

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

**PATRÍCIA NESSRALLA ALPOIM**

**PRÉ-ECLÂMPسيا PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO  
DE ADMA, GMP<sub>c</sub> E POLIMORFISMOS DA SINTASE  
DO ÓXIDO NÍTRICO**

**Belo Horizonte - MG**

**2013**

**PATRÍCIA NESSRALLA ALPOIM**

**PRÉ-ECLÂMPسيا PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO  
DE ADMA, GMP<sub>c</sub> E POLIMORFISMOS DA SINTASE  
DO ÓXIDO NÍTRICO**

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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luci Maria Sant'Ana Dusse

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Karina Braga Gomes Borges

**Belo Horizonte - MG**

**2013**

A457p Alpoim, Patrícia Nessralla.  
Pré-eclâmpsia precoce e tardia: avaliação de ADMA, GMPc e polimorfismos da sintase do óxido nítrico / Patrícia Nessralla Alpoim. – 2013.

111 f. : il.

Orientadora: Luci Maria Sant'Ana Dusse.  
Co-Orientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Pré-eclâmpsia - Precoce - Teses. 2. Pré-eclâmpsia - Tardia - Teses. 3. Polimorfismo (Genética) - Teses. 4. L-Arginina Dimetil Assimétrica (ADMA) - Teses. 5. Guanosina monofosfato cíclica (GMPc) – Teses. 6. Oxído nítrico - Teses. I. Dusse, Luci Maria Sant'Ana. II. Borges, Karina Braga Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:614.599.2

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**PATRÍCIA NESSRALLA ALPOIM****"PRÉ-ECLÂMPRIA PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO DE ADMA, GMPC E  
POLIMORFISMOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO"**

Tese, como requisito parcial para obter o título de Doutora 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 seis de maio de 2013.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**  
Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral - UFMG  
Prof. Dr. Augusto Henriques Fulgêncio Brandão - UFMG  
Prof. Dr. Rômulo Leite - UFOP  
Dr. Alessandro Clayton de Souza Ferreira - Inst. Hermes Pardini  
Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges - UFMG  
Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse - UFMG

*Dedico este trabalho*

*A Deus que me guia para o lugar e o momento certo.*

*Aos meus pais que sempre dedicaram suas vidas para que eu chegasse aqui.*

*Ao meu irmão, Thiago, pela amizade e companheirismo.*

*Aos meus avós, Miguel, Ilka e Didi pelo exemplo de vida.*

*Ao meu marido, Marquinhos, pelo amor, paciência e apoio incondicional.*

*Aos familiares e amigos, colaboradores em todos os momentos.*

*Às minhas orientadoras, Prof<sup>ta</sup> Lucí e Prof<sup>ta</sup> Karina, pela dedicação e confiança.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, energia perfeita de amor, presente em cada segundo da minha vida que guia os meus passos para as decisões corretas permitindo assim, minha evolução espiritual.

À professora e orientadora Luci Maria Sant'Ana Dusse, pelos ensinamentos, exemplo de competência, confiança, paciência, amizade e contribuição para meu crescimento acadêmico.

À professora e co-orientadora Karina Braga Gomes Borges, pela preocupação, compromisso, e enorme contribuição em todas as etapas da execução desse estudo.

À professora Maria das Graças Carvalho, pela colaboração e disponibilidade sempre imediata.

À professora Ana Paula Sales Moura Fernandes, pela disponibilidade do laboratório de Biologia Molecular e pela colaboração.

A Lara, Melina, Letícia e Fabiana, pela parceria nas coletas, colaboração, apoio e amizade.

À Letícia Lemos, pela amizade e enorme contribuição na genotipagem das amostras utilizadas neste estudo.

A Ludmila Gomes e Valéria Sandrim pela colaboração e disposição na análise de haplótipos.

Aos amigos do laboratório de Hematologia pela imprescindível e importante ajuda nos testes laboratoriais.

As equipes da Obstetrícia e da Enfermagem da Maternidade Odete Valadares/Belo Horizonte e da Maternidade do Hospital Público Regional de Betim, em especial à Marcilene, à Dr<sup>a</sup> Juliane Petterson e à enfermeira Alessandra Maciel que sempre estiveram atentas em comunicar-me o aparecimento de gestantes com pré-eclâmpsia grave.

Aos profissionais do laboratório da Maternidade Odete Valadares e do laboratório da Uai Guanabara/Betim que durante suas rotinas de trabalho me ajudaram com dedicação e paciência.

Às técnicas em enfermagem da Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara/Betim pela ajuda e participação na coleta das amostras de sangue das gestantes normotensas.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, parceria, apoio, paciência incentivo e confiança em todos os momentos da minha vida.

Ao Marquinhos, pela ajuda, companheirismo e torcida durante toda minha caminhada e paciência na coleta de sangue das gestantes, inclusive aos finais de semana.

Ao amigo e companheiro de trabalho, Fernando, pela compreensão e resolução das tarefas na farmácia da Uai Guanabara nos momentos de minha ausência.

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela disponibilidade e atenção constantes, além do empenho e contribuição para a qualidade do curso.

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela gentileza e serviços prestados.

Às gestantes, que mesmo abordadas em um momento tão delicado, não se esquivaram de dar sua preciosa e efetiva ajuda para a realização deste estudo.

Aos professores da Faculdade de Farmácia, e em especial aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelos ensinamentos.

À Flávia, pela orientação na análise estatística.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização e finalização deste estudo, muito obrigada!

*“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em DEUS.”*

**Aristóteles**



## RESUMO

A pré-eclâmpsia caracteriza-se pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria a partir da vigésima semana de gestação. Essa doença cursa com vasoconstrição e disfunção endotelial generalizada. O óxido nítrico é um mensageiro intracelular e intercelular e participa de várias reações fisiológicas e fisiopatológicas que ocorrem em diversos tipos de células. É produzido a partir da L-arginina, em uma reação catalisada por uma família de enzimas, sintases do óxido nítrico. Nas células endoteliais e nas plaquetas, o óxido nítrico ativa a enzima guanilato ciclase, que leva ao aumento de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), resultando em relaxamento vascular e inibição da ativação plaquetária. A L-Arginina Dimetil Assimétrica (ADMA) é um aminoácido de origem intracelular formada a partir da metilação de resíduos de arginina das proteínas e compete com a L-arginina reduzindo a síntese de óxido nítrico. Os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da enzima sintase do óxido nítrico endotelial estão associados ao comprometimento da síntese de óxido nítrico em várias condições clínicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Foram avaliados os níveis plasmáticos de ADMA (ELISA, Diagnostika GMBH<sup>®</sup>), níveis de GMPc intraplaquetário (ELISA, Amersham<sup>®</sup>) e os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da sintase do óxido nítrico endotelial na pré-eclâmpsia grave de início precoce (idade gestacional <34 semanas) e tardio (idade gestacional ≥34 semanas). Foram avaliadas 201 mulheres, das quais 53 eram gestantes com pré-eclâmpsia grave precoce (grupo I), 45 gestantes com pré-eclâmpsia grave tardia (grupo II) e 103 gestantes normotensas (grupo III). Os níveis plasmáticos de ADMA foram maiores no grupo I em relação ao grupo II e III ( $p < 0,001$  para ambos). Os níveis de GMPc intraplaquetário não foram diferentes ao comparar os grupos dois a dois. O polimorfismo VNTR b/a teve a frequência maior do alelo a e genótipo aa no grupo I. A frequência de mulheres homozigotas (894TT) (modelo recessivo) foi maior no grupo I em relação ao grupo II e no grupo II em relação ao grupo III ( $p = 0,042$  e  $p = 0,002$ , respectivamente). A frequência de mulheres homozigotas (VNTR b/a) (modelo recessivo) foi maior no grupo I em relação ao grupo III ( $p = 0,011$ ). Uma maior frequência dos genótipos aa e ab para o polimorfismo VNTR b/a (modelo dominante) foi observada ao comparar os grupos I e II, bem como os grupos I e III

( $p=0,042$ , e  $p=0,049$ , respectivamente). A frequência do haplótipo T-b-C foi maior no grupo II em relação os grupos I e III ( $p=0,0056$  e  $p=0,036$ , respectivamente). A análise de correlação do polimorfismo T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário revelou que esses estão fracamente correlacionados ( $p=0,036$ ;  $r=0,430$ ). Concluiu-se que há indícios que ocorra um comprometimento da via L-arginina:NO na pré-eclâmpsia grave precoce e tardia. Os níveis plasmáticos de ADMA e de polimorfismos do gene da sintase do NO sugerem que as formas precoce e tardia da pré-eclâmpsia grave constituem doenças distintas. O GMPc intraplaquetário não constitui um marcador fidedigno para avaliar a inibição da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia.

Palavras-chave:

Pré-eclâmpsia precoce/tardia – óxido nítrico – polimorfismos no gene da sintase endotelial do óxido nítrico – ADMA- GMPc

## ABSTRACT

Preeclampsia is characterized by the development of hypertension and proteinuria from the twentieth week of pregnancy. The disease progresses with generalized vasoconstriction and endothelial dysfunction. Nitric oxide is an intercellular and intracellular messenger and participates in several physiological and pathophysiological reactions occurring in various cell types. It is produced from L-arginine in a reaction catalyzed by a family of nitric oxide synthases. In endothelial cells and platelets, nitric oxide activates the enzyme guanylate cyclase, which leads to increased cyclic guanosine monophosphate (cGMP) resulting in vascular relaxation and inhibition of platelet activation. L-Arginine Asymmetric Dimethyl (ADMA), an amino acid of intracellular source formed from the methylation of arginine residues of the protein, competes with L-arginine reducing nitric oxide synthesis. The polymorphisms G894T, VNTR b / a and T-786C gene of the enzyme endothelial nitric oxide synthase are associated with impaired nitric oxide synthesis in several clinical conditions. The objective of this study was to investigate the role of nitric oxide in the physiopathology of preeclampsia. Plasma levels of ADMA (ELISA Diagnostika GMBH®), intraplatelet cGMP (ELISA, Amersham®) levels and polymorphisms G894T, VNTR b / a and T-786C mutation in the endothelial nitric oxide synthase were assessed in early onset severe preeclampsia (gestational age <34 weeks) and late (gestational age  $\geq$  34 weeks). A total of 201 women were evaluated, 53 with early severe preeclampsia (group I), 45 with late severe preeclampsia (group II) and 103 normotensive pregnant women (group III). Plasma levels of ADMA, were higher in group I than in group II and III ( $P < 0.001$  for both). Intraplatelet levels of cGMP were not different when comparing the groups in pairs. VNTR polymorphism b/a had a higher frequency of allele a and genotype aa in group I. The frequency of women homozygous (894TT) (recessive model) was higher in group I than in group II and group II than in group III ( $P = 0.042$  and  $P = 0.002$ , respectively). The frequency of homozygous women (VNTR b/a) (recessive model) was higher in group I than in group III ( $P = 0.011$ ). Higher frequencies of genotypes aa and ab for VNTR b/a polymorphism (dominant model) were observed comparing the groups I and II, as well as the groups I and III ( $P = 0.042$ ,  $P = 0.049$ , respectively). The frequency of haplotype T-b-C was higher in group II compared to groups I and III ( $P = 0.0056$  and

P=0.036, respectively). The correlation analysis of the polymorphism T-786C and intraplatelet cGMP levels revealed that these are poorly correlated (P=0.036, r=0.430). It was concluded that could be an impairment of the L-arginine: NO pathway in early and late-onset preeclampsia. ADMA plasma levels and nitric oxide synthase gene polymorphisms suggest that early and late forms of preeclampsia are different diseases. Intraplatelet cGMP is not a reliable marker to assess inhibition of platelet activation in preeclampsia.

Keywords:

Early-onset/late-onset preeclampsia - nitric oxide - polymorphisms of the gene of endothelial nitric oxide synthase - ADMA -cGMP

## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	<b>Esquema das funções vasodilatadora e inibidora da ativação plaquetária do NO. NO (óxido nítrico), NOS (sintase do óxido nítrico), GMPc (guanosina monofosfato cíclica).....</b>	<b>32</b>
<b>2</b>	<b>Síntese de ADMA a partir de resíduos metilados de arginina e sua interferência na síntese de NO. NO (óxido nítrico), NOS (sintase do óxido nítrico).....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Número de mulheres participantes do estudo de acordo com os grupos e parâmetros avaliados.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>Esquema do preparo da amostra para obtenção do GMPc intraplaquetário. rpm (rotação por minuto), PRP (plasma rico em plaquetas), IBMX (isobutilmetilxantina).....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>VNTR b/a. Fragmentos obtidos após realização da PCR.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>G894T. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonuclease de restrição.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>T-786C. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonuclease de restrição.....</b>	<b>56</b>

## LISTA DE TABELAS

1	Distribuição das participantes do estudo de acordo com local onde foram selecionadas...	59
2	Características clínicas das participantes do estudo.....	60
3	Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave precoce e tardia.....	62
4	Valores de ADMA plasmática obtidos para os grupos avaliados.....	64
5	Valores de GMPc intraplaquetário obtidos para os grupos avaliados.....	65
6	Equilíbrio de Hardy – Weinberg para as populações estudadas (valores de p).....	65
7	Distribuição e comparação das frequências alélicas e genotípicas nos grupos avaliados...66	
8	Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão recessivo de herança: homozigoto vs (heterozigoto + selvagem) entre os grupos PE grave precoce e PE grave tardia.....	67
9	Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão recessivo de herança: homozigoto vs (heterozigoto + selvagem) entre os grupos PE grave precoce e gestantes normotensas.....	67
10	Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão recessivo de herança: homozigoto vs (heterozigoto + selvagem) entre os grupos PE grave tardia e gestantes normotensas.....	67
11	Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão dominante de herança: (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem entre os grupos PE grave precoce e PE grave tardia.....	68
12	Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão dominante de herança: (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem entre os grupos PE grave precoce e gestantes normotensas.....	68
13	Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão dominante de herança: (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem entre os grupos PE grave tardia e gestantes normotensas.....	69
14	Frequências haplotípica dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da eNOS nos grupos PE grave precoce/tardia e gestantes normotensas.....	69
15	Coeficiente de correlação (r) de Spearman e valor de p para os polimorfismo G894T, VNTR b/a e T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário nos grupos avaliados.....	70
16	Análise univariada, considerando PE grave como variável dependente.....	71

## LISTA DE ANEXOS

<b>A</b>	<b>Parecer de aprovação COEP – UFMG.....</b>	<b>101</b>
<b>B</b>	<b>Declaração de aprovação pelo HPRB.....</b>	<b>102</b>
<b>C</b>	<b>Parecer de aprovação CEP – Santa Casa.....</b>	<b>103</b>
<b>D</b>	<b>Parecer aprovação CEP – HOB.....</b>	<b>104</b>
<b>E</b>	<b>Declaração aprovação UBSF Guanabara.....</b>	<b>105</b>
<b>F</b>	<b>Parecer aprovação CEP – MOV.....</b>	<b>106</b>
<b>G</b>	<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>107</b>
<b>H</b>	<b>Fichas clínicas grupos I, II e III.....</b>	<b>108</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	L-Arginina Dimetil Assimétrica
ALT	Alanina amino transferase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AST	Aspartato amino transferase
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CID	Coagulação intravascular disseminada
CIUR	Crescimento intra-uterino restrito
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
DDAH	Dimetilarginina dimetilaminohidrolase
diast.	Diastólica
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DP	Desvio padrão
DPP	Descolamento prematuro de placenta
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ELISA	<i>Enzyme linked immune assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPR	Ressonância eletrônica paramagnética
EUA	Estados Unidos da América
FMD	Dilatação mediada pelo fluxo da arterial braquial
GC	Guanilato ciclase
GCa	Guanilato ciclase ativada
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPG	Ganho de peso na gestação
GTP	Guanosina trifosfato
hCG	Gonadotrofina coriônica
HELLP	<i>Hemolysis elevated liver enzymes, and low platelet</i>
HOB	Hospital Municipal Odilon Behrens
HPRB	Hospital Público Regional de Betim



HUVEC	Células umbilicais humanas
IBMX	Isobutilmetilxantina
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IQ	Intervalo interquartil
LDH	Desidrogenase láctica
L-NAME	L-NG nitroarginina metil éster
L-NMMA	NG-monometil-L-arginina
min.	Minutos
MOV	Maternidade Odete Valadares
MPV	Volume plaquetário médio
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
Nº	Número
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Sintase do óxido nítrico
NS	Não significativo
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Pressão arterial
pb	Pares de base
PE	Pré-eclâmpsia
PGF	Fator de crescimento placentário
PRP	Plasma rico em plaquetas
q.s.p	Quantidade suficiente para
Ref.	Referência
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas do oxigênio
r.p.m	Rotações por minuto
SDMA	Dimetilarginina simétrica
SNPs	Polimorfismos de base única
seg.	Segundos

sem.	Semanas
sFlt-1	Receptor solúvel do PGF
sist.	Sistólica
TMB	Perborato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alpha
UBSF	Unidade Básica de Saúde da Família
VEGF	Crescimento vascular endotelial
VNTR	<i>Variable number of tandem repeat</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
2.1 Considerações gerais da pré-eclâmpsia.....	24
2.1.1 <u>Complicações</u> .....	25
2.1.2. <u>Características clínicas</u> .....	26
2.1.3 <u>Classificação da PE</u> .....	27
2.1.4 <u>Patogênese</u> .....	28
2.2 Óxido Nítrico.....	30
2.2.1 <u>L-Arginina Dimetil Assimétrica (ADMA)</u> .....	33
2.2.2 <u>Avaliação laboratorial do NO na PE</u> .....	36
2.2.3 <u>Polimorfismos do gene da sintase do NO endotelial (eNOS)</u> .....	38
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Casuística.....	46
4.1.1 <u>Aspectos éticos</u> .....	46
4.1.2 <u>Seleção das integrantes do estudo</u> .....	46
4.1.3 <u>Amostra biológica</u> .....	49
4.2 Métodos.....	50
4.2.1 <u>Determinação quantitativa de ADMA plasmática</u> .....	50
4.2.2 <u>Determinação quantitativa do GMPc intraplaquetário</u> .....	50
4.2.3 <u>Análise Molecular</u> .....	51
4.3 Análise estatística dos resultados.....	56
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>58</b>
5.1 Distribuição das participantes do estudo de acordo com local onde foram selecionadas.....	59
5.2 Características clínicas dos grupos avaliados.....	59
5.3 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave precoce e PE grave tardia .....	61
5.4 Avaliação quantitativa de ADMA plasmática.....	64

<b>5.5 Avaliação quantitativa de GMPc intraplaquetário.....</b>	<b>64</b>
<b>5.6 Avaliação dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS.....</b>	<b>65</b>
<b>5.7 Análise de haplótipos.....</b>	<b>69</b>
<b>5.8 Correlação entre os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário.....</b>	<b>70</b>
<b>5.9 Associação dos parâmetros clínicos, GMPc intraplaquetário, ADMA plasmática e polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS e ocorrência de PE grave.....</b>	<b>71</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>6.1 Características clínicas dos grupos avaliados.....</b>	<b>74</b>
<b>6.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos.....</b>	<b>75</b>
<b>6.3 Avaliação quantitativa de ADMA plasmática.....</b>	<b>77</b>
<b>6.4 Avaliação quantitativa de GMPc intraplaquetário.....</b>	<b>79</b>
<b>6.5 Avaliação dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene.....</b>	<b>82</b>
<b>6.6 Avaliação das variáveis associadas à ocorrência de PE.....</b>	<b>85</b>
<b>6.7 Considerações finais.....</b>	<b>85</b>
<b>6.8 Limitação do estudo.....</b>	<b>85</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>

## *1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA*

A gestação constitui uma situação clínica particular, na qual há alteração complexa no organismo da mulher a fim de permitir o crescimento e alojamento do feto. Dessa forma, alterações importantes ocorrem no útero, como aumento de 30 a 50 vezes do seu tamanho e o conseqüente aumento do fluxo sanguíneo para garantir a nutrição e oxigenação necessária ao desenvolvimento fetal.

A pré-eclâmpsia, na forma pura, é caracterizada pelo aparecimento, em gestante normotensa de hipertensão e proteinúria, após a vigésima semana de gestação. Clinicamente é importante distinguir a forma grave da pré-eclâmpsia, na qual a sintomatologia clínica é ainda mais acentuada. A pré-eclâmpsia pode evoluir para outras manifestações clínicas mais sérias como a eclâmpsia, a síndrome HELLP (*Hemolysis elevated liver enzymes, and low platelet*) e a coagulação intravascular disseminada.

Estudos epidemiológicos sugerem que a pré-eclâmpsia está associada à predisposição familiar e às condições socioeconômicas, étnicas e geográficas das gestantes. Mulheres que têm parentes de primeiro grau que desenvolveram pré-eclâmpsia apresentam chance cinco vezes maior de ocorrência da doença. Os genes paternos também desempenham um papel importante no desenvolvimento da pré-eclâmpsia, uma vez que o risco dessa doença é maior em gestante cujo parceiro foi gerado em uma gravidez complicada pela pré-eclâmpsia. Este fato é de grande relevância considerando que o *imprinting* genômico regula o envolvimento de genes exclusivamente paternos no controle da invasão e crescimento da placenta, enquanto o mesmo evento regula a ação de genes maternos na resposta imune adaptativa da gravidez.

Há mais de 30 anos, a idade gestacional na qual surgem os sintomas da pré-eclâmpsia vem despertando a atenção da comunidade científica. No entanto, na prática clínica, apenas nos últimos anos a classificação da doença em precoce e tardia, de acordo com a idade gestacional na qual surgem os sintomas da doença, tem sido adotada. Atualmente a pré-eclâmpsia é classificada como precoce se os sintomas surgem antes de 34 semanas e tardia, se surgem na 34ª semana ou mais. Estas duas formas tendem a ser consideradas como doenças que apresentam mecanismos etiopatogênicos distintos.

O sistema cardiovascular materno requer mudanças funcionais e estruturais para acomodar a necessidade circulatória fetal crescente durante a gestação. Fisiologicamente, há um aumento do ritmo cardíaco, uma diminuição sistêmica da

resistência vascular, um aumento do volume sanguíneo, do fluxo renal, da filtração glomerular e redução intensa da resistência vascular uteroplacentária. Os mecanismos envolvidos nas alterações uteroplacentárias durante a gestação ainda não são conhecidos. No entanto, sabe-se que falhas nesse processo adaptativo reduzem o fluxo sanguíneo placentário em mulheres com pré-eclâmpsia.

A disfunção endotelial parece constituir um determinante para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia, uma vez que a maioria dos sinais e sintomas observados nessa doença está associada ao endotélio como a vasoconstrição generalizada, hipercoagulabilidade e hipertensão. Além disso, um aumento da ativação plaquetária e da formação de agregados plaquetas-leucócitos na pré-eclâmpsia tem sido relatado na literatura.

O óxido nítrico é um mensageiro intra e intercelular e participa de várias reações fisiológicas e fisiopatológicas que ocorrem em diversos tipos de células. É produzido a partir da L-arginina, em uma reação catalisada por uma família de enzimas, as sintases do óxido nítrico. Nas células endoteliais e nas plaquetas, o óxido nítrico ativa a enzima guanilato ciclase, que leva ao aumento de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), redução de íons cálcio resultando em relaxamento vascular e inibição da ativação plaquetária. A avaliação laboratorial do óxido nítrico é complexa, em função da sua meia-vida muito curta e concentração ínfima, e essa tem sido realizada indiretamente por meio de ensaios que refletem a sua presença.

Considerando o papel fisiológico do óxido nítrico na dilatação vascular, na inibição da ativação plaquetária, bem como em diversas etapas da gestação, é possível inferir que um comprometimento da sua síntese esteja associado à ocorrência de pré-eclâmpsia.

Apesar de inúmeros estudos envolvendo a pré-eclâmpsia, a etiologia dessa doença ainda não foi elucidada. A principal motivação para realização deste estudo foi esclarecer a participação do óxido nítrico na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Dessa forma, foi avaliada a inibição competitiva da sintase do NO, pela determinação da ADMA plasmática (inibidor competitivo da síntese de óxido nítrico), a inibição da ativação plaquetária, pela determinação de GMPc intraplaquetário e foi investigada a presença dos polimorfismos (G894T, VNTR b/a e T-786C) do gene da enzima sintase do óxido nítrico endotelial, em gestantes com pré-eclâmpsia grave, nas formas precoce e tardia e gestantes normotensas.

Uma grande limitação aos estudos referentes à pré-eclâmpsia é representada pela dificuldade de diagnóstico e classificação de suas diferentes formas clínicas. O sucesso do diagnóstico clínico da pré-eclâmpsia depende essencialmente do cuidado com que se procura obtê-lo. Assim, é fundamental uma anamnese bem feita, visando encontrar qualquer evidência na história pregressa da paciente de fatos que possam sugerir uma lesão renal primária, bem como um exame clínico-laboratorial rigoroso, valorizando não somente os critérios para o diagnóstico de pré-eclâmpsia, mas também incluindo uma completa avaliação da função renal.

No presente estudo, foi uma preocupação constante assegurar o diagnóstico correto dos casos incluídos, eliminando todos os casos duvidosos. Os critérios de inclusão e exclusão das participantes foram rigidamente seguidos em todas as maternidades onde as gestantes foram selecionadas.

Cumprido ressaltar que, até o momento, nenhum marcador laboratorial que apresente a relação custo-efetividade favorável foi proposto para o diagnóstico da pré-eclâmpsia, sendo esse feito essencialmente com base medida da pressão arterial, determinação da proteinúria e nos dados clínicos.

Considerando a complexidade da pré-eclâmpsia, bem como as lacunas existentes na literatura, este estudo se justifica plenamente podendo gerar conhecimentos que resultem em benefícios para o diagnóstico e prognóstico dessa doença, bem como para o entendimento da etiologia e fisiopatologia da mesma.





## 2.1 Considerações gerais da pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença específica da gestação, caracterizada por hipertensão e proteinúria, na qual são observadas redução da perfusão sanguínea em diversos órgãos devido aos vasoespasmos e ativação das plaquetas e proteínas da coagulação. (1)

A PE incide em cerca de 10% das primigestas (Ministério da Saúde - Manual do puerpério 2006) e é responsável por elevada morbiletalidade perinatal (5-20%). Diversos fatores estão associados ao risco de desenvolvimento da PE como história familiar e pessoal da doença; primeira gravidez; gestação de um diferente parceiro; história de PE na avó paterna; extremos da idade materna (menos que 15 anos e mais que 35 anos); diabetes mellitus; hipertensão crônica; síndrome metabólica; doença renal; gestação múltipla; mola hidatiforme, grupo sanguíneo ABO e alterações trombofílicas. (2-4)

Do ponto de vista da evolução, distinguem-se a PE que se desenvolve em gestante normotensa, denominada PE pura, daquela que se instala em gestantes com quadro hipertensivo anterior, a PE sobreposta. (2)

Apesar dos avanços nas pesquisas envolvendo a PE, sua etiologia ainda não é conhecida. Nenhum tratamento é eficaz para essa doença, a não ser a interrupção da gravidez e retirada da placenta.

O diagnóstico de PE é feito pela determinação da pressão arterial e da proteinúria e não existe um teste laboratorial capaz de confirmar ou excluir a doença. A monitoração das gestantes pré-eclâmplicas inclui o hemograma, contagem de plaquetas e determinação de marcadores de função hepática e renal. A PE pode evoluir para casos ainda mais complexos como a eclâmpsia, caracterizada por convulsões, que podem evoluir para o coma, a síndrome HELLP (*Hemolysis elevated liver enzymes, and low platelet*), caracterizada por hemólise, alteração das enzimas hepáticas e plaquetopenia ou a coagulação intravascular disseminada (CID). (3)

Lindheimer (1981) relatou que a análise de material obtido por biópsia renal revelou a presença de outras doenças renais em 20 a 40% dos casos diagnosticados como PE o que, entre outras implicações, pode levar ao erro de diagnóstico e à falta de acompanhamento médico no seguimento pós-parto de outras doenças confundidas com PE. Além disso, resulta na obtenção de conclusões

errôneas em pesquisas sobre o tema. (5) No entanto, um estudo realizado no Hospital das Clínicas/UFMG/Belo Horizonte, onde foram comparados o diagnóstico clínico da PE e os resultados obtidos por microscopia ótica de material de biópsia renal, revelou um acerto diagnóstico na totalidade dos casos estudados. (6) A discordância destes resultados em relação aos da literatura mundial provavelmente está associada às características epidemiológicas dos grupos analisados (etnia, ambiente, alimentação, etc). Resultados semelhantes foram anteriormente obtidos por Barros (1987) em um estudo realizado em São Paulo, que revelou apenas 4,2% de nefropatia nos casos diagnosticados como PE. (7)

### **2.1.1 Complicações**

Diversas complicações a curto e longo prazo estão associadas a PE, incidindo tanto na mãe quanto no feto. A eclâmpsia, a síndrome HELLP e a CID constituem as maiores complicações da PE grave. A eclâmpsia é caracterizada por convulsões tônico-clônicas generalizadas e ocorre em cerca de 2% das gestantes com PE grave. A síndrome HELLP ocorre em aproximadamente 10-20% dos casos de PE grave e em 70% dos casos surge entre as 27<sup>a</sup> e 37<sup>a</sup> semanas de gestação. (8, 9) A CID ocorre quando o equilíbrio hemostático é rompido e há um predomínio da atividade pró-coagulante sobre a atividade anticoagulante. Dentre este arsenal de achados clínicos e laboratoriais, o diagnóstico da PE torna-se, muitas vezes, difícil e desafiador. As complicações maternas mais graves são as que incluem o sistema nervoso central como as convulsões (eclâmpsia), acidente vascular hemorrágico ou isquêmico. Os danos hepáticos variam desde o aumento das enzimas ao aparecimento da síndrome HELLP. (10) Simultaneamente às complicações maternas, podem surgir na PE as complicações fetais e neonatais que incluem prematuridade iatrogênica, crescimento intrauterino restrito (CIUR), oligoidrâmnio, dificuldade respiratória neonatal e aumento da frequência de admissão nas unidades de tratamento intensivo neonatal. (11)

Dentre as complicações a longo prazo de gestantes que apresentaram PE, destaca-se o risco de recorrência (mulheres com PE grave na primeira gestação apresentam risco elevado de recorrência em 25 a 65%), complicações cardiovasculares (hipertensão, doenças cardíacas isquêmicas, infarto, diabetes tipo II e tromboembolismo venoso) e doenças renais. (12, 13)

### **2.1.2 Características clínicas**

A PE é determinada pelo aparecimento de hipertensão e proteinúria a partir da vigésima semana de gestação. A hipertensão gestacional é definida por pressão sistólica  $\geq 140$ mmHg ou pressão diastólica  $\geq 90$ mmHg, em mulheres previamente normotensas antes da vigésima semana de gestação. A proteinúria é definida pelo aparecimento de proteína em quantidade superior a 0,3g em urina de 24 horas ou 300mg/dL. Na ausência de proteinúria, o diagnóstico de PE é dado quando a hipertensão estiver acompanhada por sintomas como cefaleia, escotoma (distúrbios visuais), epigastralgia (dor abdominal) ou alterações em parâmetros laboratoriais como plaquetopenia e aumento das enzimas hepáticas. (1) Estima-se que 20% de mulheres que desenvolveram eclâmpsia e 10% de mulheres com alterações clínicas e histológicas de PE não apresentaram proteinúria. (14)

A proteinúria é um evento frequente e sua detecção na PE ocorre, geralmente, após o aparecimento da hipertensão. Para sua avaliação é importante considerar tanto as variações individuais como a circadiana. Recentemente, a razão proteína/creatinina tem sido considerada o método de quantificação preferencial de proteinúria na população. O uso dessa razão para o diagnóstico da PE ainda é controverso. Testes utilizando a razão proteína/creatinina foram comparados aos testes em urina de 24 horas e as conclusões foram conflitantes. Estudos mais antigos demonstraram que a razão proteína/creatinina não se correlacionava com a excreção de proteína em urina de 24 horas durante a gestação. (14) Entretanto, dados recentes sugerem uma correlação significativa entre esses testes. (15) Uma meta-análise demonstrou sensibilidade de 84% e especificidade de 76% utilizando um ponto de corte maior que 30mg/mmol, para a razão proteína/creatinina ao comparar com o padrão ouro de excreção de proteína acima de 300mg/dL, em urina de 24 horas. (16)

Historicamente, o edema fez parte da tríade sintomática da PE (hipertensão, proteinúria e edema). No entanto, o edema é muito inespecífico para ser utilizado como propósito de diagnóstico, considerando que gestantes normotensas também podem desenvolvê-lo durante a gestação. (3)

### 2.1.3 Classificação da PE

Clinicamente é importante distinguir a forma grave da PE onde a hipertensão, proteinúria e sintomatologia clínica são ainda mais acentuadas. Dentre os sintomas destacam-se a cefaleia intensa, distúrbios visuais, edema pulmonar e falência renal aguda com oligúria  $\leq 500\text{mL}$  em 24 horas.

Os parâmetros para diagnóstico da PE grave consistem em:

- 1) Hipertensão: pressão sanguínea sistólica  $\geq 160\text{mmHg}$  e/ou pressão sanguínea diastólica  $\geq 110\text{mmHg}$  em, no mínimo, duas ocasiões. O intervalo entre as medições não deve ser inferior a seis horas ou superior a uma semana;
- 2) Proteinúria: excreção de proteína  $\geq 2\text{g}$  em urina de 24 horas ou  $\geq 2+$  pelo método semi-quantitativo de fita, em amostras isoladas (coletadas em intervalo mínimo de 4 horas). (1)

Há mais de 30 anos, a idade gestacional na qual surgem os sintomas da pré-eclâmpsia vem despertando a atenção da comunidade científica (17, 18). No entanto, na prática clínica, apenas nos últimos anos a classificação da doença em precoce e tardia, utilizando como referencial a idade gestacional na qual surgem os sintomas, sendo o ponto de corte em 34 semanas, vem sendo valorizada. (19, 20) Atualmente as formas precoce e tardia tendem a ser consideradas como doenças que apresentam mecanismos etiopatogênicos distintos.

O surgimento da PE em momentos mais precoces determina um pior prognóstico. Tem sido relatado que o aparecimento da doença antes da 24<sup>a</sup> semana está associado à alta morbidade materna e perinatal e a uma chance de 50% de recorrência em gestações subsequentes. Nesses casos, também está aumentada a incidência de hipertensão crônica no futuro, assim como dos níveis de microalbuminúria, o qual é um importante preditor de cardiopatia isquêmica. (21) O surgimento em idade gestacional inferior a 32 semanas está associado a uma mortalidade materna 20 vezes maior em relação à PE que ocorre nas gestações a termo. (10)

#### 2.1.4 Patogênese

Apesar dos inúmeros estudos envolvendo a PE, sua etiologia ainda não foi elucidada. Na PE grave há evidências de hipoperfusão placentária e isquemia que incluem obstrução vascular difusa, deposição de fibrina, espessamento da camada íntima e aterosclerose, particularmente no leito placentário. (3)

Lesão endotelial materna generalizada nos rins, fígado e cérebro provavelmente ocorre após a liberação de fatores vasopressores pela placenta. Diversos marcadores plasmáticos de ativação e disfunção endotelial estão alterados nas gestantes com PE, como o fator de von Willebrand, fator VIII, fibronectina celular, fator tissular, trombomodulina, selectina E, fator de crescimento derivado de plaqueta e endotelina. (22-24) A lesão endotelial materna pode ser claramente visualizada nos rins. Alterações ultraestruturais no glomérulo renal incluem aumento e vacuolização das células endoteliais e perda do espaço capilar, favorecendo a deposição de fibrina, que diminui a área de filtração e, conseqüentemente, provoca a redução do ritmo de filtração glomerular em até 40%. (3) Alterações nos marcadores de hipercoagulabilidade, como o dímero D, (25) fatores envolvidos na via do fator tissular, (26-28) bem como o comprometimento do sistema fibrinolítico (29) têm sido obtidas na PE.

Estudos têm mostrado que além da alteração vascular, a PE está associada à intensa resposta inflamatória materna, porém, o fator que inicia essa resposta inflamatória excessiva não é, ainda, totalmente conhecido. (30, 31) Foi verificado que durante a gestação, o equilíbrio é significativamente alterado pela presença da placenta, uma vez que progesterona e citocinas são capazes de modular as células do sistema imunológico favorecendo o estado regulatório.

Na PE, o desvio da resposta imune para o estado regulatório provavelmente não ocorre, ou é revertido em fases muito precoces da doença. Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias podem provocar alterações funcionais e estruturais, incluindo danos oxidativos e comprometimento dos mecanismos de vasoconstrição e relaxamento de vasos, o que resulta em alterações da integridade vascular e da hemostasia. (32)

Durante gestações sem complicações, observa-se um aumento em quase todos os componentes do sistema renina - angiotensina. No entanto, na PE a atividade da renina, e os níveis circulantes de angiotensina II e aldosterona

encontram-se reduzidas por razões ainda desconhecidas. (33) Diversos estudos demonstraram a presença de um anticorpo agonista do receptor de angiotensina II tipo 1 na circulação de mulheres preeclâmplicas e que a ativação desse receptor por esses anticorpos poderia levar ao aumento de alguns fatores (espécies reativas de oxigênio, inibidor do ativador do plasminogênio, fator tissular e NADAPH oxidase) relacionados a disfunção endotelial e lesão vascular. (34, 35)

A vasoconstrição arteriolar, observada na PE, aumenta a resistência ao fluxo sanguíneo e, dessa forma, explica o aparecimento da hipertensão. Com o aumento da resistência periférica e aparecimento da hipertensão, o volume plasmático é reduzido por perdas para o espaço extravascular, resultando no aparecimento de edema e hemoconcentração. A hemoconcentração, por sua vez, compromete a velocidade do fluxo sanguíneo, predispondo à ativação plaquetária e à coagulação sanguínea. As plaquetas ativadas mediam a ligação de leucócitos, promovendo a ativação de neutrófilos e a consequente produção de radicais livres do oxigênio, que contribuem para a lesão endotelial. (23)

A investigação da associação da PE com a presença de fatores trombofílicos tem resultado em conclusões conflitantes, provavelmente devido à dificuldade de correlacionar a presença de polimorfismos diversos em populações de diferentes etnias. Uma associação entre mutações no gene do fator II da coagulação, da metileno tetraidrofolato redutase, e fator V Leiden com a ocorrência de PE foi demonstrada em alguns estudos (36, 37). No entanto, outros não revelaram essa associação. (38, 39) Dekker *et al.* (1995) demonstraram que gestantes que desenvolveram PE grave, examinadas 10 semanas após o parto, apresentavam frequência elevada de alterações trombofílicas (hiper-homocisteinemia, síndrome antifosfolípídica, deficiência de proteína S, e presença de anticorpo anticardiolipina). (17) Van Pampus *et al.* (1999) identificaram em gestantes que tiveram PE, uma deficiência de proteína S, maior resistência à proteína C ativada, presença de fator V Leiden, hiper-homocisteinemia e níveis elevados de anticorpo anticardiolipina comparando-se às gestantes que evoluíram normalmente. (40)

Apesar de inúmeras hipóteses para o entendimento da fisiopatologia da PE, a presença da placenta e a disfunção endotelial parecem constituir os maiores determinantes para o desenvolvimento da doença, uma vez que a resolução da maioria dos sinais e sintomas ocorre em até 48 horas após remoção da placenta. Confirmando essa hipótese, a PE já foi identificada em gravidez molar (placenta

presente e ausência de feto) e, após o parto, em casos nos quais a remoção da placenta não foi completa. (41, 42)

## 2.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, conhecido há muitos anos como poluente do ar e agente tóxico. (43) Nos últimos 30 anos, tem sido verificado que o NO constitui uma molécula de sinalização celular endógena de grande importância do ponto de vista fisiológico.

O NO endógeno é produzido a partir da L-arginina por um grupo de enzimas conhecidas como sintases do NO. Há três isoformas conhecidas desta enzima. Uma delas consiste em uma isoforma constitutiva, encontrada nas células endoteliais e plaquetas (44) (eNOS) que sintetiza NO por períodos curtos, dependente de íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e de calmodulina. A segunda é responsável pela síntese de NO dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios (nNOS). A terceira é induzida após a ativação das células por citocinas e endotoxinas bacterianas (iNOS) e, uma vez expressa, sintetiza NO por longos períodos. Essa isoforma é independente de  $\text{Ca}^{2+}$  e responsável pelas manifestações tóxicas do NO. (45, 46)

O NO é um mensageiro intracelular e intercelular e participa de várias reações fisiológicas e fisiopatológicas que ocorrem em diversos tipos de células, incluindo os sistemas cardiovascular, imune e nervoso. O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento dos vasos sanguíneos. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*) o que leva à ativação da eNOS presente nessas células e à consequente produção de NO. A eNOS está estrategicamente ancorada na membrana da célula endotelial, favorecendo a liberação de grandes quantidades de NO próximo tanto à camada muscular do vaso quanto às células sanguíneas circulantes. (43, 46)

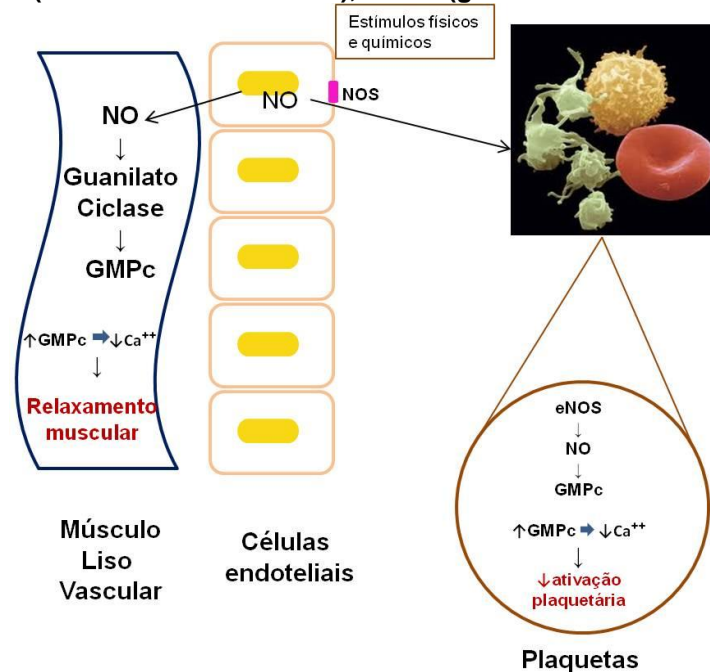
Em resposta aos agonistas como a bradicinina, ocorre a fosforilação da eNOS, determinando sua translocação para o citosol. Esse mecanismo provavelmente tem um papel na regulação da produção de NO *in situ* e na sua



atividade biológica. O NO produzido pela célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular ou para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC) e, assim, altera a conformação dessa enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O sistema GC-GMPc tem uma importância central para a ação fisiológica do NO. O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento dessa célula, uma vez que há a diminuição da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para a célula, a inibição da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático e o aumento do sequestro de  $\text{Ca}^{2+}$  para esse retículo. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilato ciclase **(Figura 1)**. (45, 46)

O NO que deixa a célula endotelial em direção à corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram próximas à parede do vaso ou nas hemácias. No interior das plaquetas, assim como ocorre na célula muscular, o NO promove um aumento de GMPc e diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  livre. Como o  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo estará inibido. Dessa forma, o NO produzido pelas células endoteliais bem como o produzido pelas plaquetas é importante para o controle da função plaquetária **(Figura 1)**. (46)

**Figura 1: Esquema das funções vasodilatadora e inibidora da ativação plaquetária do NO. NO (óxido nítrico), NOS (sintase do óxido nítrico), GMPc (guanosina monofosfato cíclica).**



Atualmente, está bem estabelecido que o NO resultante da eNOS tem um papel crucial na manutenção do tônus vascular, na regulação da pressão sanguínea, na prevenção da agregação plaquetária, na regulação da interação leucócitos-endotélio e na permeabilidade vascular. (46, 47)

A produção reduzida de NO está associada a doenças como aterosclerose, hipertensão, vasoespasmos cerebral e coronariano e lesão por isquemia-reperfusão. (48, 49)

No sistema imune, o NO é o efetor da citotoxicidade mediada pelos macrófagos e a produção excessiva desse mediador é um estímulo para a inflamação. Nos neurônios, o NO atua como mediador para potencializar a neurotransmissão a longo prazo. (45)

Evidências demonstram que o NO está intimamente envolvido em diversas etapas da gravidez. Estudos no modelo animal e em humanos sugerem a participação desse composto no processo de implantação do embrião (50), na manutenção da aquiescência uterina durante a gestação, nos ajustes fisiológicos fundamentais para o êxito da gestação (51, 52), na regulação da pressão sanguínea (53), na refratariedade aos agentes pressores e na inibição das contrações uterinas durante a gestação e permissão dessas no momento do parto. (54)

O sistema cardiovascular materno requer mudanças funcionais e estruturais para acomodar a necessidade circulatória fetal crescente durante a gestação, o que está associado à redução intensa da resistência vascular uteroplacentária. (55) Os mecanismos envolvidos nas mudanças uteroplacentárias durante a gestação ainda não são conhecidos. No entanto, acredita-se que o NO tenha um papel importante tanto na gravidez normal como na PE. (56)

### **2.2.1 L-Arginina Dimetil Assimétrica (ADMA)**

A L-Arginina Dimetil Assimétrica (ADMA) é um aminoácido de origem intracelular encontrado, fisiologicamente, no plasma, urina, tecidos e em diversas células. (57) A ADMA é formada durante as modificações pós-traducionais das proteínas quando resíduos de arginina são metilados pela ação de enzimas metiltransferases. (58) As metiltransferases se encontram predominantemente no núcleo celular e exercem ações no processamento do RNA e controle transcricional. A ADMA é liberada no citosol quando as proteínas são hidrolisadas, sendo assim, um produto do *turnover* das mesmas. Dessa forma, a quantidade de ADMA gerada é dependente da extensão da metilação das proteínas e da taxa de *turnover*. (59)

Além da ADMA, duas outras argininas metiladas já foram descritas, a dimetilarginina simétrica (SDMA), que é um isômero inerte da ADMA (60-62) e a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA).

Existem dois tipos de metiltransferases com várias isoformas. A tipo 1 catalisa a formação da ADMA e a tipo 2, da SDMA. O análogo L-NMMA pode ser formado a partir dos dois tipos de metiltransferases. (58)

Hibbs *et al.* (1987) foram os primeiros a demonstrarem a ação biológica de argininas metiladas ao confirmar que a ativação de macrófagos *in vivo* era inibida pelo análogo L-NMMA. (63)

Atualmente, a ADMA é considerada o inibidor competitivo das três isoformas da NOS, uma vez que seu isômero inerte, a SDMA não apresenta efeito direto na atividade dessas enzimas e os níveis de L-NMMA no plasma são muito reduzidos. (60, 61)

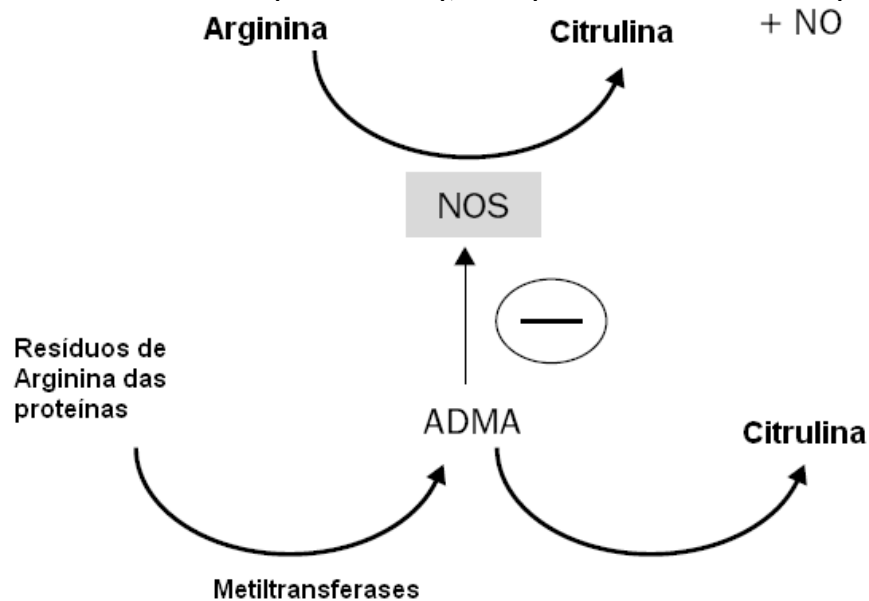
O efeito inibitório da ADMA sobre a NOS pode ser revertido pela suplementação excessiva com L-arginina. (61) A concentração inibitória máxima em 50% (IC<sub>50</sub>) é dependente da concentração de L-arginina do meio (64) e varia de

aproximadamente 2-10 $\mu$ M. (65) Diversos estudos *in vitro* demonstraram que níveis aumentados de ADMA inibiram significativamente a eNOS e reduziram a produção de NO em cultura de células endoteliais e em vasos sanguíneos humanos isolados. (66-68) Além disso, foi demonstrado que a administração de ADMA em ratos saudáveis causou um aumento da resistência vascular renal e da pressão arterial. (69)

Todas as três formas de arginina metilada interferem no transporte da NOS, que é mediado pelo carreador de aminoácido catiônico na membrana plasmática (canais  $\gamma^+$ ), o que explica o efeito inibitório do isômero inerte da ADMA, o SDMA, na biodisponibilidade do NO. (70)

A **Figura 2** ilustra a síntese de ADMA e sua interferência na síntese de NO.

**Figura 2:** Síntese de ADMA a partir de resíduos metilados de arginina e sua interferência na síntese de NO. NO (óxido nítrico), NOS (sintase do óxido nítrico).



A eliminação de ADMA se dá predominantemente por metabolização que envolve as enzimas dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH) com a produção de citrulina e dimetilamina, mas pode ocorrer também por excreção renal. (71) As DDAH apresentam duas isoformas com distribuição distinta de acordo com o tecido, mas com atividades semelhantes. (72)

A regulação da expressão gênica e da atividade das DDAH permanece desconhecida. Foi demonstrado que a incubação de células endoteliais com fator de

necrose tumoral alpha (TNF $\alpha$ ) ou com lipoproteína de baixa densidade oxidada reduziu a atividade dessas enzimas. (73) Outros fatores como stress oxidativo, níveis elevados de glicose ou de homocisteína, contribuem para redução da atividade das DDAH e conseqüente elevação dos níveis de ADMA. (74, 75) Alguns estudos sugerem o envolvimento do fígado no metabolismo das argininas metiladas, uma vez que foi demonstrado que os hepatócitos expressam canais  $y^+$  em suas membranas em abundância e contém concentrações elevadas de DDAH. (59) Mais recentemente, um estudo com pacientes que passaram por cirurgia hepática, demonstrou que o fígado é essencial para a regulação da concentração plasmática das argininas metiladas. (76)

Em diversas doenças, como as cardiovasculares, cerebrais, da mucosa gástrica e PE, tem sido relatada a elevação dos níveis plasmáticos de ADMA e essa tem sido utilizada como um marcador de prognóstico. (77, 78)

#### **2.2.1.1 ADMA e PE**

Diversos estudos demonstraram a importância do NO na ocorrência da PE. Speer *et al.* (2008) observaram que na metade da gestação, os níveis de ADMA eram mais elevados em gestantes que desenvolveram PE em relação aquelas com gestação normal. (79) Savvidou *et al.* (2003) mostraram que concentrações elevadas de ADMA precederam a PE. Esses pesquisadores encontraram níveis plasmáticos de ADMA mais elevados nas 23-25ª semanas em mulheres que posteriormente desenvolveram PE. (80)

Alguns estudos demonstraram níveis elevados de ADMA em mulheres com PE, relacionando-os à diminuição da síntese de NO e ao comprometimento endotelial que é observado nessa doença. (81-85) Acredita-se que concentrações elevadas de ADMA atuem inibindo a eNOS e contribuindo para a disfunção endotelial observada na PE. (86) Além disso, acredita-se que a ADMA, além de inibir a atividade da eNOS, possa convertê-la em uma enzima geradora de superóxidos, servindo como fonte de estresse oxidativo vascular. (79) Outro mecanismo proposto para redução de NO pela ADMA seria a competição com moléculas de L-arginina através da membrana endotelial alterando, assim, a produção de NO pela redução da disponibilidade de arginina. (87)

Sandrim *et al.* (2010) em um estudo na população brasileira encontrou uma associação negativa entre os níveis plasmáticos de ADMA e os níveis de nitratos na PE ao comparar com gestantes normotensas. (88)

### **2.2.2 Avaliação laboratorial do NO na PE**

A determinação de NO em amostras biológicas é complexa e desafiadora devido à ínfima concentração e meia-vida curta dessa molécula, cerca de quatro a seis segundos no plasma e dez a sessenta segundos nos tecidos. (46) Diversos métodos utilizando as mais avançadas tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de parâmetros relativos ao NO, tanto direta quanto indiretamente, por meio de ensaios que reflitam a sua presença.

Em modelos animais, fragmentos de artérias de tecido subcutâneo, anéis de artéria umbilical, fragmentos placentários, leucócitos e plaquetas circulantes têm sido utilizados para a determinação de NO, por meio de diferentes metodologias. Em seres humanos, a determinação do NO é ainda mais complexa, considerando-se a dificuldade de obtenção de amostra biológica devido a questões éticas.

A participação do NO na PE tem sido investigada e resultados contraditórios têm sido relatados. Um aumento dos níveis de NO (89-93), ou níveis sem alterações (94-96) ou diminuição (97-101) em relação às gestantes normotensas foram encontrados.

Pathak *et al.* (1999) encontraram níveis de nitrato e nitrito aumentados na PE e acreditam que esse aumento ocorra devido à produção excessiva de NO pela circulação sistêmica e/ou pelos vasos uteroplacentários como uma resposta compensatória à isquemia placentária e redução do fluxo sanguíneo pela invasão trofoblástica incompleta. Além disso, o comprometimento renal, característico da PE, pode afetar a excreção urinária dos nitratos e conseqüentemente resultar em aumento desses no plasma. (93)

Ma *et al.* (2010) observaram em ratas e camundongos prenhas que a introdução de um análogo competitivo da L-arginina levou ao aparecimento de sinais de PE. (102) Kulandavelu *et al.* (2012), em um estudo com ratas com deficiência da eNOS, revelaram, além dos achados já estabelecidos em mulheres com PE (deficiência na redução da resistência vascular uterina) uma alteração na morfologia das artérias espiraladas e hipóxia placentária. (103) Espinoza *et al.* (2006)

propuseram a participação do NO na morfologia das artérias espiraladas. Essas artérias que normalmente apresentam uma camada fina ou ausente de músculo liso na gestação normal, tiveram essa camada muscular retida, menos alongada e tortuosa em ratas com deficiência da eNOS em relação ao grupo controle, o que contribui para o aparecimento da hipóxia placentária observada na PE. (104)

Sabe-se que a hipóxia reduz significativamente a transcrição gênica e a expressão do RNA mensageiro (RNAm) do fator de crescimento placentário (PGF) aumenta a expressão do receptor solúvel do PGF (sFlt-1) bem como do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). (105) O PGF e seu receptor sFlt-1 são proeminentemente expressos no trofoblasto humano. Quando os níveis de PGF e VEGF (liberado quando há lesão endotelial) estão elevados, o sFlt-1 se liga aos mesmos reduzindo, assim, os níveis circulantes desses fatores. Vários estudos mostraram, experimentalmente, que níveis elevados de sFlt-1 induzem sintomas semelhantes a PE (aumento da pressão arterial, proteinúria e lise endotelial glomerular) em modelos animais. (106-108) Groesch *et. al.* (2011) demonstraram que a inibição sistemática de NO com L-NAME em ratas aumentou os níveis de sFlt-1 e que a hipóxia materna reduziu os níveis de PGF, sugerindo que o mecanismo biológico de inibição de NO envolva o trofoblasto. Estes investigadores concluíram que a redução da produção de PGF pelas células trofoblásticas, concomitantemente ao aumento da produção de sFlt-1 no ambiente de hipóxia, podem atuar limitando a produção de NO e a função do trofoblasto. Sugeriram, também, que a redução do níveis de NO no trofoblasto faz com que predomine a liberação de fatores antiangiogênicos comprometendo, dessa forma, a formação placentária. (109)

Em um estudo recente na população brasileira, Brandão *et al.* (2012) avaliaram a função endotelial na PE pela técnica FMD. Essa técnica consiste na obtenção da imagem do vaso durante o menor momento de distensão, que corresponde a diástole cardíaca. Após uma condição de hipóxia (conseguida ao insuflar o manguito por cinco minutos até uma pressão superior a 250mmHg) é feita nova medida do diâmetro do vaso após 1 minuto. A diferença relativa, medida em porcentagem, do diâmetro do vaso pós oclusão e basal corresponde ao FMD. Nesse estudo 74 gestantes foram acompanhadas e dessas 15 desenvolveram PE. A medida da FMD foi realizada entre as semanas 24 e 27 de gestação e os valores de FMD foram significativamente menores nas gestantes que desenvolveram PE em

relação as gestantes normotensas, demonstrando assim, um comprometimento da função endotelial na PE. (110)

### **2.2.3 Polimorfismos do gene da sintase do NO endotelial (eNOS)**

A eNOS é uma enzima expressa predominantemente no endotélio e plaquetas. Ela é codificada por um gene com 26 éxons localizado no cromossomo 7q35 a 36 com tamanho de 21kb e que transcreve um RNAm com 4052 nucleotídeos. (111)

Alguns polimorfismos no gene da eNOS e sua relação com a PE foram descritos e vêm sendo estudados. Dentre esses, o polimorfismo G894T no *exon 7* que leva à substituição de uma guanina por uma timina, resultando na troca do aminoácido glutamato por aspartato na posição 298. (112) Outro polimorfismo descrito para o gene da eNOS é o VNTR (*variable number of tandem repeat*) b/a no *intron 4*, caracterizado pela repetição de uma sequência de 27 pb. (113) Finalmente, outro polimorfismo do gene da eNOS conhecido é o T-786C no qual há a troca de uma timina por uma citosina na posição 786 na região promotora do gene da eNOS. (113)

O polimorfismo G894T já foi associado ao desenvolvimento de várias doenças vasculares como a hipertensão, o infarto do miocárdio, a doença arterial coronariana, o espasmo coronariano e a PE, nas quais a biodisponibilidade do NO está reduzida. (114-117) Dessa forma, sugere-se que a presença do alelo 894T esteja relacionada à diminuição da biodisponibilidade do NO. Philip *et al.* (1999) demonstraram que a resposta ao vasoconstritor, fenilefrina estava relacionada ao número de alelos 894T, ou seja, em homozigose a vasoconstrição é maior que em heterozigose. (118) Além disso, foi demonstrado que a enzima eNOS sintetizada a partir do alelo 894T está sujeita a clivagem proteolítica nas células endoteliais. (119) Savidou *et al.* (2001), estudando a relação entre o polimorfismo G894T e o FMD em gestantes saudáveis, encontraram uma relação inversa entre FMD e a pressão arterial para aquelas com genótipo 894TT. Estes pesquisadores propuseram que o alelo 894T em homozigose leva à atenuação gradual da geração de NO, o que torna o endotélio mais suscetível à alteração da pressão arterial e, conseqüentemente a uma disfunção endotelial. (120)



Um estudo conduzido no Japão mostrou associação do alelo 894T e a ocorrência de PE grave. Neste estudo, o alelo 894T estava presente em 28,8% das mulheres com PE grave, enquanto essa frequência era 14,1% no grupo controle. (112) Estes pesquisadores demonstraram também uma relação desse mesmo polimorfismo e a presença de placenta abrupta, constatando que o alelo 894T pode causar vasoconstrição arteriolar resultando em isquemia placentária. (121)

Serrano *et al.* (2004) demonstraram que na população colombiana a presença do alelo 894T em homozigose foi associada ao risco de desenvolvimento de PE. Admitiram que o aumento da biodisponibilidade de NO seria o responsável pela vasodilatação materna, necessária para acomodar o aumento do volume circulatório durante a gravidez, sem o aumento da pressão e que na PE, essa adaptação estaria comprometida. (113)

Por outro lado, Landau *et al.* (2004) não encontraram associação entre o alelo 894T e a ocorrência de PE em mulheres brancas e hispânicas nos Estados Unidos. Da mesma forma, Turan *et al.* (2010) não encontraram tal relação ao estudarem gestantes turcas com PE e sem CIUR. Neste estudo, a frequência do alelo 894T foi 26,4% nas gestantes com PE e 18,5% nas gestantes normotensas. (122)

Em um estudo recente, na população brasileira, Sandrin *et al.* (2010), ao pesquisar a relação entre os polimorfismos G894T, VNTR b/a, e T-786C do gene da eNOS e as concentrações plasmáticas de nitrito, um metabólito do NO, não verificaram relação do polimorfismo G894T e o nitrito. Neste estudo, não foi verificada relação entre esses polimorfismos e a ocorrência de PE. Esses achados estão de acordo com aqueles já descritos anteriormente por esse mesmo grupo. (123, 124)

Uma meta-análise avaliando a associação entre o polimorfismo G894T do gene da eNOS e a ocorrência de PE identificou nove estudos envolvendo 1055 gestantes com PE e 1788 gestantes controles. Um valor de *odds ratio*, tendendo a uma associação positiva, para ambos os modelos de padrão de herança (recessivo e dominante), foi obtido. No entanto, esta associação não foi significativa. (125)

Avaliando o polimorfismo VNTR b/a, Tempfer *et al.* (2001) encontraram associação entre o mesmo e a PE. (126) Arngrímsson *et al.* (1997) sugeriram que o desequilíbrio de ligação do VNTR b/a com outro polimorfismo seria uma explicação plausível para alteração da síntese da eNOS. (127) Por outro lado, Zhang *et al.*

(2005) acreditam que o polimorfismo VNTR b/a levaria à diminuição dos níveis do RNAm, e conseqüentemente dos níveis da eNOS. (85) Níveis reduzidos de nitrito foram encontrados em gestantes normotensas do genótipo aa ao comparar com aquelas do genótipo bb para esse mesmo polimorfismo. (124)

Para o polimorfismo T-786C, em um estudo conduzido na Polônia, foi observada relação do alelo -786C e a ocorrência de PE. Nesse mesmo estudo foi encontrado aumento significativo da frequência do genótipo CC e do alelo -786C em gestantes com PE grave em relação às gestantes do grupo controle (128). Esses achados estão de acordo com aqueles encontrados pelo mesmo grupo de pesquisadores em um estudo anterior, porém incluindo todas as formas da PE. (129) Estudos *in vitro* demonstraram que a presença do alelo -786C no polimorfismo T-786C reduziria a atividade promotora do gene da eNOS em aproximadamente 50%. (130) Níveis elevados de nitrito foram identificados em gestantes normotensas com genótipo CC ao comparar com aquelas do genótipo TT para o polimorfismo T-786C. (124) No entanto, um estudo não encontrou alteração nos níveis de nitrito para esse polimorfismo. (131)

Chen *et al.* (2012) conduziram um estudo de meta-análise relacionando a presença dos três polimorfismos da eNOS e a ocorrência de PE. Identificaram 79 trabalhos publicados até junho de 2011 e 18 desses foram incluídos na meta-análise. Treze estudos analisaram o polimorfismo G894T e incluíam 1488 gestantes com PE e 2199 controles; nove analisaram o polimorfismo VNTR b/a com 1133 gestantes com PE e 1282 controles; e finalmente, seis estudos avaliaram o polimorfismo T-786C com 737 gestantes com PE e 1077 controles. Os estudos selecionados foram analisados de acordo com a população estudada (asiáticas e não asiáticas), sendo que treze avaliaram não asiáticas e seis, asiáticas. Na análise de alelos do polimorfismo G894T, nenhum estudo mostrou associação. Para a análise genotípica, uma relação positiva foi encontrada considerando o modelo recessivo de herança e para o modelo dominante uma relação negativa foi obtida. Para o polimorfismo VNTR b/a não foi encontrada associação na frequência alélica, sendo que para a frequência genotípica foi obtida uma relação negativa com o modelo dominante de herança. Finalmente, para o polimorfismo T-786C, nenhum estudo mostrou resultados significativos. Em suma, este estudo sugere que o genótipo TT do polimorfismo G894T e o genótipo aa do polimorfismo VNTR estão associados a um risco aumentado de ocorrência de PE. Dentre os 18 estudos

selecionados, quatro realizaram análise de haplótipo e a meta-análise mostrou que o haplótipo T-b-C está positivamente associado ao risco de PE. (132)

Dai *et al.* (2013) realizaram um recente estudo de meta-análise avaliando a associação dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C e a ocorrência de PE. Esses pesquisadores não encontraram associação entre o polimorfismo G894T e PE ao considerar os modelos dominante e recessivo de herança. Por outro lado, o genótipo aa (VNTR b/a) e TC e CC para o polimorfismo T-786C foram associados com a PE, nos modelos recessivo e dominante, respectivamente. (133)

Embora os estudos de meta-análise proporcionem respostas confiáveis dos resultados inconsistentes de estudos caso controle encontrados na literatura, a análise de haplótipo pode fornecer respostas biológicas muito mais relevantes. (134) A análise de haplótipo corresponde à análise das possíveis combinações de marcadores localizados no mesmo segmento cromossômico. (134) Dessa forma, este tipo de análise tem mais poder em estudos genéticos de associação do que a análise isolada dos polimorfismos. (135)

A análise de haplótipo para investigar a associação entre PE e os polimorfismos da eNOS já foi realizada em diferentes populações. Em um estudo na Colômbia, após construção dos haplótipos e estimativa de suas frequências entre casos e controles, foi observada uma diferença com significância global. Para a análise individual dos haplótipos, foi observado um risco aumentado de ocorrência de PE para o haplótipo T-b-C ao comparar com o selvagem G-b-T. (113) Da mesma forma, Díaz-Olguín *et al.* (2011) encontraram em mulheres mexicanas a associação do haplótipo T-b-C com a ocorrência de PE. Nessa mesma população, a frequência deste haplótipo foi maior ao comparar com as gestantes colombianas com PE (14,3% versus 9,3%, respectivamente). (136)

No Brasil, Sandrim *et al.* (2008) encontraram diferença na distribuição das frequências dos haplótipos dos três polimorfismos da eNOS ao comparar gestantes com PE e gestantes normotensas. Estes investigadores sugeriram que o haplótipo G-a-T é aparentemente protetor para a ocorrência da PE e o G-a-C aumenta o risco de ocorrência dessa doença. (123) Em outro estudo deste mesmo grupo, que investigou a relação entre a concentração de nitrito plasmática e os genótipos, foi encontrado nas gestantes normotensas com o haplótipo G-b-C níveis mais elevados de nitrito em relação às gestantes pré-eclâmpticas. (124) Em outro estudo de análise de haplótipo e tratamento anti-hipertensivo na PE, foi observado que os haplótipos

G-a-C e T-a-T foram associados à redução e a ausência da resposta ao tratamento, respectivamente. (137)

**3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar marcadores das vias metabólicas de síntese e inibição do óxido nítrico (NO) em gestantes que desenvolveram PE grave de início precoce e tardio.

### **3.2 Objetivos específicos:**

Nas gestantes com PE grave (formas precoce e tardia) e gestantes normotensas:

- Determinar e comparar a inibição competitiva da sintase do NO, por meio da determinação dos níveis plasmáticos de ADMA.
- Investigar e comparar a inibição da ativação plaquetária, por meio da determinação dos níveis de GMPc intraplaquetário.
- Determinar e comparar a frequência dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da eNOS e avaliar a relação dos mesmos com os níveis de GMPc intraplaquetário.
- Determinar e comparar a frequência dos haplótipos envolvendo estes polimorfismos.

## *4 MATERIAL E MÉTODOS*

## 4.1 Casuística

### 4.1.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais – ETIC 0530.0.203.00-09 (**ANEXO A**), Diretoria do Hospital Público Regional de Betim (HPRB)/Betim - Minas Gerais (**ANEXO B**), da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte – CEP 035/2009 (**ANEXO C**), do Hospital Municipal Odilon Behrens (HOB) – CEP 0681.0.000.216-11 (**ANEXO D**) e pela gerência da Unidade Básica de Saúde da Família (UBSF) Guanabara/ Betim que também concordou com o desenvolvimento do presente estudo nessa unidade de saúde (**ANEXO E**).

Este estudo foi também aprovado como um subprojeto de um projeto previamente aceito, sob o ponto de vista ético e formal, pelo NEP/ Maternidade Odete Valadares (MOV) / Belo Horizonte / Minas Gerais - Parecer FHEMIG: Nº 77/08, CAAE: 00.40.0.287.203-0 (**ANEXO F**).

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara, foi feito pelos pesquisadores, a todas as participantes envolvidas no estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido em todos os casos (**ANEXO G**). Uma ficha clínica contendo dados importantes para análise dos resultados foi preenchida em todos os casos (**ANEXO H**).

### 4.1.2 Seleção das integrantes do estudo

As participantes deste estudo foram distribuídas em três grupos:

Grupo I: Gestantes apresentando PE grave de início precoce (diagnóstico < 34<sup>a</sup>. semana de gestação)

Grupo II: Gestantes apresentando PE grave de início tardio (diagnóstico ≥ 34<sup>a</sup>. semana de gestação)

Grupo III: Gestantes normotensas

O número de participantes em cada grupo, de acordo com cada parâmetro avaliado no estudo, está apresentado na **Figura 3**. As gestantes dos grupos I e II



foram selecionadas na maternidade do HPRB, na MOV, no HOB e na Santa Casa de Misericórdia. As gestantes do grupo III foram selecionadas no posto de saúde UBSF Guanabara/Betim, no HOB e na Santa Casa de Misericórdia. Os dados clínicos e laboratoriais de interesse foram obtidos a partir do cartão de pré-natal e/ou prontuário médico.

**Figura 3 - Número de mulheres participantes do estudo de acordo com os grupos e parâmetros avaliados.**

	PE grave precoce	PE grave tardia	Gestantes normotensas
Determinação de ADMA plasmática	n=29	n=24	n=50
Determinação GMPC intra-plaquetário	n=34	n=24	n=61
Avaliação polimorfismos eNOS	n=53	n=45	n=103

#### **4.1.2.1 Critérios de inclusão**

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

- Mínimo de dois episódios de pressão sistólica/diastólica  $\geq$  160mmHg e/ou 110mmHg, medidos num intervalo de quatro horas e/ou;
- Proteinúria superior a 2g em urina de 24 horas e/ou maior que (++) , em amostras isoladas, pelo método semi-quantitativo de fita, conforme o protocolo clínico adotado nas maternidades e/ou;
- Sintomas (escotoma, epigastralgia, reflexo patelar, cefaleia);
- Aparecimento dos sintomas na idade gestacional inferior a 34 semanas

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

- Mínimo de dois episódios de pressão sistólica/diastólica  $\geq 160\text{mmHg}$  e/ou  $110\text{mmHg}$ , medidos num intervalo de quatro horas e/ou;
- Proteinúria superior a 2g em urina de 24 horas e/ou maior que (++) , em amostras isoladas, pelo método semi-quantitativo de fita, conforme o protocolo clínico adotado nas maternidades e/ou;
- Sintomas (escotoma, epigastralgia, reflexo patelar, cefaleia);
- Aparecimento dos sintomas na idade gestacional maior ou igual a 34 semanas

A classificação da doença como PE grave foi feita pela equipe obstétrica das maternidades envolvidas no estudo.

Para o grupo das gestantes normotensas (grupo III) os critérios de inclusão foram:

- Pressão sistólica/diastólica  $\leq 120/80\text{mmHg}$  e sem qualquer história de hipertensão ou PE;
- Ausência de proteinúria;
- Terceiro trimestre de gestação.

#### **4.1.2.2 Critérios de exclusão**

Os critérios de exclusão, comuns aos três grupos foram:

- Obesidade.
- Gestação múltipla.
- Presença de doenças intercorrentes como distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes e câncer.
- Trabalho de parto avançado.
- Presença de sangramento de qualquer natureza.

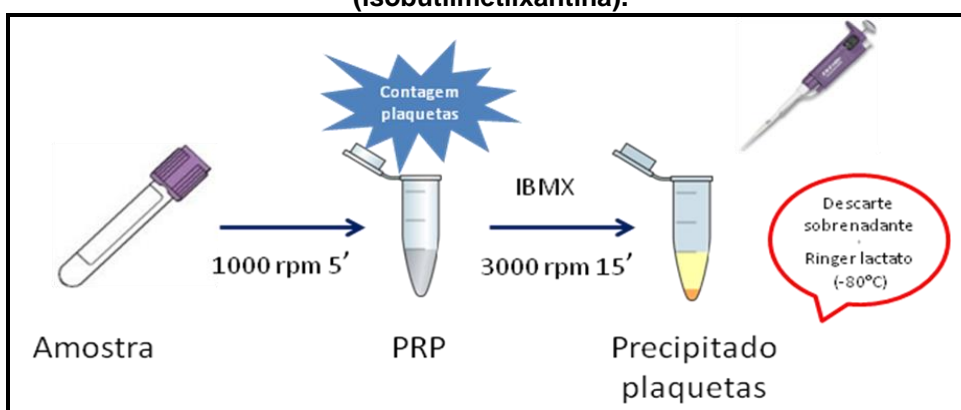
As integrantes dos três grupos avaliados foram pareadas segundo a idade.

### 4.1.3 Amostra biológica

Foram coletadas de cada participante do estudo, amostras de 5 mL de sangue venoso em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), diretamente em tubos do sistema *BD Vacutainer*<sup>®</sup> (*Becton Dickinson*), devidamente identificados.

A amostra colhida em EDTA foi imediatamente centrifugada por cinco minutos, a 1000 rpm, à temperatura ambiente (centrífuga FANEN<sup>®</sup>, São Paulo, SP), para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). A uma alíquota de 200 µL de PRP foram adicionados 50 µL de isobutilmetilxantina (IBMX) (inibidor da fosfodiesterase), na concentração final de 100 µM. Posteriormente, este tubo foi centrifugado juntamente com a amostra de sangue total em EDTA durante 15 minutos a 3000 rpm para obtenção do precipitado de plaquetas e do plasma em EDTA, respectivamente. Após desprezar o sobrenadante do precipitado de plaquetas, adicionou-se 100 µL da solução de Ringer lactato (meio para manter o precipitado de plaquetas). O plasma em EDTA e a alíquota do precipitado foram armazenados à temperatura de aproximadamente -80°C, onde permaneceram até o momento da realização da determinação de ADMA e de GMPc intraplaquetário (138-142) (**Figura 4**).

**Figura 4 - Esquema do preparo da amostra para obtenção do GMPc intraplaquetário. rpm (rotação por minuto), PRP (plasma rico em plaquetas), IBMX (isobutilmetilxantina).**



Das amostras colhidas em EDTA foi feita a extração de DNA (ácido desoxirribonucléico) para posterior investigação dos polimorfismos do gene da eNOS.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Determinação quantitativa de ADMA plasmática

A determinação quantitativa de ADMA foi realizada pela técnica de ELISA, utilizando o conjunto diagnóstico ADMA – ELISA DLD, Diagnostika GMBH® (Alemanha), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

O princípio do teste consiste na presença de moléculas de ADMA fixadas na superfície de uma placa, que competem com as moléculas de ADMA presentes no plasma (nas quais foi previamente adicionado um grupo acila) por uma quantidade determinada de anticorpos de coelhos anti-ADMA. Quando o sistema encontra-se em equilíbrio, antígenos (ADMA) livres e complexos antígenos-anticorpo são removidos por lavagens sucessivas. Os anticorpos ligados à fase sólida são detectados pela adição de um anticorpo anti-anticorpo de coelho ligado à peroxidase. A revelação é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase com o substrato TMB (perborato 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se amarela. A intensidade da cor produzida foi determinada fotometricamente no leitor de microplacas VersaMax *Microplate Reader* - MOLECULAR DEVICES (EUA) em 450nm e é inversamente proporcional à concentração de ADMA na amostra.

A faixa dos valores de referência da ADMA plasmática, fornecido pelo fabricante, é de 0,4 – 0,75  $\mu\text{mol/L}$  (80 – 150  $\text{ng/mL}$ ). No entanto, o mesmo recomenda que cada laboratório determine a sua faixa de normalidade.

### 4.2.2 Determinação quantitativa do GMPc intraplaquetário

A determinação quantitativa do GMPc intraplaquetário foi realizada por técnica de ELISA (*enzyme linked immune assay*), utilizando conjunto diagnóstico da Amersham® (Inglaterra), protocolo de acetilação.

No dia do ensaio, as alíquotas de precipitado de plaquetas, previamente preparadas nos dias das coletas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  do reagente de lise (para hidrolisar as membranas das plaquetas e liberar o GMPc intracelular) e agitadas no vórtex durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-

se 50 µL do reagente de acetilação e misturou-se por 5 minutos. A acetilação consiste na adição de grupamento acetila na molécula de GMPc, a fim de promover uma alteração na conformação da molécula tornando-a maior e, facilitando o reconhecimento pelo anticorpo anti-GMPc, aumentando, dessa forma, a sensibilidade do teste (2 fmol/poço).

O princípio do teste consiste na presença de anticorpos obtidos de macacos (anti-GMPc de coelhos) fixados na superfície da placa de ELISA. O GMPc acetilado da amostra compete com uma quantidade fixa de moléculas de GMPc ligados à peroxidase, por um número limitado de sítios de ligação dos anticorpos anti- GMPc. Quando o sistema encontra-se em equilíbrio, antígenos (GMPc) livres e complexados a anticorpos são removidos por lavagens sucessivas. A revelação é feita pela determinação da reação da enzima peroxidase com o substrato TMB (perborato 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Esta reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se amarela. A intensidade da cor produzida foi determinada fotometricamente no leitor de microplacas VersaMax *Microplate Reader* - MOLECULAR DEVICES (EUA) em 450 nm e é inversamente proporcional à concentração de GMPc na amostra.

### **4.2.3 Análise Molecular**

#### **4.2.3.1 Extração de DNA**

As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em frasco estéril com EDTA, e o DNA genômico foi extraído utilizando-se o conjunto de reagentes BIOPUR mini spin®, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Uma alíquota de 200 µL da amostra de sangue total foi transferida para um tubo *tipo Eppendorf*® de 1,5 mL e incubada com 200 µL de solução de lise celular (tampão A) e 20 µL de proteinase K. Agitou-se bem em vórtex por 5 segundos. Os tubos foram incubados por 15 minutos, à 56°C, agitando em vórtex a cada três minutos. Após adição de 400 µL de tampão B6 de ligação e homogeneização, transferiu-se a mistura para o tubo spin e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.900 rpm, durante dois minutos em centrífuga SIGMA® modelo 2K15 (Alemanha). O filtrado foi descartado e o tubo spin foi colocado em novo tubo de reação de 2 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem I e

centrifugado a 12.900 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado e adicionou-se 800 µL de tampão de lavagem II. Após um minuto de centrifugação a 12.900 rpm o filtrado foi novamente descartado e o tubo spin centrifugado por mais quatro minutos a 14.000 rpm para remoção completa do etanol. Finalmente, foram adicionados 100 µL de tampão de eluição pré-aquecido a 56°C, incubado à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado por um minuto a 10.000 rpm. O tubo spin foi descartado e as amostras armazenadas à -20°C até as análises.

#### **4.2.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

O DNA extraído das amostras de sangue de todas as participantes do estudo foi submetido à investigação da presença dos polimorfismos no gene da eNOS (G894T, VNTR b/a e T-786C). As metodologias foram padronizadas para este estudo no laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG e foram empregados oligonucleotídeos iniciadores e condições de reação previamente descritas (123, 143, 144). Na reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes: oligonucleotídeos iniciadores (IDT®), desoxirribonucleotídeos (Fermentas®), tampão (Dream taq Buffer 10X- Fermentas®) e Taq polimerase (Fermentas®). As reações foram realizadas para um volume final de 15 µL em termociclador MJ Research® modelo PT 100 (EUA) (G894T) e Amplitherm® (EUA) (VNTR b/a e T-786C). As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada uma das mutações investigadas estão listadas no **Quadro 1**.

**Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados nas PCR, para amplificação dos segmentos genômicos específicos.**

<b>Mutação</b>	<b>Óligo senso</b>	<b>Óligo antisenso</b>
G894T <sup>1</sup>	5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3'	5'-AGTCAATCCCTTGGTGCTCAC-3'
VNTR b/a <sup>2</sup>	5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3'	5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'
T-786C <sup>2</sup>	5'-TGGAGAGTGCTGGTGTACCCCA-3'	5'-GCCTCCACCCCCACCCTGTC-3'

(143)<sup>1</sup>; (144)<sup>2</sup>.

O número de ciclos, concentração dos reagentes e temperatura de anelamento foram padronizados para cada segmento genômico a ser amplificado

com o objetivo de se obter uma boa amplificação, com o mínimo de inespecificidade. As condições padronizadas se encontram nos **Quadros 2 e 3**.

**Quadro 2 - Quantidade dos reagentes utilizados nas PCR.**

Reagentes	G894T	VNTR b/a	T-786C
Tampão 10X	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
dNTP (400 mM/mL)	1,5 µL	1,5 µL	1,5 µL
Óligo senso (10 µM)	0,5 µL	1,0 µL	1,0 µL
Óligo antisenso (10 µM)	0,5 µL	1,0 µL	1,0 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,15 µL	0,15 µL	0,15 µL
DNA (35 ng/µL)	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
Água q.s.p.	15 µL	15 µL	15 µL

dNTP: desoxirribonucleotídeos; q.s.p.: quantidade suficiente para.

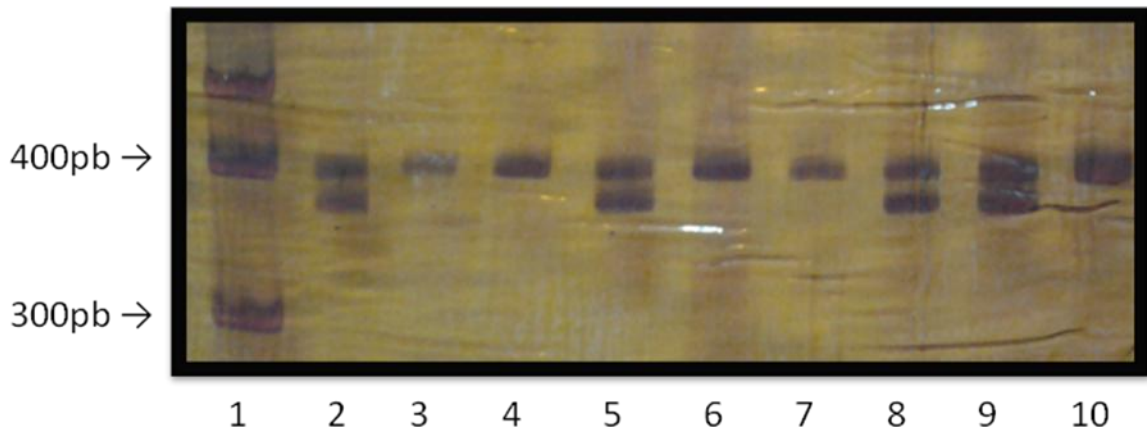
**Quadro 3 - Programa de PCR utilizados para amplificação das regiões gênicas de interesse.**

Etapas	G894T	VNTR b/a	T-786C
Desnaturação prévia	95° - 5 min	94° - 4 min	94° - 4 min
Desnaturação	95° - 1 min	94° - 30 seg	94° - 30 seg
Anelamento	63° - 1 min	63° - 30 seg	65° - 30 seg
Extensão	72° - 1 min	72° - 1 min	72° - 1 min
Nº de ciclos	30 ciclos	35 ciclos	35 ciclos
Extensão final	72° - 5 min	72° - 5 min	72° - 5 min

Nº: número; min: minutos; seg: segundos.

Após amplificação, foi obtido um fragmento de 206 pares de bases (pb) e 180 pb para avaliação dos polimorfismos G894T e T-786C, respectivamente. Para avaliação do genótipo VNTR b/a foram obtidos fragmentos de 420 pb (genótipo bb) ou 393 pb (genótipo aa) ou ambos (genótipo ab), conforme ilustra a **Figura 5**.

**Figura 5 - VNTR b/a. Fragmentos obtidos após realização da PCR.**



1 - Padrão de peso molecular.

2, 5, 8 e 9 - Perfil de bandas de indivíduo de genótipo ab (393 e 420 pb).

3, 4, 6, 7, 10 - Perfil de bandas de indivíduo de genótipo bb (420pb).

#### **4.2.3.2 Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)**

Após amplificação do segmento específico, uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da reação de amplificação foi digerida com endonuclease de restrição específica, sendo incubada com 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima de restrição à 37°C por no mínimo 8 horas. As condições foram padronizadas de acordo com protocolos já descritos e se encontram no **Quadro 4**. (123, 143, 144)

**Quadro 4 - Condições de digestão enzimática para detecção dos polimorfismos G894T e T-786C.**

Reagente	Concentração de uso	
	G894T	T-786C
Tampão da enzima 10X	1,5 $\mu\text{L}$ (Tango10X)	1,5 $\mu\text{L}$ (tampão B)
Enzima de restrição (10 u/ $\mu\text{L}$ )	<i>Mbo</i> I 5U	<i>Msp</i> I 5U
Produto de PCR	3,0 $\mu\text{L}$	5,0 $\mu\text{L}$
Água q.s.p.	15 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$

q.s.p.: quantidade suficiente para

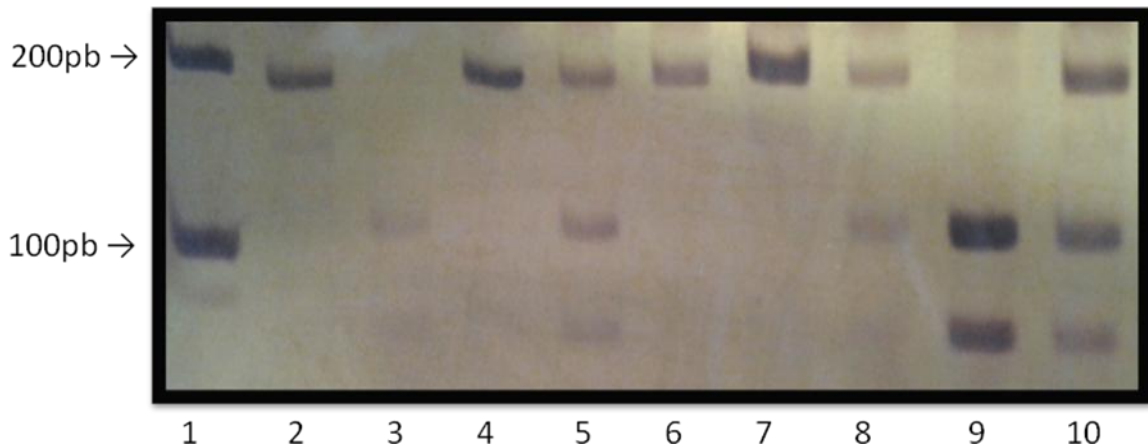
O resultado da digestão foi analisado em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata. Para o genótipo de G894T, obtido após a digestão pela enzima



*Mbol* (Fermentas®) (**Figura 6**), a presença da sequência GATC, ou seja, do alelo 894T, cria um sítio para a enzima de restrição no fragmento amplificado. Os indivíduos que não possuem este alelo apresentam apenas uma banda na mesma altura do produto amplificado (206pb). O perfil de indivíduos homozigotos para o alelo 894T é evidenciado pela presença de dois fragmentos de 119pb e 87pb. Indivíduos heterozigotos apresentam os três fragmentos.

Para o polimorfismo T-786C, após digestão pela enzima de restrição *MspI* (Promega®), são gerados dois grupos de fragmentos de tamanhos variados. Caso esteja presente o alelo selvagem (-786T), observam-se fragmentos de 140 pb e 40 pb (não visualizado, pois é perdido durante a corrida do gel). Por outro lado, se o alelo -786C estiver presente, observam-se fragmentos de 90 pb, 50pb e 40pb (os dois últimos não são visualizados, pois são perdidos durante a corrida do gel), conforme ilustrado na **Figura 7**.

**Figura 6 - G894T. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonuclease de restrição.**



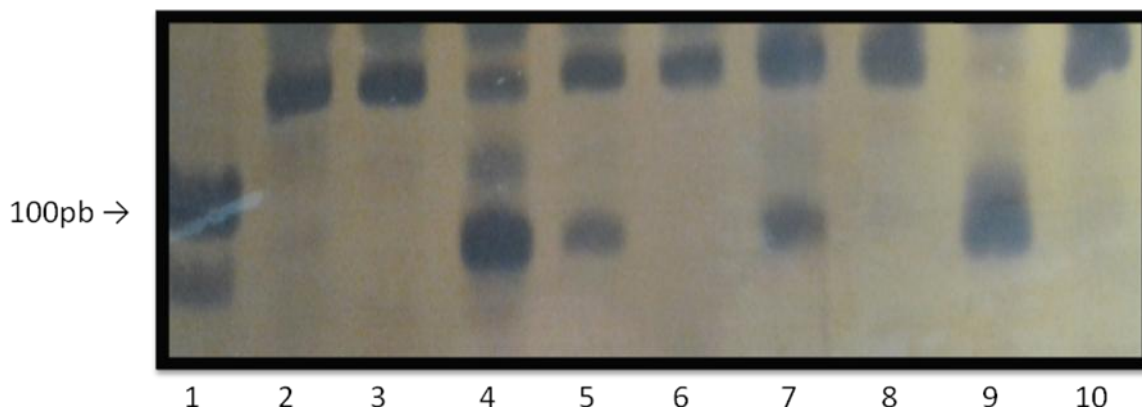
1 - Padrão de peso molecular.

2, 4, 6 e 7 - Perfil de bandas de indivíduo homozigoto para o alelo selvagem 894G (206pb).

3, e 9 - Perfil de bandas de um indivíduo homozigoto para o alelo 894T (119 e 87pb).

5, 8 e 10 - Perfil de bandas de um indivíduo heterozigoto (206, 119 e 87pb).

**Figura 7 - T-786C. Fragmentos obtidos após realização da PCR e digestão com endonuclease de restrição.**



1 - Padrão de peso molecular.

2, 3, 6, 8 e 10 - Perfil de bandas de indivíduo homocigoto selvagem; genótipo TT (140 e 40pb). O fragmento de 40pb não é visualizado no gel.

9 - Perfil de bandas de um indivíduo com o genótipo CC (90, 50 e 40pb). Os fragmentos de 50 e 40pb não são visualizados no gel.

4, 5 e 7 - Perfil de bandas de um indivíduo com o genótipo TC (140, 90, 50 e 40pb). Os fragmentos de 50 e 40pb não são visualizados no gel.

### 4.3 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o programa SPSS (versão 13.0). A normalidade dos dados foi testada pelo método *Shapiro-Wilk*. A comparação das medianas das variáveis contínuas (ADMA e GMPc) para os três grupos foi feita pelo teste de *Kruskal-Wallis*. A comparação dos resultados entre dois grupos foi feita pelo método de *Mann-Whitney* com correção de Bonferroni ( $p < 0.05 / \text{número de comparações (3)} = p < 0,017$ ). A comparação das variáveis categóricas (polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C) foi feita pelo teste do qui-quadrado de Pearson assintótico ( $\chi^2$ ). Quando  $p < 0,05$  fez-se a análise do resíduo ajustado a fim de identificar onde se encontrava a diferença. Foi verificado se as populações estavam sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando-se o programa genepop (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Por regressão logística binária obteve-se a *Odds ratio* e o intervalo de confiança, visando comparar a distribuição das frequências genotípicas, considerando como modelo os padrões dominante e recessivo de herança. Objetivando investigar a correlação entre os polimorfismos

G894T, VNTR b/a e T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário foi utilizada a correlação de *Spearman*.

Para análise de haplótipos foi utilizada a última versão do PHASE v 2.1 <http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html> (145). Os valores das frequências encontrados para cada haplótipo em cada grupo foram comparados pelo teste do qui-quadrado de Pearson assintótico ( $\chi^2$ ).

Inicialmente, foi investigada por análise univariada, a associação entre a ocorrência de PE grave e as variáveis explicativas (parâmetros clínicos, ADMA, GMPc e polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS). Para a variável idade foi utilizado valor de  $\leq 15$  e  $\geq 35$  como ponto de corte para risco de PE grave e idade entre 15 e 35 anos como ausência de risco de PE grave. Para a variável gravidez, as gestantes primigestas foram consideradas como risco de PE grave e gestantes não primigestas como ausência de risco de PE grave. Para as variáveis ADMA e GMPc intraplaquetário, foram considerados como ponto de corte os valores das medianas encontradas para um grupo de mulheres sadias, não gestantes e em idade fértil (0,52  $\mu\text{mol/L}$  e 1,23  $\text{fmol/plaquetas} \times 10^6$ , respectivamente). Para ADMA, níveis maiores ou iguais a 0,52  $\mu\text{mol/L}$  foram considerados como risco de PE e níveis menores como ausência de risco. Para o GMPc, níveis maiores ou iguais a 1,23  $\text{fmol/plaquetas} \times 10^6$  foram considerados como ausência de risco e níveis menores foram considerados como risco de PE grave. Para os polimorfismos foram considerados riscos ausente, intermediário e aumentado, para a ocorrência de PE grave, a presença dos genótipos nas formas selvagem, heterozigota e homozigota, respectivamente. Posteriormente, as variáveis que seguiram o critério  $p < 0,20$ , foram avaliadas por regressão logística multivariada.

Foram consideradas como diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ .



## 5.1 Distribuição das participantes do estudo de acordo com local onde foram selecionadas

A **Tabela 1** ilustra a distribuição das participantes do estudo de acordo com o local onde foram selecionadas.

**Tabela 1 - Distribuição das participantes do estudo de acordo com a maternidade onde foram selecionadas.**

<b>Maternidades</b>	<b>PE grave precoce (n = 53)</b>	<b>PE grave tardia (n = 45)</b>	<b>Gestantes Normotensas (n = 103)</b>
MOV	41(77%)	31(69%)	-
HPRB	11(21%)	11(24%)	-
Santa Casa	01(2%)	02(5%)	05(5%)
HOB	-	01(2%)	12(12%)
UBSF Guanabara	-		86(83%)

MOV: Maternidade Odete Valadares; HPRB: Hospital Público Regional de Betim; HOB: Hospital Municipal Odilon Behrens UBSF: Unidade Básica de Saúde da Família.

## 5.2 Características clínicas dos grupos avaliados

As características clínicas das gestantes com PE grave precoce, PE grave tardia e normotensas (grupos I, II e III, respectivamente) estão apresentadas na

**Tabela 2.**

**Tabela 2 - Características clínicas das participantes do estudo.**

Características clínicas	PE grave precoce (n = 53)	PE grave tardia (n = 45)	Gestantes normotensas (n = 103)	p
Idade (anos)	26 (21-32)	25 (21-32)	24 (20-29)	0,418 <sup>d</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	23 (21-28)	24 (22-30)	24 (21-27)	0,650 <sup>d</sup>
IG (sem)	31 (30-32)	36 (35-38)	33(30-36)	<0,001 <sup>a,b,c</sup>
GPG (Kg)	12 (7-15)	14 (9-17)	10(7-14)	0,007 <sup>*d</sup> 0,073 <sup>a</sup> 0,151 <sup>b</sup> 0,002 <sup>*c</sup>
% Primigestas	49,0	53,3	41,7	0,384 <sup>d</sup>
PA sist. (mmHg)	170 (160-180)	170 (160-180)	110 (100-110)	<0,001 <sup>**d</sup> 0,947 <sup>a</sup> <0,001 <sup>**b,c</sup>
PA diast. (mmHg)	110 (100-118)	110 (100-118)	70 (70-70)	<0,001 <sup>**d</sup> 0,781 <sup>a</sup> <0,001 <sup>**b,c</sup>

IMC: Índice de massa corporal; IG: idade gestacional diagnóstico/coleta; sem: semanas; GPG: ganho de peso na gestação; PA: pressão arterial; sist: sistólica; diast: diastólica.

\*p<0,05; \*\*p<0,017 (Correção de Bonferroni). Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney/Kruskal-Wallis*).

<sup>a</sup>: grupos: precoce x tardia ; <sup>b</sup>: grupos: precoce x normotensas; <sup>c</sup>: grupos: tardia x normotensas; <sup>d</sup>: grupos: precoce x tardia x normotensas.

As características clínicas das participantes dos grupos I, II e III foram obtidas nos prontuários médicos, no cartão de pré-natal e durante a entrevista.

A comparação da idade das integrantes dos três grupos revelou que não houve diferença significativa entre as medianas obtidas (p=0,418). Não foi encontrada diferença comparando-se o índice de massa corporal nos três grupos (p=0,650).

A idade gestacional foi diferente comparando-se os grupos dois a dois (p<0,001).

O ganho de peso na gestação foi superior no grupo II, em relação ao grupo III (p=0,002). Não foi observada diferença na comparação entre os outros grupos.

Nenhuma mulher apresentou histórico de perda gestacional ou aborto. O número de gestantes primigestas não foi diferente ao comparar os três grupos ( $p=0,384$ ).

Conforme esperado, por ser um critério de inclusão, os valores da pressão sistólica ( $p<0,001$ ) e da pressão diastólica ( $p<0,001$ ) foram diferentes comparando-se os grupos PE grave precoce/tardia e gestantes normotensas, sendo mais elevados no grupo com PE grave precoce/tardia.

### **5.3 Avaliação dos parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave precoce e PE grave tardia**

Os parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave precoce/tardia, obtidos a partir dos prontuários médicos, estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3 - Parâmetros laboratoriais das gestantes com PE grave precoce e tardia.**

Parâmetros	PE grave precoce (n = 53)	PE grave tardia (n = 45)	p
Nº de hemácias x 10 <sup>6</sup> /mL	4,1 (0,5)	4,0 (0,5)	0,656
Hemoglobina (g/dL)	12,3* (11,4-12,8)	11,6* (10,8-12,5)	0,079
Hematócrito (%)	37,1* (35,1-39,0)	35,6* (33,8-36,7)	0,035**
Nº de plaquetas x 10 <sup>3</sup> /mL	179,5 (68,3)	191,0 (77,6)	0,315
AST (U/L)	24,0* (20,0-34,5)	24,5* (17,0-31,0)	0,409
ALT (U/L)	19,5* (12,5-27,5)	15,0* (10,0-26,0)	0,299
Ácido Úrico (mg/dL)	5,6 (1,2)	5,3(1,5)	0,245
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,30* (0,27-0,66)	0,33* (0,29-0,44)	0,606
Bilirrubina Direta (mg/dL)	0,15* (0,10-0,30)	0,33* (0,03-0,10)	0,004**
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	0,20* (0,10-0,40)	0,28* (0,20-0,37)	0,527
LDH (U/L) (Piruvato→Lactato)	453* (367-616) (n=41)	414* (311-567) (n=31)	0,162
LDH (U/L) (Lactato→Piruvato)	281* (185-461) (n=11)	242* (208-274) (n=11)	0,563
Proteinúria (g/24hrs)	3,52 (2,54)	3,72 (2,74)	0,915
Proteinúria fita <sup>1</sup>			
Negativa	01 (2%)	01(2%)	-
Positiva			
+	02 (4%)	03(7%)	-
++	06 (11%)	08(18%)	-
+++	08 (15%)	10(22%)	-
++++	14 (27%)	09(20%)	-

Nº: número; AST: aspartato amino transferase; ALT: alanina amino transferase; LDH: desidrogenase láctica.

\*Dados apresentados como mediana (intervalo interquartil). Para as variáveis que seguem a normalidade dados são apresentadas como média e desvio padrão (DP). <sup>1</sup> Números absolutos.

\*\*p<0,05 (*Mann-Whitney e teste t*).

Os parâmetros do hemograma, as enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), a bilirrubina, bem como o ácido úrico não mostraram diferenças entre os grupos, exceto o hematócrito que foi maior no grupo PE grave precoce e a bilirrubina direta que foi maior no grupo de PE grave tardia (p=0,035 e p=0,004, respectivamente). A avaliação da atividade da LDH foi realizada pelos métodos de conversão de piruvato a lactato (faixa referência: 200-480 u/L) e de lactato a piruvato (faixa referência 125-220 u/L) As medianas da atividade da desidrogenase láctica (LDH) não foram diferentes entres os grupos, porém foram maiores que a faixa de referência para o método lactato a piruvato em



ambos os grupos. O valor de proteinúria estava acima da faixa de referência deste parâmetro (<0,15) (**Tabela 3**).

Com relação à sintomatologia clínica do grupo de gestantes com PE grave precoce, 34 gestantes (64%) relataram sintomas, sendo que 28 gestantes (82%) relataram cefaleia, 14 (41%) epigastralgia, 07 (21%) escotoma e 08 (24%) reflexo patelar aumentado. Com relação à presença de edema, esse foi observado, em graus variados em 21 gestantes (40%), sendo + em 06 gestantes (29%), ++ em 07 (33%), +++ em 07 (33%), e ++++ em 01 (5%).

A terapia anti-hipertensiva utilizada em 52 gestantes (98%) incluiu nifedipina em 41 gestantes (79%), metildopa em 26 (50%) e hidralazina em 01 (02%). Para a prevenção das crises convulsivas, foi utilizado sulfato de magnésio em 13 gestantes (25%) e para induzir a maturação pulmonar do feto, visando à interrupção da gestação, foi administrado corticoide (betametasona ou dexametasona ou beclometasona) a 32 gestantes (62%).

Apesar da internação hospitalar e tentativa terapêuticas de controle da hipertensão e das convulsões, cinco gestantes com PE grave precoce (9%) evoluíram para síndrome HELLP e uma para eclâmpsia (2%).

No grupo de gestantes com PE grave tardia, 25 gestantes (56%) relataram sintomas, sendo que 23 gestantes (92%) relataram cefaleia, 08 (32%) epigastralgia, 07 (28%) escotoma e 01 (04%) reflexo patelar aumentado. Com relação à presença de edema, esse foi observado, em graus variados em 17 (38%) gestantes, sendo + em 02 gestantes (12%), ++ em 07 (41%), +++ em 05 (29%) e edema generalizado (anasarca) em 03 (18%).

A terapia anti-hipertensiva utilizada em 38 gestantes (84%) incluiu nifedipina em 24 gestantes (63%), metildopa em 15 (39%) e hidralazina em 07 (18%). A prevenção das crises convulsivas foi feita com sulfato de magnésio em 17 gestantes (38%) e a indução da maturação pulmonar do feto, visando à interrupção da gestação, foi feita com corticoide (betametasona ou dexametasona ou beclometasona) a 03 gestantes (07%).

Apesar da internação hospitalar e tentativa terapêuticas de controle da hipertensão e das convulsões, três gestantes com PE grave tardia (7%) evoluíram para síndrome HELLP e duas para eclâmpsia (4%).

#### 5.4 Avaliação quantitativa de ADMA plasmática

Os valores de ADMA plasmática para os três grupos estão apresentados na **Tabela 4**.

**Tabela 4 - Valores de ADMA plasmática obtidos para os grupos avaliados.**

	<b>PE grave precoce (n = 29)</b>	<b>PE grave tardia (n = 24)</b>	<b>Gestantes normotensas (n = 50)</b>	<b>p</b>
ADMA ( $\mu\text{mol/L}$ )	0,66(0,52-0,78)	0,47(0,42-0,60)	0,48(0,42-0,58)	<0,001 <sup>*a</sup> <0,001 <sup>*b</sup> 0,840 <sup>c</sup>

\* $p < 0,017$  (correção de Bonferroni). Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney*).

<sup>a</sup>: grupos: precoce x tardia ; <sup>b</sup>: grupos precoce x normotensas; <sup>c</sup>: grupos tardia x normotensas.

A concentração de ADMA plasmática foi maior nas gestantes com PE grave precoce em relação às gestantes com PE grave tardia ( $p < 0,001$ ). O mesmo ocorreu ao comparar o grupo de gestantes com PE grave precoce com o grupo de gestantes normotensas ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença comparando-se os níveis de ADMA das gestantes com PE grave tardia e gestantes normotensas ( $p = 0,840$ ).

#### 5.5 Avaliação quantitativa de GMPc intraplaquetário

Os valores de GMPc intraplaquetário para as gestantes com PE grave precoce, PE grave tardia e normotensas estão apresentados na **Tabela 5**.

**Tabela 5 - Valores de GMPc intraplaquetário obtidos para os grupos avaliados.**

	<b>PE grave precoce (n = 34)</b>	<b>PE grave tardia (n = 24)</b>	<b>Gestantes normotensas (n = 61)</b>	<b>p</b>
<b>GMPc</b>				0,273 <sup>a</sup>
(fmol/plaquetas * 10 <sup>6</sup> )	1,83(0,85-3,27)	2,80(1,20-4,23)	1,46(0,97-3,11)	0,813 <sup>b</sup> 0,130 <sup>c</sup>

Os dados não-paramétricos são apresentados como mediana (intervalo interquartil) (*Mann-Whitney*).

<sup>a</sup>: grupos: precoce x tardia ; <sup>b</sup>: grupos: precoce x normotensas; <sup>c</sup>: grupos: tardia x normotensas.

Os níveis de GMPc intraplaquetário não foram diferentes comparando-se os grupos dois a dois.

### 5.6 Avaliação dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS

As populações mostraram-se sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto aquela referente ao polimorfismo G894T do grupo de PE grave tardia, como representado na **Tabela 6**.

**Tabela 6 - Equilíbrio de Hardy – Weinberg para as populações estudadas (valores de p).**

<b>Polimorfismo</b>	<b>PE grave precoce (n = 53)</b>	<b>PE grave tardia (n = 45)</b>	<b>Gestantes normotensas (n = 103)</b>
G894T	0,734	0,009*	0,231
VNTR b/a	1,000	0,666	0,036
T-786C	0,338	0,495	0,583

\*p<0,025

A **Tabela 7** mostra as frequências alélicas e genotípicas de cada polimorfismo do gene da eNOS para os grupos PE grave precoce/tardia e gestantes normotensas.

**Tabela 7 - Distribuição e comparação das frequências alélicas e genotípicas nos grupos avaliados.**

<b>Genótipo</b>	<b>PE grave precoce (n = 53)</b>	<b>PE grave tardia (n = 45)</b>	<b>Gestantes normotensas (n = 103)</b>	<b>p</b>
<b>G894T</b>				
G	77(0,73)	59(0,66)**	163(0,79)***	0,043*
T	29(0,27)	31(0,34)***	43(0,21)**	
GG	27(0,51)	23(0,51)	62(0,60)	0,002*
GT	23(0,43)	13(0,29)	39(0,38)	
TT	03(0,06)	09(0,20)***	02(0,02)**	
<b>VNTR b/a</b>				
b	68(0,64)**	72(0,80)	162(0,79)	0,009*
a	38(0,36)***	18(0,20)	44(0,21)	
bb	22(0,42)	28(0,62)	60(0,58)	0,004*
ab	24(0,45)	16(0,36)	42(0,41)	
aa	07(0,13)***	01(0,02)	01(0,01)	
<b>T-786C</b>				
T	74(0,70)	62(0,69)	158(0,77)	0,252
C	32(0,30)	28(0,31)	48(0,23)	
TT	24(0,45)	20(0,44)	59(0,57)	0,528
TC	26(0,49)	22(0,49)	40(0,39)	
CC	03(0,06)	03(0,07)	04(0,04)	

<sup>1</sup>Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico. \* p<0,05; \*\*<-1,96, grupo menos frequente; e \*\*\*>1,96, grupo mais frequente. Análise de resíduo ajustado

Diferenças foram obtidas nas frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo G894T (p=0,043 e p=0,002, respectivamente) e VNTR b/a (p=0,009 e p=0,004, respectivamente) quando comparados os três grupos (**Tabela 7**). Após análise de resíduo ajustado, foi constatado que a diferença ocorreu em função das maiores frequências de gestantes com alelo 894T e genótipo TT no grupo de PE grave tardia em relação às gestantes normotensas. Para o polimorfismo VNTR b/a as frequências do alelo a e genótipo aa foram maiores no grupo de gestantes com PE grave precoce. Por outro lado, as frequências alélicas e genotípicas dos três grupos, para o polimorfismo T-786C, foram semelhantes (p=0,252 e p=0,528, respectivamente).

Uma vez que não é conhecido o padrão de herança genético destes polimorfismos, bem como se esses podem determinar diferentes níveis da enzima eNOS, a comparação das frequências genotípicas foi feita considerando o padrão recessivo e dominante, como mostram as **Tabelas 8 a 13**.

**Tabela 8 - Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão recessivo de herança: homozigoto vs (heterozigoto + selvagem) entre os grupos PE grave precoce e PE grave tardia.**

Polimorfismos	OR	IC (95%)	p
G894T	0,24	0,06-0,95	0,042*
VNTR b/a	6,70	0,79-56,66	0,081
T-786C	0,84	0,16-4,38	0,836

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança \*  $p < 0,05$  (Regressão logística binária).

**Tabela 9 - Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão recessivo de herança: homozigoto vs (heterozigoto + selvagem) entre os grupos PE grave precoce e gestantes normotensas.**

Polimorfismos	OR	IC (95%)	p
G894T	3,03	0,49-18,72	0,233
VNTR b/a	15,52	1,86-129,83	0,011*
T-786C	1,49	0,32-6,89	0,614

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança \*  $p < 0,05$  (Regressão logística binária).

**Tabela 10 - Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão recessivo de herança: homozigoto vs (heterozigoto + selvagem) entre os grupos PE grave tardia e gestantes normotensas.**

Polimorfismos	OR	IC (95%)	p
G894T	12,63	2,60-61,21	0,002*
VNTR b/a	2,32	0,14-37,90	0,555
T-786C	1,77	0,38-8,25	0,468

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança \*  $p < 0,05$  (Regressão logística binária).

Ao comparar a distribuição das gestantes com PE grave precoce vs PE grave tardia; PE grave precoce vs gestantes normotensas e PE grave tardia vs gestantes normotensas, de acordo com o genótipo, considerando como modelo o padrão recessivo de herança, homozigotas vs (heterozigotas + selvagem), verificou-se maior frequência de mulheres homozigotas no grupo de PE grave precoce vs

gestantes normotensas e no grupo de PE tardia vs gestantes normotensas para o polimorfismo G894T ( $p=0,042$  e  $p=0,002$ , respectivamente). A frequência de mulheres homozigotas no grupo de PE grave tardia também foi superior em relação a gestantes normotensas, para o polimorfismo VNTR b/a. Além disso, observou-se que os genótipos TT e aa conferiram uma chance 12,63 e 15,52 vezes maiores, respectivamente, de desenvolvimento de PE grave tardia e PE grave precoce, considerando como modelo o padrão recessivo de herança. Para o polimorfismo T-786C não foi observada diferença de distribuição de frequência ao comparar os grupos dois a dois, de acordo com este padrão de herança (**Tabelas 8 a 10**).

**Tabela 11 - Comparação das frequências genótípicas considerando como modelo o padrão dominante de herança: (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem entre os grupos PE grave precoce e PE grave tardia.**

Polimorfismos	OR	IC (95%)	p
G894T	1,00	0,45-2,22	0,987
VNTR b/a	2,32	1,03-5,24	0,042*
T-786C	0,97	0,43-2,15	0,934

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança. (Regressão logística binária).

**Tabela 12 - Comparação das frequências genótípicas considerando como modelo o padrão dominante de herança: (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem entre os grupos PE grave precoce e gestantes normotensas.**

Polimorfismos	OR	IC (95%)	p
G894T	1,46	0,75-2,84	0,270
VNTR b/a	1,97	1,00-3,85	0,049*
T-786C	1,62	0,83-3,16	0,156

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança. (Regressão logística binária).

**Tabela 13 - Comparação das frequências genotípicas considerando como modelo o padrão dominante de herança: (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem entre os grupos PE grave tardia e gestantes normotensas.**

Polimorfismos	OR	IC (95%)	p
G894T	1,45	0,72-2,93	0,305
VNTR b/a	0,85	0,41-1,74	0,651
T-786C	1,68	0,83-3,40	0,151

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança. (Regressão logística binária).

Ao considerar como modelo o padrão dominante de herança (homozigoto + heterozigoto) vs selvagem, foi observada maior frequência dos genótipos aa e ab para o polimorfismo VNTR b/a ao comparar os grupos PE grave precoce vs PE grave tardia, bem como os grupos PE grave precoce vs gestantes normotensas ( $p=0,042$ , e  $p=0,049$ , respectivamente). Para os polimorfismos G894T e T-786C a distribuição de frequências foi semelhante ao comparar os grupos dois a dois, de acordo com este padrão de herança (**Tabelas 11 a 13**).

## 5.7 Análise de haplótipos

A **Tabela 14** representa as frequências dos haplótipos encontradas para os grupos PE grave precoce/tardia e gestantes normotensas.

**Tabela 14 - Frequências haplotípica dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C no gene da eNOS nos grupos PE grave precoce/tardia e gestantes normotensas.**

Haplótipos	PE grave precoce (n = 44)	PE grave tardia (n = 44)	Gestantes normotensas (n= 100)	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>	p <sup>c</sup>
G-b-T	0,33	0,39	0,49	NS	NS	NS
T-b-C	0,08	0,22	0,11	0,0056	NS	0,036
G-b-C	0,11	0,07	0,09	NS	NS	NS
T-b-T	0,13	0,12	0,10	NS	NS	NS
G-a-T	0,19	0,17	0,18	NS	NS	NS
Total	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,00</b>			

Pearson chi-square test.  $P < 0,01$  ( $=0,05/5$ ) foi considerado significativo. NS: não significativo.

<sup>a</sup>: grupos: precoce x tardia ; <sup>b</sup>: grupos: precoce x normotensas; <sup>c</sup>: grupos: tardia x normotensas.

Três haplótipos (T-a-C, G-a-C and T-a-T) foram excluídos da análise estatística uma vez que apresentaram frequências abaixo de 5% em pelo menos um dos três grupos avaliados. Comparando-se os haplótipos individualmente, foi observada que a frequência do haplótipo T-b-C foi maior na PE grave tardia vs a PE grave precoce e gestantes normotensas ( $p=0,0056$  e  $p=0,036$ , respectivamente). Nenhuma diferença foi observada com relação aos outros haplótipos quando comparados os três grupos (**Tabela 14**).

### 5.8 Correlação entre os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário

Visando investigar a correlação entre os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário, foi utilizada a correlação de *Spearman* como apresentado na **Tabela 15**.

**Tabela 15** - Coeficiente de correlação ( $r$ ) de *Spearman* e valor de  $p$  para os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário nos grupos avaliados.

Parâmetros	PE grave precoce		PE grave tardia		Gestantes normotensas	
	$r$	$p$	$r$	$p$	$r$	$p$
G894T vs GMPc	0,240	0,171	-0,047	0,826	0,013	0,920
VNTR b/a vs GMPc	0,061	0,730	0,152	0,477	0,177	0,172
T-786C vs GMPc	0,319	0,066	0,430	0,036*	0,212	0,102

\* $p < 0,05$ ;  $r$ : coeficiente de correlação.

Uma correlação fraca entre o polimorfismo T-786C e os níveis de GMPc intraplaquetário ( $p=0,036$ ) no grupo de gestantes com PE grave tardia foi obtida. Para as outras análises, nenhuma correlação foi observada (**Tabela 15**).



### 5.9 Associação dos parâmetros clínicos, ADMA plasmática, GMPc intraplaquetário e polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS e ocorrência de PE grave

Visando avaliar a associação independente dos parâmetros clínicos, ADMA plasmática, GMPc intraplaquetário, e polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS e a ocorrência de PE grave, foi primeiramente realizada uma análise univariada, considerando a presença de PE grave e as variáveis explicativas, como mostra a **Tabela 16**.

**Tabela 16 - Análise univariada, considerando PE grave como variável dependente.**

Variáveis explicativas	OR	IC 95%	p	
Idade	2,59	1,03-6,54	0,044*	
Gravidez	1,42	0,82-2,45	0,206	
Aborto	0,85	0,44-1,65	0,630	
ADMA	1,99	0,93-4,28	0,077*	
GMPc	0,69	0,33-1,42	0,313	
G894T	0	1		
	1	1,11	0,63-1,96	0,727
	2	6,64	1,42-30,98	0,016*
VNTR b/a	0	1		
	1	1,14	0,65-2,00	0,655
	2	11,11	1,38-89,7	0,024*
T-786C	0	1		
	1	1,63	0,93-2,85	0,088*
	2	1,84	0,49-6,91	0,364

OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança \* p<0,20.

As variáveis explicativas que seguiram o critério  $p < 0,20$  foram avaliadas segundo o modelo de regressão logística multivariada. No entanto, tal modelo não se ajustou a estes resultados, uma vez que todas as variáveis perderam significância ( $p > 0,05$ ) após a análise multivariada.



## 6.1 Características clínicas dos grupos avaliados

No presente estudo foram avaliadas 201 gestantes, sendo 53 (26,4%) com PE grave precoce (Grupo I), 45 (22,4%) com PE grave tardia (Grupo II) e 103 (51,24%) normotensas (Grupo III).

Embora relatos da literatura sugiram que a PE ocorra com maior frequência em mulheres nulíparas (3, 146), na presente casuística não foram obtidas diferenças na porcentagem de gestantes primigestas entre os grupos.

O ganho de peso na gestação (GPG) foi significativamente maior nas gestantes com PE grave tardia, comparando-se às normotensas ( $p=0,002$ ). Cunningham *et al.* (2000) relataram que um aumento de peso na gestação de aproximadamente 500g por semana é considerado normal, mas quando o ganho ponderal é maior que 1 kg em qualquer semana, ou 3 kg em um mês, deve-se suspeitar de PE. O caráter súbito do ganho de peso, ao invés de um aumento distribuído ao longo da gestação, é característico dessa doença. O ganho ponderal é quase totalmente devido à retenção hídrica excessiva e, geralmente, é demonstrável antes de sinais vitais visíveis de edema. (146) No entanto, essa diferença não foi observada ao comparar as gestantes com PE grave precoce e as gestantes normotensas. Uma provável explicação seria o fato das gestantes com PE precoce apresentarem idade gestacional menor e conseqüentemente menor ganho de peso, uma vez que esse é crescente ao longo da gestação.

A pressão arterial foi maior no grupo com PE grave precoce e tardia em relação às gestantes normotensas, como esperado. A mediana das pressões sistólica e diastólica (110/70mmHg) do grupo de gestantes normotensas foi menor que o valor de referência considerado normal para a população em geral (120/80mmHg). A diminuição dos níveis pressóricos na gestação normal pode estar relacionada ao aumento fisiológico do ritmo cardíaco, uma diminuição sistêmica da resistência vascular, um aumento do volume sanguíneo, do fluxo renal e da filtração glomerular. Apesar do ritmo cardíaco e do volume sanguíneo, ocorre uma diminuição da pressão arterial durante o segundo trimestre e início do terceiro, período gestacional em que se encontravam as gestantes normotensas incluídas neste estudo. (147)

Apesar da internação hospitalar e tentativa terapêutica de controle da hipertensão e das convulsões, cinco (9%) gestantes com PE grave precoce evoluíram para síndrome HELLP e uma (2%) para eclâmpsia. No grupo de gestantes com PE grave tardia três (7%) evoluíram para síndrome HELLP e duas (4%) para eclâmpsia. Sabe-se que a síndrome HELLP e a eclâmpsia ocorrem em 10-20% e 2,8% dos casos de PE grave, respectivamente. (8)

As gestantes com PE grave precoce e tardia relataram sintomas clínicos, sendo a cefaleia o mais frequente (82% e 92% dos casos, respectivamente), seguida da epigastralgia (41% e 32%, respectivamente). No grupo de gestantes com PE grave precoce o aparecimento de reflexo patelar aumentado (24%) foi maior que escotoma (21%), enquanto que dentre as gestantes com PE grave tardia o aparecimento de escotoma (28%) foi maior que reflexo patelar aumentado (4%). Admite-se que a cefaleia e o escotoma estejam relacionados ao vasoespasma das arteríolas cerebrais e retinianas, respectivamente. A epigastralgia provavelmente resulta de necrose hepatocelular, do edema e isquemia que distende a cápsula de Glisson. (146)

## **6.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos**

A monitoração laboratorial das gestantes com PE inclui a realização do hemograma, contagem de plaquetas, avaliação da função hepática (pela determinação de AST, ALT e de bilirrubinas), determinação de desidrogenase láctica (LDH) e de ácido úrico, visando avaliar a gravidade e evolução da doença. (148)

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

Os resultados dos parâmetros bioquímicos das gestantes com PE grave precoce e tardia mostraram média ou mediana das enzimas hepáticas AST (<31) e ALT (<34), bilirrubina total (<1,1), direta (<0,3) e indireta (<0,8) e ácido úrico (2,6-6,0) dentro da faixa de referência e não diferiram entre os grupos, exceto o hematócrito,

que foi mais elevado na PE grave precoce e a bilirrubina direta, que foi mais elevada na PE grave tardia, embora ambos estivessem muito próximo dos limites das faixas de referências. A bilirrubina é um produto do metabolismo do grupo heme da molécula de hemoglobina e ocorre no sistema retículo-endotelial. Os níveis plasmáticos de bilirrubina constituem um marcador de hemólise, bem como de lesão hepática. (148) A PE grave pode evoluir para síndrome HELLP que cursa com hemólise, alteração das enzimas hepáticas e redução do número de plaquetas circulantes.

As medianas dos níveis de LDH nas gestantes com PE grave precoce e tardia (281 e 242U/L, respectivamente) foram superior ao nadir da faixa de referência (Lactato→Piruvato = 125-220U/L). Sabe-se que enzima LDH catalisa a conversão de lactato a piruvato e é um marcador de dano celular. Níveis elevados dessa enzima são observados na lesão vascular (149), na hemólise, inflamações, traumas e hepatites. (148) O aumento de LDH obtido nos grupos com PE grave precoce e tardia provavelmente reflete a lesão endotelial observada nessa doença, uma vez que vários estudos têm relatado um aumento plasmático de marcadores de lesão endotelial. (22, 150)

As médias dos valores da contagem de plaquetas nos grupos com PE grave precoce e tardia ( $180$  e  $191 \times 10^3/\text{mL}$ , respectivamente) foram próximas ao limiar inferior da normalidade. Diversos estudos relataram que a PE está associada à plaquetopenia. (96, 151, 152) 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 o grupo de gestantes normotensas.

Um dos critérios de inclusão das gestantes com PE grave neste estudo foi proteinúria superior a 2g/24 horas ou ++ pelo método semi-quantitativo da fita. No entanto, duas gestantes, uma com PE grave precoce e outra com PE grave tardia, apresentaram proteinúria negativa. Duas gestantes com PE grave precoce e três com PE grave tardia, apresentaram + pelo método semi-quantitativo. Apesar da proteinúria inferior a ++, a sintomatologia clínica, aliada aos níveis pressóricos, levaram a equipe obstétrica a classificar essas gestantes como portadoras de PE grave.

### 6.3 Avaliação quantitativa de ADMA plasmática

Os resultados obtidos revelaram um aumento nos níveis plasmáticos de ADMA na PE grave precoce em relação à PE grave tardia e às gestantes normotensas. A comparação entre as gestantes com PE grave tardia e as gestantes normotensas não revelou diferença.

A ADMA é um inibidor endógeno da eNOS que compete com o seu substrato natural, a L-arginina, comprometendo a síntese de NO. A elevação dos níveis de ADMA foi associada a eventos vasculares, nos quais a síntese de NO estaria comprometida. (80) Níveis aumentados de ADMA foram relatados na hipertensão, doença renal, acidente vascular cerebral e doenças da mucosa gástrica. (60, 88, 153-155)

Diversos estudos revelaram níveis plasmáticos aumentados de ADMA em gestantes com PE comparando-se às gestantes normotensas. (80, 88, 156-159) No entanto, nesses estudos não foi feita a classificação da PE em suas diferentes formas. Um aumento dos níveis de ADMA na primeira metade da gestação (antes do aparecimento dos sintomas clínicos) em relação às gestantes que não evoluíram para PE sugere o potencial desse marcador para monitoração de gestantes que apresentam fatores de risco para desenvolvimento da doença. (79, 80). Um estudo conduzido na população brasileira revelou associação negativa entre os níveis plasmáticos de ADMA e os níveis de nitratos (metabólito do NO) em gestantes com PE comparadas às gestantes normotensas. (88)

Sabe-se que na gravidez normal os níveis plasmáticos de ADMA reduzem até a 24ª semana de gestação e sobem próximo ao final de uma gravidez a termo. (160) Essas mudanças refletem a queda inicial e o subsequente aumento do tônus vascular e da pressão arterial durante a gestação sem complicações. Uma vez que, no presente estudo, a média da idade gestacional das gestantes com PE grave precoce foi 31 semanas e das gestantes normotensas foi 32 semanas, pode-se inferir que a diferença dos níveis de ADMA obtida não foi devida às variações fisiológicas que ocorrem em seus níveis durante a gestação.

Os mecanismos responsáveis pelo aumento dos níveis plasmáticos de ADMA na PE ainda não são conhecidos. A DDAH II é altamente expressa na placenta (72) e é sensível à inativação oxidativa pela modificação de um resíduo de cisteína no seu sítio ativo. (161) Sabendo que o início do desenvolvimento placentário na PE é

associado ao estresse oxidativo (162) é possível inferir que ocorra redução da atividade da DDAH nesse período, o que justificaria o aumento dos níveis de ADMA, que comprometeria a síntese de NO, resultando na disfunção endotelial local. Além disso, o *turnover* das proteínas é intenso durante o desenvolvimento placentário, (163) o que também pode contribuir para o aumento dos níveis de ADMA. Finalmente, outro determinante nos níveis de ADMA na PE é a atividade hepática, uma vez que o fígado é o órgão de maior importância na regulação dos níveis dessa molécula (59). Considerando os níveis aumentados de LDH na PE grave (precoce e tardia) no presente estudo, pode-se inferir que a disfunção hepática tenha contribuído para a elevação de ADMA nas gestantes com PE grave precoce.

Em concordância com a hipótese do presente estudo, o aumento da concentração de ADMA no plasma foi associado à gravidade da PE. Sabe-se que a ADMA, além de competir com a L-arginina pelos sítio ativo da NOS e comprometer a produção de NO, pode também promover o desacoplamento da atividade enzimática da eNOS e convertê-la em um gerador de superóxido. Essa propriedade da ADMA contribui, ainda mais, para a disfunção vascular e pode desempenhar um papel de grande importância na fisiopatologia da PE, servindo como uma fonte de estresse oxidativo vascular. (161)

Atualmente, há um interesse crescente no estudo das funções dos fatores de crescimento angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular-VEGF e o factor de crescimento placentário-PlGF) e os seus receptores solúveis-sFlt1 (antiangiogênico) na fisiopatologia de PE. (164) Cooke *et al.* (2003) demonstraram que a ADMA é capaz de afetar a angiogênese na gestação normal e na PE, uma vez que a angiogênese, bem como a atividade angiogênica dos fatores de crescimento (VEGF, PlGF, e fator de crescimento básico de fibroblastos) foram inibidas na presença de concentrações elevadas de ADMA *in vitro*. (165) Smith *et al.* (2003) demonstraram que níveis aumentados de ADMA reduziram a expressão de VEGF em cultura de células endoteliais e, dessa forma, podem afetar não apenas a atividade dos fatores de crescimento, mas também a produção desses. (166) Estes investigadores concluíram que a avaliação das interações entre os fatores de crescimento (VEGF e proangiogênico-PlGF) e fatores anti-angiogênicos (ADMA e sFlt1) no início da gravidez poderia ser de grande valia para prever o risco de ocorrência de PE.



Cumprido ressaltar que o presente estudo foi o primeiro a avaliar os níveis plasmáticos de ADMA na PE grave precoce e tardia. Os resultados encontrados corroboram com a hipótese inicial de que níveis plasmáticos aumentados de ADMA na PE grave precoce comprometem a síntese de NO. Dessa forma, promovem disfunção endotelial e o comprometimento da placentação e, conseqüentemente, contribuem para o surgimento das manifestações clínicas da doença. Além disso, estes resultados permitem inferir que a fisiopatologia da PE precoce e tardia é distinta, corroborando com outros relatos da literatura. (17, 19, 20)

#### **6.4 Avaliação quantitativa de GMPc intraplaquetário**

As plaquetas expressam eNOS (44) e possuem a enzima guanilato ciclase. (167) Em resposta à ativação das plaquetas, a eNOS plaquetária catalisa a oxidação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e NO e esse ativa a enzima guanilato ciclase, a qual transforma a GTP em GMPc. (44) O aumento de GMPc resulta na redução de  $Ca^{2+}$  e, conseqüentemente, na inibição da ativação plaquetária. (46)

Sabe-se que a PE está associada à ativação plaquetária. (168-170) No presente estudo, foram determinados os níveis de GMPc intraplaquetário, visando avaliar a inibição da ativação das plaquetas em gestantes com PE grave precoce e tardia e gestantes normotensas. Não foram obtidas diferenças ao comparar os três grupos.

Um único estudo foi encontrado na literatura avaliando os níveis de GMPc intraplaquetário na PE (142). Este estudo foi conduzido no Equador e, contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, foi relatada uma redução dos níveis de GMPc intraplaquetário nas gestantes com PE em relação às gestantes normotensas e mulheres não gestantes. No entanto, neste estudo não foram incluídas apenas gestantes com a forma grave da PE e, além disso, as gestantes viviam em uma condição de oxigenação particular, ou seja, a 2.800m de altitude, o que poderia justificar, de alguma forma, a diminuição de GMPc obtida na PE.

Considerando que as plaquetas estão ativadas na PE (168-170), poderiam ser admitidos dois mecanismos: um aumento da inibição plaquetária mediado pelo GMPc (44) na PE grave em relação às gestantes normotensas (em resposta à ativação plaquetária exacerbada), ou uma diminuição da inibição mediada pela

GMPc (o que justificaria como resultado final a maior ativação plaquetária observada na PE). No entanto, no presente estudo, não foram encontradas diferenças comparando os níveis de GMPc intraplaquetário nos três grupos de gestantes.

Os resultados de GMPc intraplaquetário precisam ser interpretados com cuidado. É importante ressaltar que o GMPc intraplaquetário pode resultar tanto da eNOS das plaquetas, como das células endoteliais. Nessas células, o NO, que possui pequeno peso molecular e natureza lipofílica, atravessa facilmente a membrana, podendo tanto dirigir no sentido da camada muscular do vaso e penetrar nas células musculares, quanto ir em direção à luz do vaso e penetrar nas plaquetas que circulam margeando o endotélio. (167) Além disso, a síntese de NO plaquetário é também estimulada pela adenosina monofosfato cíclica (AMPc), segundo mensageiro dos trofoblastos e responsável pela regulação de vários genes. (171)

Admitindo uma redução de GMPc intraplaquetário nas gestantes com PE grave em relação às normotensas, o que concorreria para a ativação plaquetária relatada na literatura, (168-170) a ausência dessa redução poderia ser explicada pelo efeito de medicamentos anti-hipertensivos utilizados para controlar a pressão arterial dessas gestantes. A nifedipina, um bloqueador de canal de  $Ca^{2+}$ , foi utilizada em 98% das gestantes com PE grave precoce e em 84% das gestantes com PE grave tardia, e estudos prévios mostraram que essa é capaz de ativar a GC e produzir GMPc, (172, 173) o que poderia ter comprometido a obtenção da redução dos níveis de GMPc intraplaquetário nas gestantes com PE grave precoce e tardia.

Outra provável explicação envolve o peptídeo natriurético atrial (ANP), que também participa da síntese de GMPc. (174) As plaquetas possuem receptores para o ANP (175) e níveis aumentados desses peptídeos, bem como de GMPc plasmático foram relatados na PE. (101) Além disso, uma associação positiva entre estímulos fisiopatológicos (*shear stress*, crescimento celular e presença de espécies reativas de oxigênio) e o aumento da expressão e estabilidade do RNA mensageiro da eNOS tem sido descrita. (176-178)

Sabe-se que a PE está associada a um processo inflamatório exacerbado (179) com geração de espécies reativas do oxigênio (ROS) e à vasoconstrição generalizada. (180) Estudos recentes têm demonstrado *in vivo* que o aumento do atrito das células circulantes com o endotélio vascular, determinado pela vasoconstrição (*shear-stress*) constitui um dos mais potentes estimuladores da expressão da eNOS. Weber *et al.* (2005) demonstraram que o *shear-stress* resulta

em um aumento da meia-vida do RNAm da eNOS em cerca de três vezes, por aumentar a cauda poli A. (181) Recentemente, foi demonstrado, em células umbilicais humanas (HUVEC) sob *shear-stress*, o aumento da produção de micro RNA (miR-21). O miR-21 liga-se a um RNAm, que quando expresso leva a apoptose da célula endotelial. Dessa forma, o miR-21 resulta no aumento da meia-vida destas células, contribuindo para aumentar a atividade da eNOS. Weber *et al.* (2010) demonstraram que a exposição das HUVEC ao *shear-stress* unidirecional aumentou em cinco vezes a expressão do miR-21, levando à redução da apoptose, aumento da atividade da eNOS e, conseqüentemente, da produção de NO. (182) As ROS, em particular o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) também contribuem para o aumento da expressão e atividade da eNOS. (183-185) Thomas *et al.* (2002) demonstraram que a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à cultura de células endoteliais estimulou a ativação da eNOS pela fosforilação da serina na posição 1177, resultando em aumento da produção de NO. (183)

Finalmente, outra explicação para a não obtenção de redução dos níveis de GMPc intraplaquetário na PE está associada ao volume das plaquetas. Um aumento do volume plaquetário médio (MPV) na PE tem sido relatado. (186-188) Sabe-se, que as plaquetas maiores são mais reativas, o que determinaria um aumento na ativação da eNOS plaquetária e, conseqüentemente, da síntese de NO e de GMPc intraplaquetário nas gestantes com PE.

Por outro lado, admitindo um aumento do GMPc intraplaquetário na PE, em resposta à ativação plaquetária exacerbada relatada nessa doença (168-170), a não obtenção desse aumento poderia ser explicada pela presença de polimorfismos da eNOS. (119, 124, 189, 190) Uma associação do alelo 894T e genótipo 894TT nas gestantes com PE grave tardia e do alelo a e genótipo aa (VNTR b/a) naquelas com PE grave precoce foi obtida, o que pode justificar a não obtenção do aumento do GMPc intraplaquetário. Outra interferência nos níveis de GMPc intraplaquetários pode ser atribuída à ADMA na PE grave precoce. Um aumento de ADMA nessas gestantes pode ter contribuído para a não obtenção de aumento de GMPc em resposta à ativação plaquetária.

## 6.5 Avaliação dos polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C do gene da eNOS

Relatos da literatura sugerem que polimorfismos do gene responsável pela síntese da NOS estão associados à diminuição da síntese de NO. (119, 124, 189, 190) No presente estudo, foram investigados os polimorfismos G894T, VNTR b/a e T-786C.

Todos os três grupos de gestantes avaliados estavam sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) quando considerados os três polimorfismos, exceto a população de gestantes com PE grave tardia para o polimorfismo G894T. Isto significa que não havia uma distribuição aleatória dos alelos nesta população, sendo esperado um número menor de homozigotos 894TT que a frequência observada. Vários fatores podem deslocar este equilíbrio, como a seleção e endogamia. Uma vez que não tenha sido pesquisado o fator consanguinidade entre os genitores das mulheres que participaram deste estudo, este fator não pode ser descartado.

As frequências do alelo 894T e genótipo 894TT foram maiores nas gestantes com PE grave tardia em relação ao grupo de gestantes normotensas. Estes resultados estão de acordo com estudos publicados anteriormente. (112, 113, 132) Paradoxalmente, outros estudos não encontraram associação do alelo 894T e genótipo 894TT e ocorrência de PE. (122-125) Um provável mecanismo pelo qual a presença do alelo 894T comprometeria a síntese do NO consiste na clivagem proteolítica seletiva da eNOS nas células endoteliais e tecidos vasculares, que resultaria na redução da geração de NO em indivíduos homozigotos para esse polimorfismo. Esta hipótese corrobora como a detecção de associação deste alelo e a PE grave tardia no modelo recessivo de herança. (119, 191)

Uma associação do alelo a e genótipo aa (VNTR b/a) foi obtida na PE grave precoce em relação à PE grave tardia e gestantes normotensas. O presente resultado está em concordância com outros previamente relatados, onde foi obtida uma associação entre o polimorfismo VNTR b/a e a ocorrência de PE. (126) Bashford *et al.* (2001) propuseram que a presença do genótipo aa estava associada a níveis de pressão arterial elevados no início da gestação. (192) Outro estudo concluiu que indivíduos com genótipo aa apresentaram níveis plasmáticos reduzidos dos metabólitos do NO (nitrito e nitrato). (189) No entanto, outro trabalho sugere que a interferência desse polimorfismo na biodisponibilidade do NO estaria relacionado ao desequilíbrio de ligação com outro(s) polimorfismo(s) ainda não descrito. (127)

Considerando o modelo recessivo de herança, observou-se que os genótipos 894TT e aa conferiram uma chance 12,63 e 15,52 vezes maiores, respectivamente, de desenvolvimento de PE grave tardia e PE grave precoce. Ao considerar como modelo o padrão dominante de herança, foi observada maior frequência dos genótipos aa e ab para o polimorfismo VNTR b/a ao comparar os grupos PE grave precoce e PE grave tardia, bem como os grupos PE grave precoce e gestantes normotensas. O polimorfismo VNTR b/a está localizado no intron 4 e ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual ele esteja ligado a alterações funcionais na eNOS. A relação entre o alelo a e o genótipo aa (modelo recessivo e dominante) e a ocorrência de PE grave precoce está de acordo com aquela encontrada por Tempfer *et al.* (2001), (126) apesar desses investigadores não classificarem a PE em suas diferentes formas. No entanto, outros pesquisadores não encontraram essa associação. (113, 124, 136, 193, 194)

No presente estudo não foi encontrada relação entre o polimorfismo T-786C e a PE grave precoce e tardia. Estudos publicados anteriormente, que avaliaram o processo de transcrição do gene da eNOS, revelaram que o alelo C do polimorfismo T-786C reduzia a expressão desse gene e conseqüentemente, a síntese de NO. (195, 196) No entanto, os mecanismos deste evento não foram identificados. Miyamoto *et al.* (2000), observaram que apenas o alelo C desse polimorfismo era alvo de replicação pela proteína A<sub>1</sub> (fator ligante de DNA com ação inibitória da transcrição da eNOS *in vitro*), reduzindo, dessa forma, os níveis de RNAm da eNOS. (130)

Uma meta-análise recente demonstrou que os polimorfismos VNTR b/a e T-786C contribuem significativamente para a ocorrência de PE, especialmente para as mulheres europeias. Contrariamente, no estudo citado, nenhuma associação foi encontrada para o polimorfismo G894T e ocorrência de PE. (133) Diversos fatores podem explicar a divergência dos estudos que avaliam os polimorfismos e ocorrência de PE, como a origem étnica das populações estudadas, diferenças nos critérios de seleção e tamanho amostral. Considerando a importância étnica na distribuição dos polimorfismos da eNOS (197, 198) pode-se admitir que a associação entre os polimorfismos da eNOS e a ocorrência da PE possa estar limitada a um grupo específico de mulheres.

Em concordância com o presente estudo, uma associação entre o haplótipo T-b-C e a ocorrência de PE em mulheres da Colômbia e do México foi anteriormente

relatada. (113, 136) É importante ressaltar que existem duas variantes raras (894T e -786C) na combinação do haplótipo T-b-C, as quais foram relacionadas à hipertensão e à redução de NO. (190) A análise conjunta desses dados, permite inferir que a disfunção endotelial nas gestantes com PE grave tardia é mais importante quando comparada à PE grave precoce. Em um estudo prévio na população brasileira, a associação do haplótipo G-a-C e PE foi obtida. (123) No entanto, vale ressaltar que esse estudo não avaliou separadamente gestantes com as formas precoce e tardia da doença.

Uma vez que no presente estudo, o polimorfismo G894T foi associado à PE grave tardia e o VNTR b/a à PE grave precoce, pode-se inferir que as alterações funcionais induzidas por esses dois polimorfismos sejam suficientemente diferentes a ponto de influenciar a idade gestacional na qual os sintomas da PE manifestariam. No entanto, outros estudos são necessários para validar essa premissa e avançar no entendimento da influência dos polimorfismos da eNOS e a ocorrência de PE, bem como a forma da doença (precoce ou tardia).

Cumpra ainda ressaltar que embora os resultados envolvendo os polimorfismos G894T e VNTR b/a tenham implicações clínicas importantes, nenhum deles pode ser considerado como responsável único para o desenvolvimento da PE, considerando o caráter multifatorial dessa doença, bem como as lacunas existentes na compreensão da sua etiologia.

É oportuno lembrar que este foi o primeiro estudo a avaliar a relação dos polimorfismos da eNOS nas formas precoce e tardia da PE grave. Considerando a distribuição das frequências dos alelos e genótipos nos grupos avaliados, é possível concluir que a PE grave precoce e tardia constituem duas formas distintas da doença. Os resultados do presente estudo certamente poderão ser úteis para trabalhos futuros visando à triagem por meio de genotipagem de gestantes que tenham fatores de risco para desenvolvimento de PE.

Quando avaliadas as correlações entre os polimorfismos da eNOS e os níveis de GMPc intraplaquetário, observou-se apenas uma fraca correlação entre o polimorfismo T-786C e o GMPc intraplaquetário no grupo de PE grave. Uma vez que não foi avaliada a expressão da proteína eNOS, nem a dosagem direta de NO, estes resultados sugerem que outros mecanismos, além dos determinantes genéticos, estão envolvidos na alteração dos níveis de GMPc intraplaquetário nos três grupos avaliados.

## **6.6 Avaliação das variáveis associadas à ocorrência de PE grave**

Visando avaliar quais variáveis estariam associadas, de forma independente, à ocorrência de PE grave foi feita a análise multivariada de regressão logística. Observou-se que, embora na análise univariada preliminar a idade, os níveis de ADMA e as variáveis genéticas mostraram associação com a doença, nenhuma dessas permaneceu associada de forma independente, o que provavelmente reflete o aspecto multifatorial e complexo dessa doença.

## **6.7 Considerações finais**

Os resultados obtidos para a determinação de ADMA plasmática e para os polimorfismos da eNOS apontam para um comprometimento da síntese de NO na PE grave. No entanto, a interpretação dos níveis de GMPc intraplaquetário não permitiram conclusões, pela dificuldade de avaliação das plaquetas *in vitro* e complexidade da metodologia para determinação do GMPc intraplaquetário.

## **6.8 Limitação do estudo**

### **1. Dificuldade de diagnóstico da PE**

Apesar da rigidez no seguimento dos critérios de inclusão e exclusão para seleção das gestantes, eliminando todos os casos duvidosos, não se pode excluir a possibilidade de inclusão de algum caso equivocado, uma vez que as gestantes foram selecionadas em quatro maternidades distintas.

## *7 CONCLUSÕES*



- Os resultados obtidos sugerem um comprometimento da via L-arginina:NO na PE grave precoce e tardia
- Os níveis plasmáticos de ADMA e a diferença nas frequências dos polimorfismos no gene da sintase do NO sugerem que as formas precoce e tardia da PE grave apresentam fisiopatologias distintas
- O GMPc intraplaquetário não constitui um marcador para avaliar a inibição da ativação plaquetária na PE grave

**Perspectiva de estudos**

Avaliar os níveis plasmáticos de ADMA, ao longo da gestação, em mulheres que apresentam fatores de risco para o desenvolvimento de PE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):S1-S22.
2. REZENDE JD. *Obstetrícia.* Rio de Janeiro; 2005.
3. Young BC, Levine RJ, and Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol.* 2010;5(173-92).
4. Alpoim PN, de Barros Pinheiro M, Junqueira DR, Freitas LG, das Graças Carvalho M, Fernandes AP, Komatsuzaki F, Gomes KB, and Dusse LM. Preeclampsia and ABO blood groups: a systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012.
5. Lindheimer MD, Fisher KA, Spargo BH, and Katz AI. Hypertension in pregnancy: a biopsy study with long-term follow-up. *Contrib Nephrol.* 1981;25(71-7).
6. RIO SMP. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1990:90.
7. BARROS ACS. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1987.
8. Geary M. The HELLP syndrome. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104(8):887-91.
9. Magann EF, and Martin JN. Twelve steps to optimal management of HELLP syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 1999;42(3):532-50.
10. MacKay AP, Berg CJ, and Atrash HK. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2001;97(4):533-8.
11. Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, Catalano PM, and Morris CD. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol.* 2000;95(1):24-8.
12. Sibai BM, Mercer B, and Sarinoglu C. Severe preeclampsia in the second trimester: recurrence risk and long-term prognosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(5 Pt 1):1408-12.
13. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, and Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2007;335(7627):974.
14. Robert M, Sepandj F, Liston RM, and Dooley KC. Random protein-creatinine ratio for the quantitation of proteinuria in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1997;90(6):893-5.
15. Sethuram R, Kiran TS, and Weerakkody AN. Is the urine spot protein/creatinine ratio a valid diagnostic test for pre-eclampsia? *J Obstet Gynaecol.* 2011;31(2):128-30.
16. Côté AM, Brown MA, Lam E, von Dadelszen P, Firoz T, Liston RM, and Magee LA. Diagnostic accuracy of urinary spot protein:creatinine ratio for proteinuria in hypertensive pregnant women: systematic review. *BMJ.* 2008;336(7651):1003-6.
17. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, and van Geijn HP. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(4):1042-8.
18. Moore MP, and Redman CW. Case-control study of severe pre-eclampsia of early onset. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1983;287(6392):580-3.
19. von Dadelszen P, Magee LA, and Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2003;22(2):143-8.
20. Reis ZS, Lage EM, Teixeira PG, Porto LB, Guedes LR, Oliveira EC, and Cabral AC. [Early-onset preeclampsia: is it a better classification for maternal and perinatal outcomes?]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32(12):584-90.
21. Jim B, Sharma S, Kebede T, and Acharya A. Hypertension in pregnancy: a comprehensive update. *Cardiol Rev.* 2010;18(4):178-89.

22. Alpoim PN, Gomes KB, Godoi LC, Rios DR, Carvalho MG, Fernandes AP, and Dusse LM. ADAMTS13, FVIII, von Willebrand factor, ABO blood group assessment in preeclampsia. *Clin Chim Acta*. 2011;412(23-24):2162-6.
23. Roberts JM, and Lain KY. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*. 2002;23(5):359-72.
24. Dusse L, Godoi L, Kazmi RS, Alpoim P, Petterson J, Lwaleed BA, and Carvalho M. Sources of thrombomodulin in pre-eclampsia: renal dysfunction or endothelial damage? *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(2):153-7.
25. Pinheiro MeB, Junqueira DR, Coelho FF, Freitas LG, Carvalho MG, Gomes KB, and Dusse LM. D-dimer in preeclampsia: systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2012;414(166-70).
26. Lwaleed BA, Dusse L, and Cooper AJ. Tissue factor dependent pathway and the diagnosis of pre-eclampsia. *Semin Thromb Hemost*. 2011;37(2):125-30.
27. Godoi LC, Gomes KB, Alpoim PN, Carvalho M, Lwaleed BA, and Sant'Ana Dusse LM. Preeclampsia: the role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Thrombolysis*. 2012;34(1):1-6.
28. Dusse LM, Carvalho MG, Getliffe K, Voegeli D, Cooper AJ, and Lwaleed BA. Total plasma tissue factor pathway inhibitor levels in pre-eclampsia. *Clin Chim Acta*. 2008;388(1-2):230-2.
29. Pinheiro MB, Gomes KB, and Dusse LM. Fibrinolytic system in preeclampsia. *Clin Chim Acta*. 2013;416(67-71).
30. Dusse LM, Rios DRA, Pinheiro MB, Cooper AJ, and Lwaleed BA. Pre-eclampsia: Relationship between coagulation, fibrinolysis and inflammation. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(1-2):17-21.
31. Pinheiro MB, Martins-Filho OA, Mota AP, Alpoim PN, Godoi LC, Silveira AC, Teixeira-Carvalho A, Gomes KB, and Dusse LM. Severe preeclampsia goes along with a cytokine network disturbance towards a systemic inflammatory state. *Cytokine*. 2013;62(1):165-73.
32. Redman CW, and Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):534-43.
33. Mustafa R, Ahmed S, Gupta A, and Venuto RC. A comprehensive review of hypertension in pregnancy. *J Pregnancy*. 2012;2012(105918).
34. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest*. 1999;103(7):945-52.
35. Siddiqui AH, Irani RA, Blackwell SC, Ramin SM, Kellems RE, and Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibody is highly prevalent in preeclampsia: correlation with disease severity. *Hypertension*. 2010;55(2):386-93.
36. Agorastos T, Karavida A, Lambropoulos A, Constantinidis T, Tzitzimikas S, Chrisafi S, Saravelos H, Vavilis D, Kotsis A, and Bontis J. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in pregnancies with adverse outcome. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2002;12(4):267-73.
37. Kupfermanc MJ, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, and Lessing JB. Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations. *Obstet Gynecol*. 2000;96(1):45-9.
38. De Maat MP, Jansen MW, Hille ET, Vos HL, Bloemenkamp KW, Buitendijk S, Helmerhorst FM, Wladimiroff JW, Bertina RM, and De Groot CJ. Preeclampsia and its interaction with common variants in thrombophilia genes. *J Thromb Haemost*. 2004;2(9):1588-93.

39. Dusse LM, Carvalho M, Bragança WF, Paiva SG, Godoi LC, Guimarães DA, and Fernandes AP. Inherited thrombophilias and pre-eclampsia in Brazilian women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;134(1):20-3.
40. van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H, Huijgens PC, Koopman MM, von Blomberg BM, and Büller HR. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180(5):1146-50.
41. Matsuo K, Kooshesh S, Dinc M, Sun CC, Kimura T, and Baschat AA. Late postpartum eclampsia: report of two cases managed by uterine curettage and review of the literature. *Am J Perinatol.* 2007;24(4):257-66.
42. Brittain PC, and Bayliss P. Partial hydatidiform molar pregnancy presenting with severe preeclampsia prior to twenty weeks gestation: a case report and review of the literature. *Mil Med.* 1995;160(1):42-4.
43. Moncada S, and Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;176 Pt 1):213-54.
44. Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5193-7.
45. GOODMAN LS, BRUNTON LL, and GILMAN AG. New York: Mc Graw-Hill; 2006:2021.
46. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
47. Kubes P, Suzuki M, and Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):4651-5.
48. Virdis A, Ghiadoni L, Giannarelli C, and Taddei S. Endothelial dysfunction and vascular disease in later life. *Maturitas.* 2010;67(1):20-4.
49. Yeboah J, Crouse JR, Bluemke DA, Lima JA, Polak JF, Burke GL, and Herrington DM. Endothelial dysfunction is associated with left ventricular mass (assessed using MRI) in an adult population (MESA). *J Hum Hypertens.* 2011;25(1):25-31.
50. Novaro V, González E, Jawerbaum A, Rettori V, Canteros G, and Gimeno MF. Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reprod Fertil Dev.* 1997;9(5):557-64.
51. Izumi H, Garfield RE, Makino Y, Shirakawa K, and Itoh T. Gestational changes in endothelium-dependent vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol.* 1994;170(1 Pt 1):236-45.
52. Nelson SH, Steinsland OS, Suresh MS, and Lee NM. Pregnancy augments nitric oxide-dependent dilator response to acetylcholine in the human uterine artery. *Hum Reprod.* 1998;13(5):1361-7.
53. Grunewald C, Carlström K, Kumlien G, Ringqvist A, and Lundberg J. Exhaled oral and nasal nitric oxide during L-arginine infusion in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 1998;46(4):232-7.
54. Sladek SM, Magness RR, and Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 2):R441-63.
55. Osol G, and Mandala M. Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology (Bethesda).* 2009;24(58-71).
56. López-Jaramillo P, Arenas WD, García RG, Rincon MY, and López M. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008;2(4):261-75.
57. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, and Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339(8793):572-5.

58. Wada K, Inoue K, and Hagiwara M. Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1591(1-3):1-10.
59. Siroen MP, Teerlink T, Nijveldt RJ, Prins HA, Richir MC, and van Leeuwen PA. The clinical significance of asymmetric dimethylarginine. *Annu Rev Nutr*. 2006;26(203-28).
60. Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, and Okuda S. Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2007;12(6):582-90.
61. Böger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr*. 2007;137(6 Suppl 2):1650S-5S.
62. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(9):2032-7.
63. Hibbs JB, Vavrin Z, and Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol*. 1987;138(2):550-65.
64. MacAllister RJ, Whitley GS, and Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int*. 1994;45(3):737-42.
65. Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003;59(4):824-33.
66. Faraci FM, Brian JE, and Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol*. 1995;269(5 Pt 2):H1522-7.
67. Segarra G, Medina P, Ballester RM, Lluch P, Aldasoro M, Vila JM, Lluch S, and Pelligrino DA. Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries. *Stroke*. 1999;30(10):2206-10; discussion 10-11.
68. Segarra G, Medina P, Vila JM, Chuan P, Domenech C, Torondel B, and Lluch A. Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens*. 2001;14(11 Pt 1):1142-8.
69. Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RM, and Moncada S. Regional and cardiac haemodynamic effects of NG, NG-dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br J Pharmacol*. 1993;110(4):1457-64.
70. Closs EI, Basha FZ, Habermeier A, and Förstermann U. Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y<sup>+</sup> carrier hCAT-2B. *Nitric Oxide*. 1997;1(1):65-73.
71. Ogawa T, Kimoto M, and Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *J Biol Chem*. 1989;264(17):10205-9.
72. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, and Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *Biochem J*. 1999;343 Pt 1(209-14).
73. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, and Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 1999;99(24):3092-5.
74. Stühlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, and Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001;104(21):2569-75.
75. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, and Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of

- asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002;106(8):987-92.
76. Siroen MP, van der Sijp JR, Teerlink T, van Schaik C, Nijveldt RJ, and van Leeuwen PA. The human liver clears both asymmetric and symmetric dimethylarginine. *Hepatology*. 2005;41(3):559-65.
  77. Xia W, Feng W, Guan M, Yu Y, Li J, and Qu X. Increased levels of asymmetric dimethylarginine and C-reactive protein are associated with impaired vascular reactivity in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2010;32(1):43-8.
  78. Tarnow L, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, and Parving HH. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):765-9.
  79. Speer PD, Powers RW, Frank MP, Harger G, Markovic N, and Roberts JM. Elevated asymmetric dimethylarginine concentrations precede clinical preeclampsia, but not pregnancies with small-for-gestational-age infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198(1):112.e1-7.
  80. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, and Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet*. 2003;361(9368):1511-7.
  81. Fickling SA, Williams D, Vallance P, Nussey SS, and Whitley GS. Plasma concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Lancet*. 1993;342(8865):242-3.
  82. Pettersson A, Hedner T, and Milsom I. Increased circulating concentrations of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis, in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1998;77(8):808-13.
  83. Ellis J, Wennerholm UB, Bengtsson A, Lilja H, Pettersson A, Sultan B, Wennergren M, and Hagberg H. Levels of dimethylarginines and cytokines in mild and severe preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001;80(7):602-8.
  84. Braekke K, Ueland PM, Harsem NK, and Staff AC. Asymmetric dimethylarginine in the maternal and fetal circulation in preeclampsia. *Pediatr Res*. 2009;66(4):411-5.
  85. Mao D, Che J, Li K, Han S, Yue Q, Zhu L, Zhang W, and Li L. Association of homocysteine, asymmetric dimethylarginine, and nitric oxide with preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;282(4):371-5.
  86. Khalil RA, and Granger JP. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283(1):R29-45.
  87. MacAllister RJ, Fickling SA, Whitley GS, and Vallance P. Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol*. 1994;112(1):43-8.
  88. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Cavalli RC, Duarte G, and Tanus-Santos JE. Interethnic differences in ADMA concentrations and negative association with nitric oxide formation in preeclampsia. *Clin Chim Acta*. 2010;411(19-20):1457-60.
  89. Weiner CP, Knowles RG, Nelson SE, and Stegink LD. Pregnancy increases guanosine 3',5'-monophosphate in the myometrium independent of nitric oxide synthesis. *Endocrinology*. 1994;135(6):2473-8.
  90. Schneider F, Lutun P, Baldauf JJ, Quirin L, Dreyfus M, Ritter J, and Tempé JD. Plasma cyclic GMP concentrations and their relationship with changes of blood pressure levels in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996;75(1):40-4.

91. Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I, and Lyall F. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension*. 1996;28(3):488-93.
92. Roggensack AM, Zhang Y, and Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*. 1999;33(1):83-9.
93. Pathak N, Sawhney H, Vasishta K, and Majumdar S. Estimation of oxidative products of nitric oxide (nitrates, nitrites) in preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1999;39(4):484-7.
94. Ghabour MS, Eis AL, Brockman DE, Pollock JS, and Myatt L. Immunohistochemical characterization of placental nitric oxide synthase expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(3 Pt 1):687-94.
95. Poranen AK, Aubry J, Kujari H, and Ekblad U. Expression of nitric oxide synthase in normal and preeclamptic placental tissue and effects of glyceryl trinitrate and shear stress on placental blood flow. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1998;77(6):594-7.
96. DUSSE LMS. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo,; 1999:167.
97. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, and Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1994;171(4):944-8.
98. Delacrétaz E, de Quay N, Waeber B, Vial Y, Schulz PE, Burnier M, Brunner HR, Bossart H, and Schaad NC. Differential nitric oxide synthase activity in human platelets during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin Sci (Lond)*. 1995;88(6):607-10.
99. Rutherford RA, McCarthy A, Sullivan MH, Elder MG, Polak JM, and Wharton J. Nitric oxide synthase in human placenta and umbilical cord from normal, intrauterine growth-retarded and pre-eclamptic pregnancies. *Br J Pharmacol*. 1995;116(8):3099-109.
100. Boccardo P, Soregaroli M, Aiello S, Noris M, Donadelli R, Lojacono A, and Benigni A. Systemic and fetal-maternal nitric oxide synthesis in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996;103(9):879-86.
101. Sandrim VC, Palei AC, Sertório JT, Amaral LM, Cavalli RC, and Tanus-Santos JE. Alterations in cyclic GMP levels in preeclampsia may reflect increased B-type natriuretic peptide levels and not impaired nitric oxide activity. *Clin Biochem*. 2011;44(12):1012-4.
102. Ma RQ, Sun MN, and Yang Z. Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestational stage on feto-placental outcomes in a mouse model. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(6):707-12.
103. Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Mu J, Bainbridge SA, and Adamson SL. Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. *Hypertension*. 2012;60(1):231-8.
104. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, Than NG, Papp Z, and Jai Kim C. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med*. 2006;34(6):447-58.
105. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, and Torry DS. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*. 1997;18(8):657-65.
106. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003;111(5):649-58.



107. Bergmann A, Ahmad S, Cudmore M, Gruber AD, Wittschen P, Lindenmaier W, Christofori G, Gross V, Gonzalves ACh, Gröne HJ, et al. Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a mouse model. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6B):1857-67.
108. Suzuki H, Ohkuchi A, Matsubara S, Takei Y, Murakami M, Shibuya M, Suzuki M, and Sato Y. Effect of recombinant placental growth factor 2 on hypertension induced by full-length mouse soluble fms-like tyrosine kinase 1 adenoviral vector in pregnant mice. *Hypertension.* 2009;54(5):1129-35.
109. Groesch KA, Torry RJ, Wilber AC, Abrams R, Bieniarz A, Guilbert LJ, and Torry DS. Nitric oxide generation affects pro- and anti-angiogenic growth factor expression in primary human trophoblast. *Placenta.* 2011;32(12):926-31.
110. Brandão AH, Cabral MA, Leite HV, and Cabral AC. Endothelial function, uterine perfusion and central Flow in pregnancies complicated by Preeclampsia. *Arq Bras Cardiol.* 2012.
111. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, and Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268(23):17478-88.
112. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, and Okamura H. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7(4):238-41.
113. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R, Monterrosa A, Bautista A, Hawe E, Hingorani AD, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension.* 2004;44(5):702-7.
114. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension.* 1998;32(1):3-8.
115. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension.* 1998;32(3):521-6.
116. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31(7):1506-10.
117. Ozturk E, Balat O, Pehlivan S, Ugur MG, Ozcan C, Sever T, and Kul S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in preeclampsia with or without eclampsia in a Turkish population. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(12):1778-83.
118. Philip I, Plantefevre G, Vuillaume-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmots JM, Durand G, et al. G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation.* 1999;99(24):3096-8.
119. Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, and Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2832-5.
120. Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, and Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension.* 2001;38(6):1289-93.

121. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H, and Okamura H. The missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption. *Hum Genet.* 2001;108(3):181-3.
122. Turan F, Ilhan N, Kaman D, Ateş K, and Kafkasli A. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in Turkish pre-eclamptic women without fetal growth retardation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010;36(3):495-501.
123. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araújo FM, Ramos ES, Duarte G, and Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenomics.* 2008;9(10):1467-73.
124. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, and Tanus-Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(7):506-10.
125. Medica I, Kastrin A, and Peterlin B. Genetic polymorphisms in vasoactive genes and preeclampsia: a meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;131(2):115-26.
126. Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, and Gregg AR. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2001;20(1):107-18.
127. Arngrímsson R, Hayward C, Nadaud S, Baldursdóttir A, Walker JJ, Liston WA, Bjarnadóttir RI, Brock DJ, Geirsson RT, Connor JM, et al. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am J Hum Genet.* 1997;61(2):354-62.
128. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Sieroszewski P, Grześkowiak E, and Mrozikiewicz P. The significance of -786T > C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(3):432-6.
129. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, and Mrozikiewicz PM. The -786T/C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;138(1):118-9.
130. Miyamoto Y, Saito Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Yoshimura T, Yoshimura M, Harada M, Kajiyama N, Kishimoto I, Kuwahara K, et al. Replication protein A1 reduces transcription of the endothelial nitric oxide synthase gene containing a -786T-->C mutation associated with coronary spastic angina. *Hum Mol Genet.* 2000;9(18):2629-37.
131. Yoon Y, Song J, Hong SH, and Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clin Chem.* 2000;46(10):1626-30.
132. Chen H, Zhao G, Sun M, Wang H, Liu J, Gao W, and Meng T. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms (G894T, 4b/a and T-786C) and Preeclampsia: Meta-Analysis of 18 Case-Control Studies. *DNA Cell Biol.* 2012;31(6):1136-45.
133. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, and Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene.* 2013;519(1):187-93.
134. Moreno H. Analysis of genetic polymorphisms in preeclampsia: relevance of haplotypes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;136(2):260; author reply -1.
135. Tanus-Santos JE, and Casella-Filho A. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and susceptibility to hypertension: genotype versus haplotype analysis. *Hypertension.* 2007;49(1):E1; author reply E2.

136. Díaz-Olguín L, Coral-Vázquez RM, Canto-Cetina T, Canizales-Quinteros S, Ramírez Regalado B, Fernández G, and Canto P. Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with preeclampsia in Maya mestizo women. *Dis Markers*. 2011;31(2):83-9.
137. Sandrim VC, Palei AC, Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Cavalli RC, and Tanus-Santos JE. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics J*. 2010;10(1):40-5.
138. Beghetti M, Sparling C, Cox PN, Stephens D, and Adatia I. Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H637-42.
139. Martina V, Benso A, Gigliardi VR, Masha A, Origlia C, Granata R, and Ghigo E. Short-term dehydroepiandrosterone treatment increases platelet cGMP production in elderly male subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(3):260-4.
140. McVeigh GE, Hamilton P, Wilson M, Hanratty CG, Leahey WJ, Devine AB, Morgan DG, Dixon LJ, and McGrath LT. Platelet nitric oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of supplemental ascorbate. *Circulation*. 2002;106(2):208-13.
141. Martin DD, Tong JS, and Parker JD. Platelet cyclic GMP responses to nitroglycerin. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2000;14(4):419-25.
142. Teran E, Escudero C, Vivero S, Enriquez A, and Calle A. Intraplatelet cyclic guanosine-3',5'-monophosphate levels during pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2004;23(3):303-8.
143. Mathew J, Narayanan P, Sundaram R, Jayaraman B, Dutta TK, Raman SK, and Chandrasekaran A. Lack of association between Glu(298) asp polymorphism of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene and coronary artery disease in TAMILIAN population. *Indian Heart J*. 2008;60(3):223-7.
144. Luizon MR, Izidoro-Toledo TC, Simoes AL, and Tanus-Santos JE. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and haplotypes in Amerindians. *DNA Cell Biol*. 2009;28(7):329-34.
145. Stephens M, Smith NJ, and Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):978-89.
146. CUNNINGHAM FG. *Williams obstetrícia*. Rio de janeiro; 2000.
147. Reiss RE, O'Shaughnessy RW, Quilligan TJ, and Zuspan FP. Retrospective comparison of blood pressure course during preeclamptic and matched control pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1987;156(4):894-8.
148. BURTIS CA, ASHWOOD ER, and BRUNS DE. *Tietz fundamentos de química clínica*. Rio de janeiro; 2008.
149. Bowman CM, Butler EN, and Repine JE. Hyperoxia damages cultured endothelial cells causing increased neutrophil adherence. *Am Rev Respir Dis*. 1983;128(3):469-72.
150. Dusse LM, Carvalho MG, Bragança WF, Paiva SG, Godoi LC, Guimarães DA, and Fernandes AP. Inherited thrombophilias and pre-eclampsia in Brazilian women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;134(1):20-3.
151. Dube B, Bhattacharya S, and Dube RK. Blood coagulation profile in Indian patients with pre-eclampsia and eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1975;82(1):35-9.
152. Sibai B, Dekker G, and Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005;365(9461):785-99.
153. Matsuoka H, Itoh S, Kimoto M, Kohno K, Tamai O, Wada Y, Yasukawa H, Iwami G, Okuda S, and Imaizumi T. Asymmetrical dimethylarginine, an endogenous nitric

- oxide synthase inhibitor, in experimental hypertension. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):242-7.
154. Yoo JH, and Lee SC. Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):425-30.
  155. Petersson J, Phillipson M, Jansson EA, Patzak A, Lundberg JO, and Holm L. Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(3):G718-24.
  156. Demir B, Demir S, Pasa S, Guven S, Atamer Y, Atamer A, and Kocyigit Y. The role of homocysteine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol*. 2012;32(6):525-8.
  157. Anderssohn M, Maass LM, Diemert A, Lüneburg N, Atzler D, Hecher K, and Böger RH. Severely decreased activity of placental dimethylarginine dimethylaminohydrolase in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;161(2):152-6.
  158. Khalil AA, Tsikas D, Akolekar R, Jordan J, and Nicolaides KH. Asymmetric dimethylarginine, arginine and homoarginine at 11-13 weeks' gestation and preeclampsia: a case-control study. *J Hum Hypertens*. 2011.
  159. Alacam H, Dikmen ZG, Yaman H, Cakir E, Deren O, Akgul EO, Aydin I, Kurt YG, Keskin U, Akalin S, et al. The role of asymmetric dimethyl arginine and oxidant/antioxidant system in preeclampsia. *Fetal Pediatr Pathol*. 2011;30(6):387-93.
  160. Holden DP, Fickling SA, Whitley GS, and Nussey SS. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine, a natural inhibitor of nitric oxide synthase, in normal pregnancy and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(3):551-6.
  161. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M, Phelan J, Tilley S, Santa Maria J, Vallance P, and McDonald N. Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol*. 2001;8(8):679-83.
  162. Sikkema JM, van Rijn BB, Franx A, Bruinse HW, de Roos R, Stroes ES, and van Faassen EE. Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. *Placenta*. 2001;22(4):304-8.
  163. Johnson JD, and Greenberg RE. Protein turnover in rat placenta: effects of maternal fasting and maternal protein restriction. *Placenta*. 1992;13(2):141-50.
  164. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004;350(7):672-83.
  165. Cooke JP. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl*. 2003;4(4):53-60.
  166. Smith CL, Birdsey GM, Anthony S, Arrigoni FI, Leiper JM, and Vallance P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity modulates ADMA levels, VEGF expression, and cell phenotype. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308(4):984-9.
  167. Vasta V, Meacci E, Farnararo M, and Bruni P. Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206(3):878-84.
  168. Ahmed Y, van Iddekinge B, Paul C, Sullivan HF, and Elder MG. Retrospective analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993;100(3):216-20.
  169. Macey MG, Bevan S, Alam S, Verghese L, Agrawal S, Beski S, Thuraisingham R, and MacCallum PK. Platelet activation and endogenous thrombin potential in pre-eclampsia. *Thromb Res*. 2010;125(3):e76-81.

170. Lok CA, Nieuwland R, Sturk A, Hau CM, Boer K, Vanbavel E, and Vanderpost JA. Microparticle-associated P-selectin reflects platelet activation in preeclampsia. *Platelets*. 2007;18(1):68-72.
171. Queen LR, Xu B, Horinouchi K, Fisher I, and Ferro A. beta(2)-adrenoceptors activate nitric oxide synthase in human platelets. *Circ Res*. 2000;87(1):39-44.
172. Seya K, Furukawa K, Yoshida K, Narita R, and Motomura S. Nifedipine enhances cGMP production through the activation of soluble guanylyl cyclase in rat ventricular papillary muscle. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(4):511-4.
173. Kishi Y, Watanabe T, Makita T, Sakita S, Watanabe R, Ashikaga T, and Numano F. Effect of nifedipine on cyclic GMP turnover in cultured coronary smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26(4):590-5.
174. Lincoln TM, and Cornwell TL. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels*. 1991;28(1-3):129-37.
175. Canaan-Kuhl S, Parra-Roide L, Bialek JW, Jamison RL, and Myers BD. Regulation of platelet clearance receptors for atrial natriuretic peptide in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1992;3(2):236-43.
176. Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, Michel JB, and Soubrier F. Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Circ Res*. 1996;79(4):857-63.
177. Topper JN, Cai J, Falb D, and Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(19):10417-22.
178. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, and Harrison DG. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):C1371-8.
179. Redman CWG, Sacks GP, and Sargent IL. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1999;180(2):499-506.
180. Roberts JM, and Gammill HS. Preeclampsia - Recent insights. *Hypertension*. 2005;46(6):1243-9.
181. Weber M, Hagedorn CH, Harrison DG, and Searles CD. Laminar shear stress and 3' polyadenylation of eNOS mRNA. *Circ Res*. 2005;96(11):1161-8.
182. Weber M, Baker MB, Moore JP, and Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(4):643-8.
183. Thomas SR, Chen K, and Keaney JF. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(8):6017-24.
184. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, and Harrison DG. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res*. 2000;86(3):347-54.
185. Cai H, Davis ME, Drummond GR, and Harrison DG. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(10):1571-6.

186. Myatt L, Clifton RG, Roberts JM, Spong CY, Hauth JC, Varner MW, Thorp JM, Mercer BM, Peaceman AM, Ramin SM, et al. First-trimester prediction of preeclampsia in nulliparous women at low risk. *Obstet Gynecol.* 2012;119(6):1234-42.
187. Dundar O, Yoruk P, Tutuncu L, Erikci AA, Muhcu M, Ergur AR, Atay V, and Mungen E. Longitudinal study of platelet size changes in gestation and predictive power of elevated MPV in development of pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2008;28(11):1052-6.
188. al. Fe. Hematology; 2013 in press.
189. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, and Igari J. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(1):190-3.
190. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, and Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide.* 2007;16(3):348-55.
191. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El-Khattabi O, Mourad M, Horie S, Feron O, Balligand JL, et al. Modifier effect of ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet.* 2002;11(3):229-41.
192. Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW, Roa BB, and Gregg AR. Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(7):1345-50; discussion 50-1.
193. Zdoukopoulos N, Doxani C, Messinis IE, Stefanidis I, and Zintzaras E. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene in preeclampsia: a candidate-gene association study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011;11(89).
194. Salimi S, Naghavi A, Mokhtari M, Noora M, and Yaghmaei M. Lack of relationship between endothelial nitric oxide synthase gene 4b/a and T-786C polymorphisms with preeclampsia in southeast of Iran. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(2):405-9.
195. Dosenko VE, Zagoriy VY, Haytovich NV, Gordok OA, and Moibenko AA. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochim Pol.* 2006;53(2):299-302.
196. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, and Wang XL. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol.* 2005;24(4):218-24.
197. Marroni AS, Metzger IF, Souza-Costa DC, Nagasaki S, Sandrim VC, Correa RX, Rios-Santos F, and Tanus-Santos JE. Consistent interethnic differences in the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide synthase genetic polymorphisms. *Nitric Oxide.* 2005;12(3):177-82.
198. Tanus-Santos JE, Desai M, and Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):719-25.

**ANEXO A – Parecer de aprovação COEP – UFMG**

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

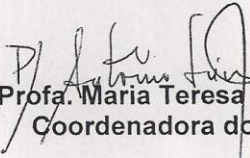
Parecer nº. ETIC 0530.0.203.000-09

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

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de dezembro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação do porlormorfismo do gene da NO-sintase endotelial e da síntese de óxido nítrico na pré-eclâmpsia"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

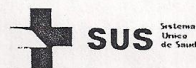
O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Prof. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**



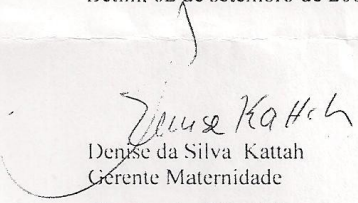
**Anexo B – Declaração de aprovação pelo HPRB**

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

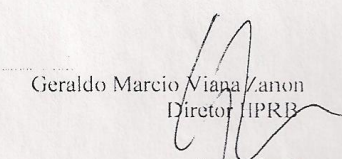
**Declaração**

Declaramos, para os devidos fins, que estamos de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "Avaliação do polimorfismo do gene da NO - sintase endotelial e da síntese de óxido nítrico na pré-eclâmpsia" da Faculdade de Farmácia da UFMG, utilizando os dados de prontuário de mulheres atendidas na Maternidade do Hospital Público Regional de Betim.

Betim, 02 de setembro de 2009

  
Denise da Silva Kattah  
Gerente Maternidade

*Denise da Silva Kattah*  
Enf. Obstetra - COREN 69065  
Gerente Divisão Serviço de Obstetrícia

  
Geraldo Marcio Viana Zanon  
Diretor HPRB

*Geraldo Marcio Viana Zanon*  
Diretor Geral - Hospital Público  
Regional de Betim



**ANEXO C - Parecer de aprovação CEP – Santa Casa**

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

Belo Horizonte, 27 de abril de 2009.

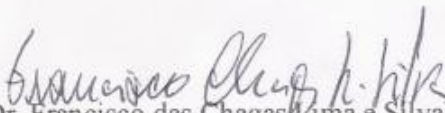
Interessada: Valeria Cristina Sandrim

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 novas 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 D – Parecer aprovação CEP - HOB**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Avaliação de Projeto de Pesquisa**

**FR:** 418196

**Número do Parecer:** 0681.0.000.216-11

**Título 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.

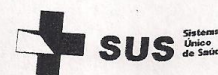
Data da reunião: 12 de maio de 2011

Atenciosamente,

  
**Ricardo Melo Marinho**  
Coordenador do CEP/HOB


**Anexo E – Declaração aprovação UBSF Guanabara**

Prefeitura Municipal de Betim  
Secretaria Municipal de Saúde  
Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara  
UBSF Guanabara

**Declaração**

Declaro, para os devidos fins, que estou de acordo com o desenvolvimento do projeto intitulado "Avaliação do polimorfismo do gene da NO-sintase endotelial e da síntese de óxido nítrico na pré-eclampsia" da Faculdade de Farmácia da UFMG, no posto de saúde UBSF Guanabara em Betim.

Betim, 4 de dezembro de 2009

  
Wilson Ribeiro de Meireles  
Enfermeiro

~~Wilson Ribeiro Meireles~~  
COREN MG 185143  
Gerente UBSF Guanabara

**ANEXO F – Parecer aprovação CEP - MOV****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:**

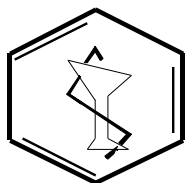
O Comitê de Ética em Pesquisa, (CEP/FHEMIG), aprovou no dia 07 de Agosto de 2008 o projeto de pesquisa intitulado, «Pré-Eclampsia e Polimorfismos nos Genes do Fator VII e do Receptor de Estrogênio».

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.

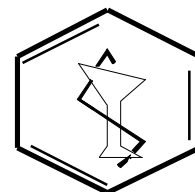
- Formulário CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – deverá ser assinado, pelo pesquisador responsável, nos espaços apropriados, e em seguida o NEP deverá encaminhar a este CEP/FHEMIG 02 (duas) vias devidamente assinadas, enquanto que a outra deverá ser entregue ao pesquisador responsável.

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

0023577/6.

**ANEXO G – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**PROJETO DE PESQUISA: “ PRÉ-ECLÂMPسيا PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO DE ADMA, GMPc E POLIMORFISMOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO”**

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 5mL 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/UFMG sob o nº 216/06.

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

Patrícia Nessralla Alpoim – telefone: 3409-6900

Comitê de Ética em Pesquisa – COEP: Av. Antônio Carlos, nº. 6627 – Pampulha – Campus UFMG, Unidade Administrativa II. CEP: 31270-901. Telefone: 3409-4592.

NOME:

Carteira de identidade: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Agradecemos sua valiosa participação!

## ANEXO H – Fichas clínicas grupos I, II e III

FICHA CLÍNICA			
Projeto: “PRÉ-ECLÂMPسيا PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO DE ADMA, GMPc E POLIMORFISMOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO”			
Data:			
Grupo 1: Pré-eclâmpسيا		Paciente nº:	
Diagnóstico de pré-eclâmpسيا dado em: ____/____/____			
Médico responsável:			
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
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:	
<b>3. Informações sobre a(s) gestação(ões)</b>			
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			





FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPRIA PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO DE ADMA, GMPc E POLIMORFISMOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO"			
Data:			
Grupo 2: Normotensas		Paciente nº:	
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Prontuário número:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
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:	
Pratica exercício físico? <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
Frequência:		Modalidade:	
<b>3. Informações sobre a(s) gestação(ões)</b>			
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:			
<b>4. Uso de medicamentos?</b> <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO			
SE SIM. Quais medicamentos?			
<b>5. Informações clínicas</b>			
Altura: _____ cm			
Peso: _____ Kg			
Ganho de peso na gravidez:			
Pressão arterial: _____/_____ mmHg			



FICHA CLÍNICA			
Projeto: "PRÉ-ECLÂMPSIA PRECOCE E TARDIA: AVALIAÇÃO DE ADMA, GMPc E POLIMORFISMOS DA SINTASE DO ÓXIDO NÍTRICO"			
Data:			
Grupo: 3 - Mulheres não gestantes		Paciente nº:	
<b>1. Identificação</b>			
Nome:			
Nacionalidade:		Naturalidade:	
Data de nascimento:		Idade:	
Estado civil:		Escolaridade:	
Endereço:			
Rua/Avenida:			
Número:		Complemento:	
Bairro:		Cidade:	
CEP:		Estado:	
Telefone: ( )			
<b>2. Anamnese</b>			
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)			
<b>3. Exame físico</b>			
Altura: _____ cm			
Peso: _____ Kg			
IMC:			
Pressão arterial: _____ / _____ mmHg			