III (**Tabela 3**). O agrupamento das mulheres dos grupos I e II por idade gestacional não mostrou diferença significativa, como mostra a **Tabela 6**.

A revisão da literatura revela que somente um estudo avaliou os níveis de FVIIa na PE e não mostrou diferença entre os níveis de FVIIa em gestantes com PE e normotensas (DUSSE *et al.*, 2011a). Uma possível explicação para a divergência dos resultados é a inclusão apenas de gestantes com a forma grave da PE no presente estudo, enquanto o estudo anterior incluiu tanto a forma grave como leve.

Lawson *et al.* (1993) e Rao *et al.* (1993), demonstraram que a AT inativa o FVIIa quando este último está ligado ao FT, por meio da formação do complexo FVIIa/AT. Spiezia *et al.* (2011) avaliaram os níveis plasmáticos do FVIIa/AT em gestantes com PE e normotensas e verificaram uma diminuição desse complexo em ambos os grupos, em relação ao intervalo de referência obtido para a população local e, a partir destes resultados, propuseram que a redução do complexo FVIIa/AT pode resultar do consumo desse, em função da exacerbação da coagulação na gestação normal ou patológica. Níveis plasmáticos mais elevados de FVIIa, observados nas gestantes com PE grave, quando comparadas às gestantes normotensas e mulheres não gestantes (**Tabela 3**), bem como a não diferenciação dos níveis de FVIIa durante o terceiro trimestre da gestação (**Tabela 5**), pode ter sido influenciado pela formação do complexo FVIIa/AT.

O presente estudo reforça a importância da análise dos parâmetros hemostáticos TFPI, FVII e FVIIa considerando a idade gestacional. A avaliação dos níveis plasmáticos de TFPI (**Tabela 4**) revelou que, no decorrer da gravidez, esse parâmetro apresentou tendência ao decréscimo no grupo I e à estabilização no grupo II. Com relação ao FVII, os níveis plasmáticos desse apresentaram tendência crescente ao longo do 3º trimestre de gestação no grupo I e de estabilização no grupo II (**Tabela 5**). Para o FVIIa, até a 32ª semana, os níveis plasmáticos apresentaram-se constantes para o grupo I e II (**Tabela 6**). Nas gestantes com PE grave (grupo I) ocorreu simultaneamente um aumento do FVII plasmático e uma diminuição do TFPI. Nesse grupo, os níveis de FVIIa permaneceram constantes ao longo do 3º trimestre de gestação. O grupo II apresentou níveis constantes de TFPI, FVII e FVIIa, o que permite inferir que as gestantes com PE grave apresentam uma ativação mais acentuada da coagulação que as gestantes normotensas ao longo do 3º trimestre de gestação.

Ao correlacionar os grupos I x II, I x III e II x III por meio da avaliação da curva ROC, é possível inferir que os marcadores hemostáticos TFPI, FVII e FVIIa são capazes de distinguir gestantes com PE grave ou normotensas (grupos I e II) de

mulheres não gestantes (grupo III), mas não são capazes de distinguir gestantes com PE grave (grupo I) de gestantes normotensas (grupo II), como mostra a **Tabela 7**. Dusse *et al.* (2011a) relataram que é possível distinguir gestantes com PE de gestantes normotensas (AUC=0,941 e $p<0,001$) e gestantes com PE de mulheres não gestantes (AUC=0,940 e $p<0,001$) por meio da determinação dos níveis plasmáticos de FVII. Os resultados reportados por Dusse *et al.* (2011a) divergem dos obtidos no presente estudo e podem ser explicados pelo maior número de gestantes avaliadas em cada um dos grupos e pela inclusão apenas da forma grave da PE, no presente estudo.

6.4 Frequência dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos três grupos avaliados

Uma busca minuciosa na literatura científica revelou que não há estudo que tenha investigado a frequência genotípica ou alélica dos polimorfismos -402G/A e -401G/T na PE.

No presente estudo, não foi observada diferença significativa quando a frequência genotípica dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos grupos I, II e III foi comparada (**Tabela 8 e 10**).

Ao comparar a frequência alélica nos três grupos, observou-se que para o polimorfismo -402G/A não houve diferença significativa (**Tabela 9**). Para o polimorfismo -401G/T observou-se que o alelo -401T é mais frequente no grupo I se comparado ao grupo II e o alelo -401G é mais frequente no grupo II quando comparado ao grupo I. A comparação dos grupos I e III e II e III não demonstrou diferença significativa (**Tabela 11**)

A frequência do alelo -402A foi igual a 13,8% no grupo I, 19,9% no grupo II e 20,0% no grupo III (**Tabela 9**). Apesar de não ter sido observada diferença significativa, houve uma tendência à diminuição da frequência do alelo -402A no grupo I.

6.5 Relação dos polimorfismos -402G/A e -401 G/T e os níveis plasmáticos de FVII

Admite-se que fatores genéticos e ambientais podem influenciar os níveis plasmáticos de FVII. Vários polimorfismos que alteram níveis de FVIIag, FVII:c ou FVIIa no plasma, tem sido extensivamente estudados.

Dois SNP localizados na região promotora do fator FVII, uma substituição de uma G por uma T na posição -401 e a substituição de uma G por uma A na posição -402 já foram avaliados na população idosa norueguesa, em pacientes com doença coronariana, com tromboembolismo venoso, câncer e em outras populações (CAREW *et al.*, 2003; LINDMAN *et al.*, 2005a; FOLSOM *et al.*, 2007; EROGLU *et al.*, 2010), mas gestantes com diagnóstico de PE grave ainda não foram avaliadas.

No presente estudo, os níveis plasmáticos de FVII não foram significativamente diferentes quando se comparou os diferentes genótipos do polimorfismo -402G/A. No entanto, para o polimorfismo -401G/T observou-se diferença significativa quando os genótipos GG e TT foram comparados (**Tabelas 12 e 13**). A comparação dos demais genótipos do polimorfismo -401G/T não demonstrou diferença significativa. A correlação de Spearman revelou que o polimorfismo -401G/T tem uma correlação negativa fraca com os níveis plasmáticos de FVII e a presença do alelo -401T.

As gestantes do grupo I não apresentaram níveis plasmáticos de FVII significativamente diferentes quando se comparou a presença ou não do alelo -402A e -401T (**Tabela 14 e 15**). No entanto, foi observada uma tendência de elevação do nível de FVII na presença do genótipo GA quando comparado ao GG (**Tabela 14**) e uma tendência de diminuição dos níveis do mesmo marcador na presença do genótipo GT, se comparado ao GG e na presença do genótipo TT se comparado ao GG e ao GT (**Tabela 15**).

Ao avaliar o polimorfismo -402G/A no grupo II, observou-se que os genótipos GA e AA em gestantes normotensas predispõem ao aumento dos níveis plasmáticos de FVII, apesar dos resultados não demonstrarem diferença significativa (**Tabela 16**).

As gestantes normotensas carreadoras do genótipo -401TT mostraram tendência a apresentar níveis de FVII reduzidos em relação às carreadoras do

genótipo GT e essas últimas tenderam a apresentar níveis reduzidos se comparadas às carreadoras do genótipo GG, apesar dos resultados obtidos não demonstrarem diferença significativa (**Tabela 17**). A correlação de Spearman demonstrou uma correlação negativa fraca entre os níveis de FVII e o alelo -401T.

Para o grupo de mulheres não gestantes, a presença do alelo -402A e -401T não alterou significativamente os níveis plasmáticos de FVII (**Tabela 18 e 19**). Apesar dos resultados não demonstrarem diferença significativa, a análise do polimorfismo -401G/T revelou que a presença do alelo -401T em homozigose predispõe à diminuição dos níveis plasmáticos de FVII (**Tabela 19**).

Admite-se que os polimorfismos -401G/T e -402G/A influenciam na ligação de proteínas nucleares à região promotora do gene. O alelo -401T está associado à redução da taxa basal de transcrição do gene do FVII, o que provoca a redução da concentração plasmática desse fator, enquanto o alelo -402A está associado ao aumento da taxa de transcrição basal e ao aumento de níveis plasmáticos de FVII em aproximadamente 50,99% (VAN`T HOOFT *et al.*, 1999; SABATER-LLEAL *et al.*, 2007).

Paradoxalmente, no presente estudo, foi observada maior frequência do alelo -401T no grupo com PE grave quando comparado ao de gestantes normotensas, no entanto, os níveis de FVII foram mais elevados no grupo com PE grave. Além disso, houve tendência a menor frequência do alelo -402A, que está associado ao aumento dos níveis de FVII no grupo com PE grave.

Contradizendo ao proposto por van't Hooft *et al.* (1999) com relação ao alelo -401T, Sabater-Lleal *et al.* (2007) observaram que o alelo -401T está associado ao aumento dos níveis de FVII, quando foram avaliados plasmídeos transfectados com diferentes combinações de polimorfismos na região promotora do FVII.

Estudos que buscaram a associação entre a presença de polimorfismos que contribuem para o aumento dos níveis de FVII e ocorrência de eventos tromboembólicos, nem sempre mostraram essa associação. Folsom *et al.* (2007) concluíram que o polimorfismo -402G/A não está associado à ocorrência de tromboembolismo venoso. Resultados semelhantes foram relatados por Eroglu *et al.* (2010), que não observaram associação entre os polimorfismos -401G/T e -402G/A e a ocorrência de tromboembolismo venoso em pacientes com câncer. Lindman *et al.* (2005a) relataram que a presença do alelo -402A está associado ao aumento dos níveis plasmáticos de FVIIag e FVII:c em idosos noruegueses com alto risco para

doença cardíaca, se comparado aos carreadores do alelo -402G em homozigose. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram também que não existe diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII quando se comparam heterozigotos e homozigotos para o alelo -402A.

Lindman *et al.* (2005a) avaliaram 204 homens noruegueses, com idade entre 65 e 75 anos e risco elevado para desenvolvimento de doença cardiovascular com relação à presença dos polimorfismos -401G/T e -402G/A. A frequência encontrada para o alelo -401T foi igual a 12% e para o alelo -402A igual a 29%. Os autores concluíram que na população estudada o alelo -401T está correlacionado à diminuição dos níveis plasmáticos de FVIIa e FVIIc e o alelo -402A está associado ao aumento destes marcadores.

Carew *et al.* (2003), avaliaram o polimorfismo -402G/A em 2761 homens ingleses e escoceses, sem história de doença cardíaca, alterações hemostáticas, câncer ou doenças infecciosas e encontraram uma frequência igual a 24% para o alelo -402A e níveis plasmáticos aumentados de FVIIc, na presença deste alelo.

6.6 Níveis plasmáticos de FVII x associação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T

A associação entre os diferentes polimorfismos precisa ser também compreendida para que a influência destes nos níveis plasmáticos de FVII possa ser elucidada.

Kudaravalli *et al.* (2002) observaram que a presença do polimorfismo -401G/T isoladamente não promove a redução dos níveis de FVII.

Estudos conduzidos em diferentes populações demonstram que o alelo -401T está em completo desequilíbrio de ligação com a inserção de 10 bp na posição -323 (DELL'ACQUA *et al.*, 1997; VAN'T HOOFT *et al.*, 1999; EROGLU *et al.*, 2010).

Ao avaliar a associação entre os diferentes haplótipos dos polimorfismos -402G/A, -401G/T e R353Q e infarto agudo do miocárdio em uma população de idosos com alto risco para doenças coronarianas, Lindman *et al.* (2005b) relataram que os polimorfismos -401G/T e R353Q estão em forte desequilíbrio de ligação. A associação desses promove uma redução pronunciada dos níveis plasmáticos de

FVII se comparada à elevação causada pelo polimorfismo -402G/A na população estudada.

O polimorfismo -670A/C está em estreito desequilíbrio de ligação com o polimorfismo -402G/A e os portadores destes apresentam níveis elevados de FVII:c se comparados a não portadores (VAN`T HOOFT *et al.*, 1999; CAREW *et al.*, 2003; LINDMAN *et al.*, 2005a; FOLSOM *et al.*, 2007). O estudo da expressão gênica sugere que o alelo -670C, e não o alelo -402A, é o responsável pelo aumento dos níveis de FVII:c (CAREW *et al.*, 2003).

Devido ao forte desequilíbrio de ligação existente entre os alelos variantes no gene do FVII, é difícil avaliar a contribuição individual de cada um desses na alteração dos níveis plasmáticos de FVII (LINDMAN *et al.*, 2005b).

Os resultados do presente estudo demonstraram que não há uma associação entre a redução dos níveis de FVII e a presença dos alelos -402G e -401T. Dessa forma, pode-se inferir que a presença destes alelos não foi capaz de suplantiar o estado de hipercoagulabilidade observado na PE, uma vez que foi observada maior produção de FVII na presença deste estado patológico. A presença de outros polimorfismos em desequilíbrio de ligação, não avaliados nesse estudo, bem como o reduzido número amostral, podem justificar os resultados encontrados.

Para avaliar a associação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T e a influência destes nos níveis plasmáticos de FVII, as integrantes do presente estudo foram distribuídas de acordo com os genótipos. Inicialmente, foi feita a distribuição independentemente do grupo ao qual pertenciam, como mostra a **Tabela 20**. Posteriormente, foi avaliada a influência da associação dos polimorfismos -402G/A e -401G/T nos níveis plasmáticos de FVII, em cada um dos grupos isoladamente (**Tabelas 21 a 23**).

Em nenhuma das associações dos genótipos foi observada diferença significativa nos níveis plasmáticos de FVII (**Tabelas 20 a 23**).

Estes resultados sugerem que o efeito de associação entre os polimorfismos -402G/A e -401G/T é o mesmo para os três grupos de mulheres avaliadas, o que corrobora para a hipótese de que o efeito sobre a transcrição gênica do FVII não está associada à condição clínica e que a hipercoagulabilidade observada no grupo com PE sobrepõe o efeito genético.

7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Constituem limitações deste estudo:

- A obtenção de gestantes com PE de quatro maternidades distintas, cujo diagnóstico foi feito, portanto, por quatro equipes obstétricas distintas.
- Embora as gestantes normotensas e mulheres não gestantes incluídas no estudo tenham se declarado como saudáveis, não é possível excluir a presença de alterações clínicas e laboratoriais.
- A AMERICAN Diagnostica não deixa claro na instrução de uso do produto IMUBIND® Total TFPI ELISA Kit 849 se esse determina também o TFPI-2.

8 CONCLUSÕES

- A via do fator tissular mostrou-se associada à ocorrência de pré-eclâmpsia grave.
- A frequência genotípica dos polimorfismos -401G/T e -402G/A no gene do fator VII, não apresentou diferença quando foram comparados os três grupos avaliados.
- Os polimorfismos -401G/T e -402G/A não estão associados à alteração dos níveis plasmáticos de fator VII, nas gestantes com pré-eclâmpsia grave.
- O alelo -401T foi mais frequente no grupo com pré-eclâmpsia grave e mostrou-se associado à redução dos níveis plasmáticos de fator VII, quando as mulheres foram avaliadas em conjunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD-TILLERY, K. M.; BELFORT, M. A. Eclampsia: morbidity, mortality, and management. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 48, n. 1, p. 12-23, 2005.

ABDEL GADER, A. M. *et al.* Total and free tissue factor pathway inhibitor in pregnancy hypertension. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 95, n. 3, p. 248-53, 2006.

ABE, K. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 15, p. 8663-8, 1999.

ACOG PRACTICE BULLETIN No 33. Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, v. 99, n. 1 p. 159-167, 2002.

ALPOIM, P. *et al.* ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood group assessment in preeclampsia. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23-24, p. 2162-2166, 2011a.

ALPOIM, P. N. *et al.* Preeclampsia and ABO blood groups: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, Nov. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11033-012-2288-2>>. Acesso em: 05 dez. 2012.

ANTEBY, E. Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 4, p. 229-35, 2004.

AZNAR, J. *et al.* Fibrinolytic activity and protein C in preeclampsia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 55, n. 3, p. 314-7, 1986.

BACH, R. R.; MOLDOW, C. F. Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. **Blood**, v. 89, n. 9, p. 3270-6, 1997.

BAJAJ, M. S. *et al.* Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, n. 3, p. 1047-52, 1999.

BAUER, K. A. *et al.* Detection of factor X activation in humans. **Blood**, v. 74, n. 6, p. 2007-15, 1989.

BAUER, K. A. *et al.* Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. **Blood**, v. 76, n. 4, p. 731-6, 1990.

BELLART, J. *et al.* Endothelial cell markers and fibrinopeptide A to D-dimer ratio as a measure of coagulation and fibrinolysis balance in normal pregnancy. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 46, n. 1, p. 17-21, 1998.

BELLART, J. *et al.* Tissue factor levels and high ratio of fibrinopeptide A:D-dimer as a measure of endothelial procoagulant disorder in pre-eclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 106, n. 6, p. 594-7, 1999.

BERNARDI, F. *et al.* Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, p. 72-76, 1996.

BEVILACQUA, M. P. *et al.* Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 12, p. 4533-7, 1986.

BIGGS, R.; MACFARLANE, R. G. The reaction of haemophilic plasma to thromboplastin. **Journal of Clinical Pathology**, v. 4, n. 4, p. 445-59, 1951.

BOGDANOV, V. Y. *et al.* Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. **Nature Medicine**, v. 9, n. 4, p. 458-462, 2003.

BONNAR, J.; McNICOL, G. P.; DOUGLAS, A. S. Coagulation and fibrinolytic mechanisms during and after normal childbirth. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5703, p. 200-203, 1970.

BONNAR, J.; MCNICOL, G. P.; DOUGLAS, A. S. Coagulation and fibrinolytic systems in pre-eclampsia and eclampsia. **British Medical Journal**, v. 2, n. 5752, p. 12-6, 1971.

BOULANGER, C. M. *et al.* Circulating endothelial microparticles: a new marker of vascular injury. **Annales de cardiologie et d'angiologie**, v. 57, n. 3, p. 149-54, 2008.

BRENNER, B. Haemostatic changes in pregnancy. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5-6, p. 409-414, 2004.

BROZE, G. J.; JR. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. **Annual Review of Medicine**, v. 46, p. 103-12, 1995.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E (eds.). **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. St. Louis: Elsevier Saunders, 2006. 2448 p.

BUTENAS, S. *et al.* Tissue factor activity in whole blood. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2764-70, 2005.

BUTZOW, R. *et al.* Monoclonal antibodies reacting with placental protein 5: use in radioimmunoassay, Western blot analysis, and immunohistochemistry. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 111, n. 2, p. 249-56, 1988.

CADROY, Y. *et al.* Evaluation of six markers of haemostatic system in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension or pre-eclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 100, p. 416-420, 1993.

CAMPO, G. *et al.* Tissue factor and coagulation factor VII levels during acute myocardial infarction: association with genotype and adverse events. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 12, p. 2800-6, 2006.

CAREW, J. A. *et al.* A functional haplotype in the 5' flanking region of the factor VII gene is associated with an increased risk of coronary heart disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 10, p. 2179-85, 2003.

CARMELIET, P.; COLLEN, D. Gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation system in mice. **Seminars in Thrombosis Hemostasis**, v. 22, n. 6, p. 525-542, 1996.

CARMELIET, P. *et al.* Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. **Atherosclerosis IV: Recent Advances in Atherosclerosis Research**, v. 811, p. 191-206, 1997.

CARON, C. *et al.* Are haemostatic and fibrinolytic parameters predictors of preeclampsia in pregnancy-associated hypertension? **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 66, n. 4, p. 410-414, 1991.

CATARINO, C. *et al.* Relationship between maternal and cord blood hemostatic disturbances in preeclamptic pregnancies. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 2, p. 219-224, 2008.

CONDE-AGUDELO, A.; BELIZAN, J. M. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 107, n. 1, p. 75-83, 2000.

CUNNINGHAM *et al.* **Williams / Obstetrícia**. Brasil: Guanabara Koogan, 2000. 1262 p.

DALAKER, K., PRYDZ, H. The coagulation factor VII in pregnancy. **British Journal of Haematology**, v. 56, p. 233-241, 1984.

DALMÁZ, C. A. *et al.* Relationship between polymorphisms in thrombophilic genes and preeclampsia in a Brazilian population. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 37, n. 2, p. 107-110, 2006.

DAVEY, D. A.; MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 158, n. 4, p. 892-8, 1988.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-1312, 1964.

DE MAAT, M. P. *et al.* Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 2, n. 9, p. 1588-93, 2004.

DELL'ACQUA, G. *et al.* A polymorphic cluster in the 5' region of the human coagulation factor VII gene: detection, frequency, and linkage disequilibrium. **Thrombosis Research**, v. 88, n. 5, p. 445-8, 1997.

DEVIES, I. E.; UBACHS, H. M.; VAN WERSCH, J. W. The behavior of amidolytic factor VII in smoking and non-smoking pregnant women in relation to their

gestational age. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 76, n. 5, p. 405-8, 1997.

DI PAOLO, S. *et al.* Increased placental expression of tissue factor is associated with abnormal uterine and umbilical Doppler waveforms in severe preeclampsia with fetal growth restriction. **Journal of Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 650-657, 2003.

DJELMIS, J. *et al.* The effect of coagulation parameters on the placental respiratory and nutritive function in women having chronic hypertension with superimposed preeclampsia. **Collegium Antropologicum**, v. 21, n. 1, p. 127-37, 1997.

DONAHUE, B. S.; GAILANI, D.; MAST, A. E. Disposition of tissue factor pathway inhibitor during cardiopulmonary bypass. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, v. 4, n. 5, p. 1011-6, 2006.

DOSHI, S. N.; MARMUR, J. D. Evolving role of tissue factor and its pathway inhibitor. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 5, p. 241-50, 2002.

DUBE, B.; BHATTACHARYA, S.; DUBE, R. K. Blood coagulation profile in Indian patients with pre-eclampsia and eclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 82, n. 1, p. 35-9, 1975.

DUSSE, L. M. S. **Avaliação da hemostasia na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG): O papel do óxido nítrico (NO)**. 1999. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo.

DUSSE, L. M. *et al.* Inherited thrombophilias and pre-eclampsia in Brazilian women. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 134, n. 1, p. 20-3, 2007.

DUSSE, L. M. *et al.* Total plasma tissue factor pathway inhibitor levels in pre-eclampsia. **Clinica Chimica Acta**, v. 388, n. 1-2, p. 230-2, 2008.

DUSSE, L. M. *et al.* Plasma factor VII: a potential marker of pre-eclampsia. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 1, p. e15-9, 2011a.

DUSSE, L. M. *et al.* Pre-eclampsia: relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 1-2, p. 17-21, 2011b.

EDGINGTON, T. S. *et al.* The structural biology of expression and function of tissue factor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 66, n. 1, p. 67-79, 1991.

ENJYOJI, K. *et al.* Human tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene: complete genomic structure and localization on the genetic map of chromosome 2q. **Genomics**, v. 17, n. 2, p. 423-8, 1993.

EREZ, O. *et al.* Tissue factor and its natural inhibitor in pre-eclampsia and SGA. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 12, p. 855-69, 2008.

EREZ, O. *et al.* Evidence of maternal platelet activation, excessive thrombin generation, and high amniotic fluid tissue factor immunoreactivity and functional activity in patients with fetal death. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 22, n. 8, p. 672-87, 2009.

EREZ, O. *et al.* High tissue factor activity and low tissue factor pathway inhibitor concentrations in patients with preterm labor. **The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 23, n. 1, p. 23-33, 2010.

ERLICH, J. *et al.* Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 8138-8143, 1999.

EROGLU, A. *et al.* No significant association between the promoter region polymorphisms of factor VII gene and risk of venous thrombosis in cancer patients. **Experimental Oncology**, v. 32, n. 1, p. 15-8, 2010.

ESTELLÉS, A. *et al.* Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 3, p. 500-8, 1998.

FABBRO, D. *et al.* Association between plasminogen activator inhibition 1 gene polymorphisms and preeclampsia. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 56, n. 1 p. 17-22, 2003.

FAREED, J. *et al.* Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 1845-1853, 1998.

FENG, Q. *et al.* Plasminogen activators and inhibitors are transcribed during early macaque implantation. **Placenta**, v. 22, n. 2-3, p. 186-99, 2001.

FLECK, R. A. *et al.* Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. **Thrombosis Research**, v. 59, n. 2, p. 421-37, 1990.

FOLSOM, A. R. *et al.* Factor VII coagulant activity, factor VII -670A/C and -402G/A polymorphisms, and risk of venous thromboembolism. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 8, p. 1674-8, 2007.

FREEMAN, D. J. *et al.* Fetal corticotrophin-releasing hormone mRNA, but not phosphatidylserine-exposing microparticles, in maternal plasma are associated with factor VII activity in pre-eclampsia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, n. 3, p. 421-7, 2008.

FRISO, S. *et al.* Promoter methylation in coagulation F7 gene influences plasma FVII concentrations and relates to coronary artery disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 3, p. 192-9, 2012.

GAILANI, D.; RENNÉ, T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 6, p. 1106-12, 2007.

GIRARDI, G. Role of tissue factor in feto-maternal development: a xiphos. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 2, p. 250-6, 2011a.

GIRARDI, G. Role of tissue factor in pregnancy complications: crosstalk between coagulation and inflammation. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 3 Suppl, p. S43-S46, 2011b.

GIRELLI, D. *et al.* Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 11, p. 774-780, 2000.

GONZALEZ-QUINTERO, V. H. *et al.* Elevated plasma endothelial microparticles in preeclampsia. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 189, n. 2, p. 589-93, 2003.

GREEN, F. *et al.* A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 11, p. 540-546, 1991.

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: Principles and practice of hematology**. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. 2305 p.

HEINRICH, J.; *et al.* Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 14, n. 1, p. 54-9, 1994.

HIGASHI, S.; IWANAGA, S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. **International Journal of Hematology**, v. 67, n. 3, p. 229-41, 1998.

HIGGINS, J. R.; *et al.* Haemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 179, n. 2, p. 520-26, 1998.

HO, C. H.; YANG, Z. L. The predictive value of the hemostasis parameters in the development of preeclampsia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 67, n. 2, p. 214-8, 1992.

HOFFMAN, M. *et al.* Factors IXa and Xa play distinct roles in tissue factor-dependent initiation of coagulation. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1794-801, 1995.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2007.

HOLMES, V. A.; WALLACE, J. M. Haemostasis in normal pregnancy: a balancing act? **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. Pt 2, p. 428-32, 2005.

JUNKER, R. *et al.* Coagulation factor VII and the risk of coronary heart disease in healthy men. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, p. 1539-1544, 1997.

KANAYAMA, N. Trophoblastic injury: new etiological and pathological concept of preeclampsia. **Croatian Medical Journal**, v. 44, n. 2, p. 148-56, 2003.

KEN-DROR, G. *et al.* Haplotype and genotype effects of the *F7* gene on circulating factor VII, coagulation activation markers and incident coronary heart disease in UK men. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 11, p. 2394-403, 2010.

KHONG, T. Y. *et al.* Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 93, n. 10, p. 1049-59, 1986.

KRIKUN, G.; LOCKWOOD, C. J.; PAIDAS, M. J. Tissue factor and the endometrium: from physiology to pathology. **Thrombosis Research**, v. 124, n. 4, p. 393-6, 2009.

KUCZYNSKI, J. *et al.* Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in the placenta and myometrium. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 105, n. 1, p. 15-9, 2002.

KUDARAVALLI, R. *et al.* Polymorphic changes in the 5' flanking region of factor VII have a combined effect on promoter strength. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 88, n. 5, p. 763-7, 2002.

KUPFERMINC, M.J *et al.* Severe pre-eclampsia and high frequency on genetic thrombophilic mutations. **Obstetrics & Gynecology**, v. 96, p. 45-49, 2000.

LAASANEN, J. *et al.* Fibrinogen and factor VII promoter polymorphisms in women with preeclampsia. **Obstetrics & Gynecology**, v. 100, n. 2, p. 317-320, 2002.

LAWSON, J. H. *et al.* Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, p. 767-70, 1993.

LE, D. T. *et al.* Hemostatic factors in rabbit limb lymph: relationship to mechanisms regulating extravascular coagulation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 43, n. 3, p. 769-776, 1998.

LECHNER, D.; WELTERMANN, A. Circulating tissue factor-exposing microparticles. **Thrombosis Research**, v. 122, p. 47-54, 2008.

LESNIK, P. *et al.* Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 13, n. 7, p. 1066-75, 1993.

LEURS, P. B. *et al.* Increased tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and coagulation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Thrombosis and Hemostasis**, v. 77, n. 3, p. 472-6, 1997.

LINDHEIMER, M. D.; SPARGO, B. H.; KATZ, A. I. Renal biopsy in pregnancy-induced hypertension. **Journal of Reproductive Medicine**, v. 15, n. 5, p. 189-94, 1975.

LINDMAN, A. S. *et al.* Coagulation factor VII, R353Q polymorphism, and serum choline-containing phospholipids in males at high risk for coronary heart disease. **Thrombosis Research**, v. 113, n. 1, p. 57-65, 2004.

LINDMAN, A. S. *et al.* The influence of the -401G/T and -402G/A polymorphisms of the coagulation FVII promoter on plasma levels of FVII. **Thrombosis Research**, v. 116, n. 4, p. 313-20, 2005a.

LINDMAN, A. S. *et al.* Association between the factor VII haplotype containing the-402A allele and myocardial infarction in a population of elderly men at high risk for coronary heart disease. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 94, n. 1, p. 226-227, 2005b.

LÓPEZ-RAMÍREZ, Y.; CARVAJAL, Z.; AROCHA-PINANGO, C. L. Hemostatic system parameters of placental extracts in normal pregnancy and severe preeclampsia. **Investigación Clínica**, v. 47, n. 3, p. 233-40, 2006.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia : propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1999. 641 p.

MACFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-9, 1964.

MACKMAN, N. Regulation of the tissue factor gene. **The FASEB Journal**, v. 9, n. 10, p. 883-9, 1995.

MACKMAN, N. The many faces of tissue factor. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7 Suppl 1, p. 136-9, 2009.

MARCHETTI, G. *et al.* A polymorphism in the 5' region of coagulation factor VII gene (F7) caused by an inserted decanucleotide. **Human Genetics**, v. 90, n. 5, p. 575-576, 1993.

MCCARTHY, F. P. *et al.* Animal models of preeclampsia; uses and limitations. **Placenta**, v. 32, n. 6, p. 413-419, 2011.

MEADE, T. W. *et al.* An epidemiological study of the haemostatic and other effects of oral contraceptives. **British Journal of Haematology**, v.34, p. 353-364, 1976.

MEADE, T. W. *et al.* Haemostatic function and cardiovascular death: early results of a prospective study. **Lancet**, v. 1, p. 1050-1054, 1980.

MEADE, T. W. *et al.* Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. **Lancet**, v. 2, p. 533-537, 1986.

MEADE, T.W. *et al.* Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. **Lancet**, v. 342, p. 1076-1079, 1993.

MIAO, C. H. *et al.* Liver-specific expression of the gene coding for human factor X, a blood coagulation factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7395-401, 1992.

MILLER, C. H. *et al.* Elevated factor VII as a risk factor for recurrent fetal loss. Relationship to factor VII gene polymorphisms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 93, n. 6, p. 1089-1094, 2005.

MIYAGI, Y. *et al.* Assignment of the human PP5/TFPI-2 gene to 7q22 by FISH and PCR-based human/rodent cell hybrid mapping panel analysis. **Genomics**, v. 35, n. 1, p. 267-268, 1996.

MOERLOOSE, P. *et al.* Longitudinal study on activated factors XII and VII levels during normal pregnancy. **British Journal of Haematology**, v. 100, n. 30, p. 40-44, 1998.

MORAN, P.; LINDHEIMER, M. D.; DAVISON, J. M. The renal response to preeclampsia. **Seminars in Nephrology**, v. 24, n. 6, p. 588-595, 2004.

MORRISSEY, J. H. *et al.* Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. **Blood**, v. 81, n. 3, p. 734-744, 1993.

MORRISSEY, J. H.; MUTCH, N. J. Tissue factor structure and function. In: COLMAN, R. W.; MARDER, V. J., *et al* (Ed.). **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**. 5. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.91-106.

NARITA, M. *et al.* Two receptor systems are involved in the plasma clearance of tissue factor pathway inhibitor in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24800-24804, 1995.

NEMERSON, Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. **Seminars in Hematology**, v. 29, n. 3, p. 170-176, 1992.

NOVOTNY, W. F. *et al.* Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. **Blood**, v. 72, n. 6, p. 2020-2025, 1988.

NOVOTNY, W. F. *et al.* Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 31, p. 18832-18837, 1989.

OBIEKWE, B. C.; CHARD, T. Placental protein 5: circulating levels in twin pregnancy and some observations on the analysis of biochemical data from multiple pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 12, n. 3, p. 135-141, 1981.

OBIEKWE, B. C. *et al.* Placental protein 5: disappearance from the circulation after delivery. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 1982.

OGAWA, M. *et al.* Paradoxical discrepancy between the serum level and the placental intensity of PP5/TFPI-2 in preeclampsia and/or intrauterine growth restriction: possible interaction and correlation with glypican-3 hold the key. **Placenta**, v. 28, n. 2-3, p. 224-232, 2007.

ØIAN, P. *et al.* Increased sensitivity to thromboplastin synthesis in blood monocytes from pre-eclamptic patients. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 92, n. 5, p. 511-517, 1985.

ØSTERUD, B.; RAPAPORT, S. I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5260-5264, 1977.

PALMIER, M. O. *et al.* Clearance of recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in rabbits. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 68, n. 1, p. 33-36, 1992.

PETERSEN, L. C. *et al.* Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. **European Journal of Biochemistry**, v. 235, n. 1-2, p. 310-316, 1996.

PERET, F. J. A. *et al.* Pré-eclâmpsia. In: FHEMIG - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. **Protocolos Clínicos**. Minas Gerais: FHEMIG, 2009. Disponível em: <<http://www.fhemig.mg.gov.br/en/protocolos-clinicos>>. Acesso em: 27 jun. 2012.

POLLAK, E. S. *et al.* Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p.1738-1747, 1996.

POLLER, L.; THOMPSON, J.M.; Clotting factors during oral contraception. **British Medical Journal**, v. 2, p. 23-25, 1966.

PRICE, G. C.; THOMPSON, A.; KAM, P. C. A. Tissue factor and tissue factor inhibitor. **Anaesthesia**, v. 59, n. 5, p. 483-492, 2004.

RAO, L. V. M. *et al.* Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III / heparin inhibition of factor FVIIa. **Blood**, v. 81, n. 10, p. 2600-2607, 1993.

RAWALA-SHEIKH, R. *et al.* Role of gamma-carboxyglutamic acid residues in the binding of factor IXa to platelets and in factor-X activation. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 398-405, 1992.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REDECHA, P. *et al.* Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody-induced fetal injury. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2423-2431, 2007.

REDECHA, P. *et al.* Neutrophil activation by the tissue factor/Factor VIIa/PAR2 axis mediates fetal death in a mouse model of antiphospholipid syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 10, p. 3453-61, 2008.

REDECHA, P. *et al.* Pravastatin prevents miscarriages in mice: role of tissue factor in placental and fetal injury. **Blood**, v. 113, n. 17, p. 4101-4109, 2009.

REISS, R. E. *et al.* Retrospective comparison of blood pressure course during preeclamptic and matched control pregnancies. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 156, n. 4, p. 894-898, 1987.

RICOS, C. *et al.* Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 59, n. 7, p.491-500, 1999.

ROBERTS, J. M.; LAIN, K. Y. Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. **Placenta**, v. 23, n. 5, p. 359-372, 2002.

ROUSSEAU, A.; FAVIER, R.; VAN DREDEN, P. Elevated circulating soluble thrombomodulin activity, tissue factor activity and circulating procoagulant phospholipids: new and useful markers for pre-eclampsia? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 146, n. 1, p. 46-49, 2009.

RUF, W.; MUELLER, B. M. Tissue factor in cancer angiogenesis e metastasis. **Current Opinion in Hematology**, v. 3, p. 379-84, 1996.

RUF, W.; DORFLEUTNER, A.; RIEWALD, M. Specificity of coagulation factor signaling. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1495-503, 2003.

SAADI, S. *et al.* Complement-Mediated Regulation of Tissue Factor Activity in Endothelium. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 6, p. 1807-1814, 1995.

SABATER-LLEAL, M. *et al.* Functional analysis of the genetic variability in the F7 gene promoter. **Atherosclerosis**, v. 195, n. 2, p. 262-8, 2007.

SANDSET, P. M. et al. Extrinsic coagulation pathway inhibitor and heparin cofactor II during normal and hypertensive pregnancy. *Thrombosis Research*, v. 55, n. 5, p. 665-70, 1989.

SANDSET, P. M. Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)-an update. *Haemostasis*, v. 26 Suppl 4, p. 154-65, 1996.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. P.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorfism with a single non-isotopic technique. *Human Genetics*, v. 90, p. 955-956, 1993.

SARIG, G. *et al.* Modulation of systemic hemostatic parameters by enoxaparin during gestation in women with thrombophilia and pregnancy loss. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 94, n. 5, p. 980-5, 2005.

SCAZZIOTA, A.; ALTMAN, R. El mecanismo de la hemostasia normal. *Revista Iberoamericana de Trombosis y Hemostasia*, v.1, p. 9 -26, 1996.

SCHJETLEIN, R.; HAUGEN, G.; WISLOFF, F. Markers of intravascular coagulation and fibrinolysis in preeclampsia: association with intrauterine growth retardation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 76, n. 6, p. 541-6, 1997.

SCHJETLEIN, R. *et al.* Hemostatic variables as independent predictors for fetal growth retardation in preeclampsia. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, v. 78, n. 3, p. 191-197, 1999.

SEPPALA, M.; WAHLSTROM, T.; BOHN, H. Circulating levels and tissue localization of placental protein five (PP5) in pregnancy and trophoblastic disease: absence of PP5 expression in the malignant trophoblast. *International Journal of Cancer*, v. 24, n. 1, p. 6-10, 1979.

SIBAI, B. M. *et al.* Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. The Calcium for Preeclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 177, n. 5, p. 1003-1010, 1997.

SIBAI, B. M. *et al.* Hypertensive disorders in twin versus singleton gestations. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 182, n. 4, p. 938-942, 2000.

SMITH, F. B. *et al.* Hemostatic factors as predictors of ischemic heart disease and stroke in the Edinburgh Artery Study. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, p. 3321-3325, 1997.

SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2009.

SPIEZIA, L. *et al.* Procoagulant phospholipids clotting time in normal pregnancy and preeclampsia. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 3, p.1, 2011.

SPRECHER, C. A. *et al.* Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 8, p. 3353-3357, 1994.

STEPANIAN, A. *et al.* Von Willebrand Factor and ADAMTS13: A Candidate Couple for Preeclampsia Pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 7, p. 1703-1709, 2011.

STIRLING, Y. *et al.* Haemostasis in normal pregnancy. **Thrombosis Haemostasis**, v. 52, n. 2, p. 176-182, 1984.

TEN CATE, H. *et al.* The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by tissue factor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 3, p. 1207-1212, 1993.

TENG, Y. C. *et al.* Coagulation and fibrinolysis related cytokine imbalance in preeclampsia: the role of placental trophoblasts. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 37, n. 4, p. 343-348, 2009.

TENG, Y. *et al.* The relationship between plasma and placental tissue factor, and tissue factor pathway inhibitors in severe pre-eclampsia patients. **Thrombosis Research**, v. 126, n. 1, p. 41-45, 2010.

THORBURN, J. *et al.* Blood viscosity and haemostatic factors in late pregnancy, pre-eclampsia and fetal growth retardation. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 89, n. 2, p. 117-122, 1982.

UDAGAWA, K. *et al.* Specific expression of PP5/TFPI2 mRNA by syncytiotrophoblasts in human placenta as revealed by in situ hybridization. **Placenta**, v. 19, n. 2-3, p. 217-223, 1998.

UDAGAWA, K. *et al.* Subcellular localization of PP5 TFPI-2 in human placenta: A possible role of PP5 TFPI-2 as an anti-coagulant on the surface of syncytiotrophoblasts. **Placenta**, v. 23, n. 2-3, p. 145-153, 2002.

USZYNSKI, M. *et al.* Tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in amniotic fluid and blood plasma: implications for the mechanism of amniotic fluid embolism. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95, n. 2, p. 163-166, 2001.

VAN 'T HOOFT, F. M. *et al.* Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. **Blood**, v. 93, n. 10, p. 3432-3441, 1999.

VARIZI, N. D. *et al.* Coagulation, fibrinolytic, and inhibitory proteins in acute myocardial infarction and angina pectoris. **American Journal of Medicine**, v. 93, p. 651-657, 1992.

WALKER, J. J. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 356, n. 9237, p. 1260-5, 2000.

WILCOX, J. N. *et al.* Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 8, p. 2839-2843, 1989.

WILLIAMS, W. J. The activity of human placenta microsomes and brain particles in blood coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 8, p. 1840-1846, 1966.

WINTROBE, M. M. **Clinical hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981.

WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY. Report of the National High Blood Pressure Education Program. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 183, p. 1-22, 2000.

YAMADA, N. *et al.* The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor - I gene is associated with severe preeclampsia. **Journal of Human Genetics**, v. 45, p. 138-141, 2000.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 47/08

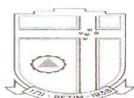
Interessado(a): Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 2 de abril de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "**Pré-eclâmpsia e polimorfismos dos genes do fator VII e do receptor de estrogênio**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B - Declaração da Diretoria do Hospital Público Regional de Betim

Prefeitura Municipal de Betim
Secretaria Municipal de Saúde
Hospital Público Regional de Betim - HPRB
Maternidade do HPRB

**Declaração**

Declaramos, para os devidos fins, que estamos de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "PRÉ-ECLÂMPسيا E POLIMORFISMOS NOS GENES DO FATOR VII E DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO" da Faculdade de Farmácia da UFMG, na Maternidade do Hospital Público Regional de Betim, desde que seja aprovado por um comitê de ética em pesquisa.

Betim, 09 de novembro de 2010.


Denise da Silva Kattah
Gerente Maternidade


Clésio Gontijo do Amaral
Coordenador SEPPEM
Serviço de Educação Permanente e
Pesquisa Multiprofissional


Geraldo Marcio Viana Zanon
Diretor HPRB

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG)**PARECER Nº77/08**

Registro CEP/FHEMIG: 77/08(este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)

CAAE: 0040.0.287.203-08

Pesquisadora Responsável: Luci Maria Sant Ana Dulce

Hospital Maternidade Odete Valadares.

DECISÃO:

O Comitê de Ética em Pesquisa, (CEP/FHEMIG), aprovou no dia 07 de Agosto de 2008 o projeto de pesquisa intitulado, «Pré-Eclampsia e Polimorfismos nos Genes do Fator VII e do Receptor de Estrogênio».

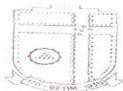
Relatórios parciais e finais devem ser encaminhados ao CEP/FHEMIG com um intervalo mínimo de 6 meses (entre os relatórios), a partir da data de início do estudo.

- Formulário CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – deverá ser assinado, pelo pesquisador responsável, nos espaços apropriados, e em seguida o NEP deverá encaminhar a este CEP/FHEMIG 02 (duas) vias devidamente assinadas, enquanto que a outra deverá ser entregue ao pesquisador responsável.

Inês Ferreira e Melo Teixeira Dias
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

0023577 | 6.

ANEXO D - Declaração da Gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara / Betim - MG



Prefeitura Municipal de Betim
Secretaria Municipal de Saúde
Hospital Público Regional de Betim - HPRB
Maternidade do HPRB



Declaração

Declaro, para os devidos fins, que estou de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "PRÉ-ECLÂMPZIA E POLIMORFISMOS NOS GENES DO FATOR VII E DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO" da Faculdade de Farmácia da UFMG, no posto de saúde UBSF Guanabara Betim.

Betim, 08 de setembro de 2010.


Wilson Ribeiro de Meireles
Gerente UBSF Guanabara

**ANEXO E - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Municipal
Odilon Behrens / Belo Horizonte - MG.**



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Avaliação de Projeto de Pesquisa

FR: 418196

Número do Parecer: 0681.0.000.216-11

Titulo do Projeto: "Pré-Eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório"

Pesquisador Responsável: Melina de Barros Pinheiro

PARECER DO CEP/ HOB: o projeto em apreço foi avaliado pelo CEP-HOB e aprovado.

Data da reunião: 12 de maio de 2011

Atenciosamente,


Ricardo Melo Marinho
Coordenador do CEP/HOB

ANEXO F - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.



Registro CEP: 035/2009 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Belo Horizonte, 27 de abril de 2009.

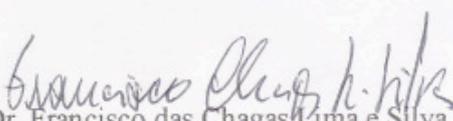
Interessada: Valeria Cristina Sandrim

Parecer:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 24 de abril de 2009 analisou e **APROVOU** o protocolo de pesquisa **“Estudo haplotípico de novos variantes da eNOS em gestantes brancas e negras com pré-eclâmpsia: impacto sobre resposta terapêutica anti-hipertensiva.”**, registrado neste CEP sob número 035/2009, no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é de 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).


Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva
Coordenador do CEP

ANEXO G - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os grupos I, II e II



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para os grupos de gestantes com pré-eclâmpsia)

PROJETO DE PESQUISA: “Pré-eclâmpsia e polimorfismos dos genes do fator VII e do receptor de estrogênio”

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 10mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa/FHEMIG sob o nº 77/08.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Professores responsáveis:

Luci Maria Sant'Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Karina Braga Gomes Borges – telefone: 3409-4983

Ana Paula Salles Moura Fernandes – telefone: 3409-6884

Maria das Graças Carvalho – telefone: 3409-6881

Lara Carvalho Godoi – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: Alameda Vereador Álvaro Celso, nº. 100 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 30150-260. Telefone: 3239-9500.

NOME:

Carteira de identidade: _____

Assinatura: _____ DATA: ____ / ____ / ____

Agradecemos sua valiosa participação!



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para os grupos de gestantes controle)

PROJETO DE PESQUISA: “Pré-eclâmpsia e polimorfismos dos genes do fator VII e do receptor de estrogênio”

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença. Você será incluída no grupo de gestantes controle, ou seja, que não apresentam a doença.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 10mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa/FHEMIG sob o nº 77/08.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum comprometimento ao seu atendimento e tratamento.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Professores responsáveis:

Luci Maria Sant'Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Karina Braga Gomes Borges – telefone: 3409-4983

Ana Paula Salles Moura Fernandes – telefone: 3409-6884

Maria das Graças Carvalho – telefone: 3409-6881

Lara Carvalho Godoi – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: Alameda Vereador Álvaro Celso, nº. 100 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 30150-260. Telefone: 3239-9500.

NOME:

Carteira de identidade: _____

Assinatura: _____ DATA: ____/____/____

Agradecemos sua valiosa participação!



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para o grupo de mulheres não gestantes)

PROJETO DE PESQUISA: “Pré-eclâmpsia e polimorfismos dos genes do fator VII e do receptor de estrogênio”

Prezada Sra,

Você está sendo convidada para participar de uma pesquisa que tem por objetivo investigar as alterações da coagulação que ocorrem na pré-eclâmpsia e, dessa forma, contribuir para o maior entendimento desta doença. Você será incluída no grupo-controle, ou seja, de mulheres não gestantes.

Para realizar este estudo, gostaríamos de colher 10mL do seu sangue para realização dos exames e armazenamento em um banco de amostras biológicas para estudos genéticos futuros. Esclarecemos que este banco de amostras está aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa/FHEMIG sob o nº 77/08.

Na coleta de sangue pode ocorrer uma leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar o risco de formação de hematomas, a coleta de sangue será realizada por um profissional experiente. Serão utilizados agulhas e tubos descartáveis.

Seu nome e os resultados dos exames serão mantidos em segredo.

Esclarecemos que caso não queira participar deste estudo, não haverá nenhum problema.

Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão abaixo relacionados.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

Professores responsáveis:

Luci Maria Sant'Ana Dusse – telefone: 3409-6880

Karina Braga Gomes Borges – telefone: 3409-4983

Ana Paula Salles Moura Fernandes – telefone: 3409-6884

Maria das Graças Carvalho – telefone: 3409-6881

Lara Carvalho Godoi – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: Alameda Vereador Álvaro Celso, nº. 100 – Santa Efigênia – Belo Horizonte – Minas Gerais. CEP 30150-260. Telefone: 3239-9500.

NOME:

Carteira de identidade: _____

Assinatura: _____ DATA: ____/____/____

Agradecemos sua valiosa participação!

ANEXO H - Fichas clínicas dos grupos I, II e III

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPسيا E POLIMORFISMOS NOS GENES DO FATOR VII E DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO"			
Data:			
Grupo 1: Pré-eclâmpسيا		Paciente nº:	
Diagnóstico de pré-eclâmpسيا dado em: ____/____/____			
Médico responsável:			
1. Identificação			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ()			
2. Anamnese			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpسيا na família, complicações em gravidez anterior)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Prática exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
3. Informações sobre a(s) gestação(ões)			
Idade gestacional: ____ semanas			
Pré-natal? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Gravidez múltipla? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
GPA (Gravidez Parto Aborto): ____/____/____			
Mesmo pai?			
Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?			
Intervalo interpartal (meses):			
Parto prematuro?			
Filhos vivos:			
Principais queixas:			
<input type="checkbox"/> Cefaléia	<input type="checkbox"/> Epigastralgia	<input type="checkbox"/> Escotoma	<input type="checkbox"/> Reflexo patelar
<input type="checkbox"/> Outros			
4. Uso de medicamentos			
<input type="checkbox"/> Nifedipina	<input type="checkbox"/> Metildopa	<input type="checkbox"/> Sulfato de magnésio	

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPRIA E POLIMORFISMOS NOS GENES DO FATOR VII E DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO"			
Data:			
Grupo 2: Normotensas		Paciente nº:	
1. Identificação			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ()			
2. Anamnese			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpsia na família, complicações em gravidez anterior)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Praticar exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
3. Informações sobre a(s) gestação(ões)			
Idade gestacional: _____ semanas			
Pré-natal? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Gravidez múltipla? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
GPA (Gravidez Parto Aborto): ____/____/____			
Mesmo pai?			
Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?			
Intervalo interpartal (meses):			
Parto prematuro?			
Filhos vivos:			
4. Uso de medicamentos? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
SE SIM. Quais medicamentos?			
5. Informações clínicas			
Altura: _____ cm			
Peso: _____ Kg			
Ganho de peso na gravidez:			
Pressão arterial: ____/____ mmHg			

FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPRIA E POLIMORFISMOS NOS GENES DO FATOR VII E DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO"			
Data:			
Grupo: 3 - Mulheres não gestantes		Paciente nº:	
1. Identificação			
Nome:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ()			
2. Anamnese			
Presença de doenças intercorrentes? (distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, história familiar)			
Fumante? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Consumo de álcool? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO		Quantidade:	
Pratica exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
Uso de medicamentos? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
SE SIM. Quais medicamentos?			
Gestações? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Se SIM. Quantas?			
Intercorrências durante a gestação? (hipertensão, pré-eclâmpsia, aborto, parto prematuro)			
3. Exame físico			
Altura: _____ cm			
Peso: _____ Kg			
IMC:			
Pressão arterial: _____ / _____ mmHg			