



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

LEONARDO CAPISTRANO FERREIRA

**GENES CANDIDATOS DE SUSCETIBILIDADE À PRÉ-
ECLÂMPSIA: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO**

**NATAL
2010**

LEONARDO CAPISTRANO FERREIRA

**GENES CANDIDATOS DE SUSCETIBILIDADE À PRÉ-
ECLÂMPSIA: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Selma Maria Bezerra
Jerônimo.

**NATAL
2010**

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do Centro de
Biociências

Ferreira, Leonardo Capistrano.

Genes candidatos de suscetibilidade à pré-eclâmpsia: estudo de
associação / Leonardo Capistrano Ferreira. – Natal, RN, 2010.

82 f.

Orientadora: Selma Maria Bezerra Jerônimo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica.

1. Pré-eclâmpsia – Dissertação. 2. Associação genética – Dissertação. 3.
Doenças da gravidez – Dissertação. I. Jerônimo, Selma Maria Bezerra. II.
Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 618.4

LEONARDO CAPISTRANO FERREIRA

AGRADECIMENTOS

GENES CANDIDATOS DE SUSCETIBILIDADE À PRÉ-ECLÂMPsia: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em: 02/08/2010

BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Selma Maria Bezerra Jerônimo
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientadora



Profª. Drª. Maria Goretti Freire de Carvalho
Departamento de Medicina- UNP
1º Examinador



Profª. Drª. Tecia Maria de Oliveira Maranhão
Departamento de Toco-ginecologia – UFRN
2º Examinador

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, apoio, dedicação, esforço e confiança depositados em mim.

Aos professores e colegas de trabalho, por compartilharem seus conhecimentos comigo. Em especial à professora Selma M. B. Jerônimo e ao professor Carlos M. Gomes pela contribuição imensurável na minha formação profissional.

A todos da Maternidade Escola Januário Cicco, na pessoa da professora Ana Cristina P. F. de Araújo.

A todos os voluntários que consentiram em participar da pesquisa.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

*A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

RESUMO

A pré-eclâmpsia é uma doença multifatorial de etiologia ainda desconhecida que apresenta um amplo espectro quanto à gravidade dos sintomas, podendo variar da forma mais branda (pré-eclâmpsia leve) às formas mais severas (eclâmpsia e síndrome HELLP). Atualmente sabe-se que a pré-eclâmpsia é influenciada tanto por fatores ambientais quanto por fatores genéticos. Com o propósito de identificar genes de suscetibilidade à doença, genotipamos um total de 22 marcadores genéticos distribuídos em seis genes candidatos (ACVR2A, FLT1, ERAP1, ERAP2, LNPEP e CRHBP). Utilizando uma abordagem do tipo caso-controle, comparamos as frequências genotípicas entre mulheres normotensas (controles) e mulheres com pré-eclâmpsia (casos). O grupo dos casos foi dividido de acordo a forma clínica da doença em: pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP. Como resultado pôde-se constatar as seguintes associações genéticas: 1) ACVR2A e pré-eclâmpsia; 2) FLT1 e pré-eclâmpsia grave; 3) ERAP1 e eclâmpsia; 4) FLT1 e síndrome HELLP. Ao estratificar o grupo da pré-eclâmpsia de acordo com a gravidade dos sintomas (pré-eclâmpsia leve ou grave) ou de acordo com o tempo de início dos sintomas (pré-eclâmpsia precoce ou tardia), comprovamos que o grupo pré-eclâmpsia precoce está fortemente associado aos genótipos de risco. Nosso trabalho sugere que a pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP possuem bases genéticas distintas, embora o gene FLT1 pareça estar envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e síndrome HELLP.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia. Associação genética. SNP.

ABSTRACT

Preeclampsia is a multifactorial disease of unknown etiology that features with wide clinical symptoms, ranging from mild preeclampsia to severe forms, as eclampsia and HELLP syndrome. As a complex disease, preeclampsia is also influenced by genetic and environmental factors. Aiming to identify preeclampsia susceptibility genes, we genotyped a total of 22 genetic markers (single nucleotides polymorphisms – SNPs) distributed in six candidate genes (ACVR2A, FLT1, ERAP1, ERAP2, LNPEP e CRHBP). By a case-control approach, the genotypic frequencies were compared between normotensive (control group) and preeclamptic women. The case's group was classified according to the disease clinical form in: preeclampsia, eclampsia and HELLP syndrome. As results we found the following genetic association: 1) ACVR2A and preeclampsia; 2) FLT1 and severe preeclampsia; 3) ERAP1 and eclampsia; 4) FLT1 and HELLP syndrome. When stratifying preeclampsia group according to symptoms severity (mild and severe preeclampsia) or according to the time of onset (early and late preeclampsia), it was detected that early preeclampsia is strongly associated to risk genotypes. Our data suggest that preeclampsia, eclampsia and HELLP syndrome have different genetic bases, although FLT1 gene seems to be involved in preeclampsia and HELLP syndrome pathophysiology.

Key words: Preeclampsia. Genetic association. SNP.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Associação genética utilizando a abordagem de tagSNP.....	28
FIGURA 2 Estrutura dos haploblocos nos genes estudados.....	29
FIGURA 3 Técnica de SNaPshot®	33
FIGURA 4 Influência dos fatores genéticos e ambientais na etiologia e fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Distribuição dos fenótipos na população estudada.....	26
TABELA 2 Proporção dos subgrupos da pré-eclâmpsia na população estudada.....	27
TABELA 3 Descrição dos SNPs estudados.....	31
TABELA 4 Média da idade materna (anos) nos diferentes fenótipos.....	35
TABELA 5 Média do índice de massa corpórea (kg/m ²) nos diferentes fenótipos.....	35
TABELA 6 Proporção do número de primigestas nos diferentes fenótipos.....	36
TABELA 7 Idade gestacional no parto (semanas) nos diferentes fenótipos.....	36
TABELA 8 Associação genética com o grupo pré-eclâmpsia.....	37
TABELA 9 Associação genética com o grupo eclâmpsia.....	37
TABELA 10 Associação genética com o grupo síndrome HELLP.....	37
TABELA 11 Medida do LD no gene ACVR2A - D' statistic.....	38
TABELA 12 Medida do LD no gene ERAP2 - D' statistic.....	38
TABELA 13 Medida do LD no gene CRHBP - D' statistic.....	38
TABELA 14 Medida do LD no gene FLT1 - D' statistic.....	39
TABELA 15 Medida do LD no gene LNPEP - D' statistic.....	39
TABELA 16 Associação entre o haplótipo do gene ACVR2A e pré-eclâmpsi...	40
TABELA 17 Associação entre o haplótipo do gene ERAP2 e pré-eclâmpsia....	40
TABELA 18 Associação entre o haplótipo do gene CRHBP e pré-eclâmpsia...	40
TABELA 19 Associação entre o haplótipo do gene CRHBP e eclâmpsia.....	40
TABELA 20 Comparação dos dados demográficos entre os subgrupos de pré- eclâmpsia.....	41

TABELA 21 Comparação entre as associações genéticas encontradas nos diferentes subgrupos da pré-eclâmpsia.....	42
TABELA 22 Associação genética após a correção para testes múltiplos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

DHG	Doenças hipertensivas da gravidez
HELLP	Hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia
IMC	Índice de massa corpórea
KIR	Killer-immunoglobulin-like receptor
ILT	Immunoglobulin-like transcripts
NKG/CD94	C-type lectin heterodimer family
sEng	Endoglina solúvel
sFlt1	Receptor solúvel do fator de crescimento do endotélio vascular tipo 1
VEGFR1	Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular tipo 1
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
FLT1	Fator de crescimento do endotélio vascular
PIGF	Fator de crescimento placentário
ACVR2A	Receptor de activina A tipo 2
ERAP1	Aminopectidase 1 do retículo endoplasmático
ERAP2	Aminopectidase 2 do retículo endoplasmático
LNPEP	Aminopectidase <i>leucyl/cystinyl</i>
CRHBP	Proteína ligadora do hormônio liberador da corticotrofina
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
AST	Aspartato aminotransferase
LDH	Lactato desidrogenase
IFN-γ	Interferon-gama
TGF-β	Fator de crescimento transformante-beta
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
UPH	Unidade de parto humanizado
MEJC	Maternidade Escola Januário Cicco
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
LD	Desequilíbrio de ligação
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
CEU	<i>Utah residents with ancestry from northern and western Europe</i>
UTR	Região não traduzida
WTCCC	<i>Wellcome Trust Case Control Consortium</i>

PCR	Reação da polimerase em cadeia
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
PE	Pré-eclâmpsia
OR	<i>Odds ratio</i>
MAF	Frequência alélica menor
FasL	Ligante do Fas
NK	<i>Natural Killer</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Pré-eclâmpsia	15
1.2. Eclâmpsia	17
1.3. Síndrome HELLP	18
1.4. Genes Candidatos	19
1.4.1. FLT1	19
1.4.2. ACVR2A	20
1.4.3. ERAP1, ERAP2 e LNPEP	21
1.4.4. CRHBP	22
1.5. OBJETIVO GERAL	24
1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Desenho de Estudo	25
2.2. População de estudo	25
2.3. Coleta das amostras	27
2.4. Extração de DNA	27
2.5. Escolha dos marcadores genéticos	28
2.6. Genotipagem	32
2.7. Análises dos dados genéticos	34
2.8. Análises estatísticas	34
3. RESULTADOS	35
3.1. Características da população estudada	35
3.2. Análise de associação entre os marcadores genéticos e os fenótipos	36
3.3. Análise de desequilíbrio de ligação (LD) entre os marcadores	38
3.4. Análise dos haplótipos	39
3.5. Pré-eclâmpsia: um grupo heterogêneo	40
3.6. Associação genética após correção para testes múltiplos	42
4. DISCUSSÃO	44
4.1. Características da população	45
4.2. Genes candidatos	46
4.2.1. ACVR2A	46
4.2.2. FLT1	47
4.2.3. ERAP1, ERAP2 e LNPEP	48

4.2.4.	CRHBP	50
4.2.5.	Especulações e questionamentos	50
5.	CONCLUSÃO	55
	APÊNDICE	63
	Questionário de arrolamento	63
	Descrição das frequências alélicas dos SNPs nos diferentes grupos estudados	73
	Associação genética entre os haplótipos e os diferentes subgrupos de pré-eclâmpsia	80
	Primers para PCR	81
	Primers de SNaPshot	14

1. INTRODUÇÃO

As doenças hipertensivas da gravidez (DHGs) podem ser classificadas em: hipertensão crônica, pré-eclâmpsia, eclâmpsia, pré-eclâmpsia superposta à hipertensão crônica e hipertensão gestacional, conforme sugerido por consenso americano (2000). A pré-eclâmpsia pode evoluir para eclâmpsia, quando ocorre um quadro convulsivo, e síndrome HELLP (acrônimo em inglês para hemólise, elevação das enzimas hepáticas e plaquetopenia), consideradas formas graves da doença e associadas à elevada morbidade materna. Essas doenças apresentam características distintas quanto à gravidade, incidência, fatores de risco, etiologia e mecanismos fisiopatológicos. As DHGs representam um modelo de doenças multifatoriais complexas, na qual a interação entre fatores ambientais e genéticos parece determinar o surgimento e o grau de severidade da doença.

As causas que levam uma mulher a desenvolver pré-eclâmpsia, eclâmpsia ou síndrome HELLP ainda são desconhecidas. Atualmente, são conhecidos vários fatores de riscos que, claramente, contribuem para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. A história familiar de DHG como fator de risco reforça a hipótese de que existe um componente genético influenciando o desenvolvimento destas doenças. A busca pelo “gene da pré-eclâmpsia” têm se mostrado uma tarefa extremamente árdua para os pesquisadores. Diferentes abordagens vêm sendo utilizadas na tentativa de se identificar as bases genéticas da pré-eclâmpsia, sendo a maior parte dos trabalhos do tipo estudos de associação, utilizando marcadores genéticos isolados em genes de interesse, no entanto, todo esse esforço tem sido marcado pela grande inconsistência nos resultados obtidos (MUTZE et al., 2008).

Neste trabalho centramos os esforços na tentativa de identificar genes de suscetibilidade materna à pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP, por considerar que essas doenças podem apresentar diferenças com relação às suas bases genéticas, já que possuem mecanismos fisiopatológicos distintos.

1.1. Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma doença específica da gravidez humana, caracterizada pelo surgimento de hipertensão arterial (pressão sistólica > 140mmHg ou pressão diastólica > 90mmHg) e proteinúria (≥ 300 mg em urina de 24 horas) a partir da 20ª semana de gestação. Pré-eclâmpsia é a desordem hipertensiva mais comum durante a gravidez, afetando anualmente 3-5% das gravidezes no mundo (HOGBERG, 2005), sendo um problema de saúde pública importante, principalmente nos países em desenvolvimento, onde sua incidência varia de 7-13% de todas as gestações (GAIO et al., 2001). No Brasil há um aparente aumento no número de casos. De acordo com um estudo conduzido pelo nosso grupo, a incidência de pré-eclâmpsia em um bairro da cidade de Natal, RN chega a 13% (Melo e colaboradores, manuscrito submetido). As complicações da pré-eclâmpsia para o feto/neonato incluem prematuridade iatrogênica, restrição do crescimento fetal, oligodrâmnio e risco aumentado de morte perinatal. Entretanto, as reais implicações em uma criança nascida de uma pré-eclâmpsia ainda não são totalmente conhecidas. Um estudo na Austrália mostrou um aumento em desordens do humor em crianças nascidas de gravidez com pré-eclâmpsia (ROBINSON et al., 2009).

Dentre os fatores de risco que influenciam o desenvolvimento da pré-eclâmpsia estão: obesidade, índice de massa corpórea elevada (IMC) antes da gravidez e ganho de peso excessivo durante a gravidez (MBAH et al., 2010; WALSH, 2007). A pré-eclâmpsia é mais freqüente na primeira gravidez, embora o efeito protetor da multiparidade pareça ser perdido com a troca de parceiro entre as gestações (NORIS; PERICO ; REMUZZI, 2005). A primiparidade está associada com um aumento de 2,4 vezes no risco de desenvolver pré-eclâmpsia (LUO et al., 2007). Ainda não estão elucidados os mecanismos que explicam a associação da obesidade e primiparidade com a pré-eclâmpsia. Idade materna elevada, hipertensão crônica, diabetes mellitus, doença renal, síndrome metabólica e coagulopatias também elevam o risco da mulher desenvolver pré-eclâmpsia (YOUNG; LEVINE ; KARUMANCHI, 2010).

Em uma gravidez normal, trofoblastos invadem a decídua materna, penetrando e substituindo células endoteliais das artérias espiraladas uterina.

Este processo favorece a perda da musculatura lisa adjacente às artérias uterinas, tornando-as mais dilatadas. Os trofoblastos expressam um repertório particular de moléculas de superfícies do tipo MHC de classe I: HLA-C, HLA-E e HLA-G, que interagem com receptores dos tipos KIR, ILT, NKG e CD160, expressos pelas células NK uterinas (TABIASCO et al., 2006). Foi demonstrado experimentalmente que as células NK da decídua desempenham um papel crucial no desenvolvimento da placenta, através da regulação de processos como a invasão trofoblástica e crescimento vascular (HANNA et al., 2006). Acredita-se que essa falha na conversão das artérias espiraladas uterinas resulta na persistência da hipóxia placentária levando a produção de fatores solúveis (sFlt1 e sEng) pela placenta. Esses fatores são os principais responsáveis pela disfunção endotelial materna que resulta na hipertensão, proteinúria e nas outras manifestações sistêmicas da pré-eclâmpsia (MUTTER ; KARUMANCHI, 2008; YOUNG ; LEVINE ; KARUMANCHI, 2010). É importante ressaltar que a deficiência no remodelamento das artérias uterinas não leva invariavelmente à pré-eclâmpsia; características similares são observadas em gravidezes com restrição de crescimento intra-uterino sem doença materna (CHAPPELL ; MORGAN, 2006).

A pré-eclâmpsia pode ser classificada de acordo com o período de surgimento dos sintomas em: pré-eclâmpsia precoce (sintomas antes de 34 semanas de gestação) ou pré-eclâmpsia tardia (sintomas após 34 semanas de gestação). A forma precoce está associada à desordem placentária, que resulta na condição de hipóxia com a liberação dos fatores que irão causar os sintomas maternos. A forma tardia surge a partir da interação de uma placenta normal com fatores maternos de predisposição à doença microvascular, como hipertensão e diabetes (REDMAN ; SARGENT, 2005). A distinção entre pré-eclâmpsia precoce e tardia se correlaciona com diferentes fatores de riscos, estando a forma precoce claramente associada à fatores genéticos (OUDEJANS et al., 2007).

Há décadas pesquisadores vêm tentando decifrar as bases genéticas envolvidas na pré-eclâmpsia. Estudos de varredura do genoma já foram realizados nas populações da Escócia (HAYWARD et al., 1992), Finlândia (LAIVUORI et al., 2003), Islândia (ARNGRIMSSON et al., 1999), Austrália/Nova Zelândia (MOSES et al., 2000) e Noruega (LACHMEIJER et al., 2001), no

entanto, vários *loci*, em diferentes cromossomos, foram encontrados com *lod score* sugestivo de associação. Adicionalmente, uma extensa lista de genes candidatos já foi pesquisada, porém, com resultados inconsistentes (MUTZE et al., 2008). Foi realizado um estudo de associação em uma população Chilena através da genotipagem de 775 SNPs distribuídos em 190 genes candidatos, e, após avaliar os genótipos materno e da prole, nenhum gene esteve associado à pré-eclâmpsia (GODDARD et al., 2007). Vale ressaltar que nos últimos anos o grupo liderado por Moses vem demonstrando de maneira consistente uma possível associação entre os genes ACVR2A e ERAP2 com a pré-eclâmpsia nas populações da Austrália e Noruega (FITZPATRICK et al., 2009; JOHNSON et al., 2009; ROTEN et al., 2009). A maior parte desses trabalhos tem centrado na investigação de genes maternos de suscetibilidade, apesar de sabermos que os genes fetais podem agir modificando a penetrância dos genes maternos (CHAPPELL ; MORGAN, 2006). Nesse contexto, Hiby e colaboradores demonstraram que a combinação dos genótipos KIR AA materno-HLAC2 fetal está associado com a pré-eclâmpsia e que a combinação desses genótipos entre a mãe e o parceiro está associada ao aborto recorrente (HIBY et al., 2004; HIBY et al., 2008).

1.2. Eclâmpsia

A eclâmpsia é definida como a ocorrência de convulsão em uma mulher com pré-eclâmpsia (2000) e apresenta uma incidência de 5-7 casos por 10000 nascimentos nos EUA, podendo variar de 1,6 a 12 casos por 1000 nascidos vivos, na Colômbia e Índia, respectivamente (NORIS ; PERICO ; REMUZZI, 2005). Estima-se que 2% dos casos de pré-eclâmpsia evolua para eclâmpsia (YOUNG ; LEVINE ; KARUMANCHI, 2010), no entanto, alguns autores sugerem que a eclâmpsia é um subtipo da pré-eclâmpsia e não uma progressão da doença (KATZ; FARMER ; KULLER, 2000), já que 20% das mulheres que desenvolvem eclâmpsia não apresentam proteinúria e pelo menos um terço dos casos de eclâmpsia pós-parto ocorrem sem a manifestação de nenhum sintoma da pré-eclâmpsia (NORAIHAN; SHARDA ; JAMMAL, 2005; SIBAI, 2005). Há mais de 80 anos o sulfato de magnésio vem sendo usado como principal droga anticonvulsivante na prevenção à eclâmpsia

nos EUA (SIBAI, 2004), e isso pode ter modificado a história natural dessa doença. Entretanto, evidências com relação ao risco-benefício da profilaxia com sulfato de magnésio em mulheres com pré-eclâmpsia leve permanece incerta e, portanto, não se justifica seu uso de rotina para este propósito (SIBAI, 2004).

Assim como na pré-eclâmpsia, pouco se sabe sobre as causas e os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na eclâmpsia. Reduzida idade materna, primiparidade e história familiar de DHG são considerados importantes fatores de risco para a doença. A encefalopatia hipertensiva (vasoespasmos e edema cerebral) tem sido apontada como a principal causa da convulsão na eclâmpsia, embora a ação sistêmica de alguns fatores (neuroquinina B, citocinas pró-inflamatórias e ativador de plasminogênio tecidual), principalmente em nível de sistema nervoso central, possa contribuir para a patogênese da convulsão na eclâmpsia (WASSEFF, 2009).

1.3. Síndrome HELLP

A síndrome HELLP- *Hemolysis Elevated Liver enzymes Low Platelets* - ocorre em cerca de 0,5 a 0,9% de todas as gravidezes e em 10 a 20% dos casos de pré-eclâmpsia severa (HARAM; SVENDSEN ; ABILDGAARD, 2009). Embora seja considerada uma variante severa da pré-eclâmpsia, a síndrome HELLP pode se desenvolver em mulheres sem os sintomas prévios de pré-eclâmpsia (hipertensão e proteinúria) (JOSHI et al., 2010). O diagnóstico laboratorial pode ser estabelecido de acordo com a classificação de dois sistemas: Tennessee e Mississippi (JOSHI et al., 2010). Esses sistemas se baseiam no aumento dos níveis séricos das enzimas AST (*aspartate aminotransferase*): mede lesão hepática; e LDH (*lactate dehydrogenase*): consequência da anemia hemolítica microangiopática. Outro parâmetro utilizado é a contagem de plaquetas. Os sintomas clínicos típicos são dor epigástrica, náusea, vômito e, menos freqüente, dor de cabeça e sintomas visuais (HARAM ; SVENDSEN ; ABILDGAARD, 2009).

Idade materna elevada, multiparidade e origem étnica branca são alguns dos poucos fatores de riscos conhecidos para a síndrome HELLP (JOSHI et al., 2010). Pacientes com história de síndrome HELLP apresentam um risco

elevado para pré-eclâmpsia e HELLP na gravidez subsequente, assim como uma propensão ao desenvolvimento de hipertensão crônica e depressão a longo prazo (HABLI et al., 2009). Assim como na pré-eclâmpsia, também acredita-se que deva existir um componente genético influenciando o desenvolvimento da síndrome HELLP. No entanto, estudos genéticos de varredura do genoma e perfil de expressão gênica (*micorarray*) sugerem que a síndrome HELLP apresenta bases genéticas distintas da pré-eclâmpsia (BUIMER et al., 2008; LACHMEIJER et al., 2001). As formas solúveis dos receptores VEGFR1 (sFlt1) e endoglina (sEng) tem sido apontada como os principais marcadores angiogênicos envolvidos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e síndrome HELLP (VENKATESHA et al., 2006; ZHOU et al., 2002). Esses achados tornam os genes FLT1 e ENG candidatos interessantes para estudos de associação genética (MUTZE et al., 2008).

1.4. Genes Candidatos

1.4.1. FLT1

O receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR1/Flt1) apresenta estrutura típica de um receptor tirosina quinase, com cerca de 180 kDa, apresentando sete domínios *Ig-like* na região extracelular e um domínio tirosina quinase intracelular (SHIBUYA, 2001). O transcrito Flt1 pode ser processado de maneira alternativa, gerando o receptor integral de membrana (Flt1) ou a forma solúvel da proteína (sFlt1). FLT1 desempenha um papel central na regulação da angiogênese, tanto como um regulador negativo, através do seqüestro do VEGF/PlGF via ligação do sFlt1, quanto como regulador positivo, pela sinalização de migração/proliferação via atividade tirosina quinase do Flt1. A regulação do processamento do Flt1 parece ser essencial para a atuação adequada do sistema VEGF em condições fisiológicas. Recentemente, Thomas e colaboradores identificaram sequências sinais de poli-adenilação e elementos *cis* adjacentes dentro do intron 13 como os principais determinantes do balanço final Flt1/sFlt1, agindo através da regulação do processamento alternativo do transcrito Flt1 (THOMAS et al., 2010).

A função do Flt1 na gravidez tem sido bastante estudada nos últimos anos. A placenta é a principal fonte de sFlt1 durante a gravidez, embora já tenha sido detectado a produção de sFlt1 em células mononucleares do sangue periférico (RAJAKUMAR et al., 2005). Estudos de expressão gênica, bem como a avaliação dos níveis séricos de sFlt1 ao longo da gravidez, tem relacionado altos níveis de sFlt1 com a pré-eclâmpsia (LEVINE et al., 2004; TSATSARIS et al., 2003). A disfunção endotelial da pré-eclâmpsia pode ser resultado do excesso na neutralização do VEGF e PlGF pelo sFlt1 circulante (FERRARA; GERBER ; LECOUTER, 2003). Embora existam sólidas evidências para o papel do gene FLT1 na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, poucos estudos de associação genética tem sido relatados, sem evidência de associação até o momento (KIM et al., 2008; MUETZE et al., 2010).

1.4.2. ACVR2A

O gene ACVR2A codifica o receptor tipo II da activina A, uma proteína homodimérica membro da superfamília do TGF- β . Esta superfamília de proteínas está intimamente relacionada a eventos de remodelamento tecidual e processos reprodutivos (JONES et al., 2006b). Três activinas – A, B e C – já foram identificadas em tecidos humanos, sendo a activina A a forma encontrada predominantemente durante a gravidez (FOWLER et al., 1998). Activina A, ao contrário do TGF- β , promove a migração e diferenciação dos trofoblastos, sugerindo que o balanço relativo entre membros da superfamília do TGF- β modula o processo de decidualização (NATALE et al., 2009). A placenta produz activina A ao longo da gravidez, o que tem revelado o papel potencial dessa proteína como marcador no soro de mulheres com patologias placentárias, como a pré-eclâmpsia (MUTTUKRISHNA et al., 1997).

Moses e colaboradores fizeram uma análise minuciosa de uma população da Austrália e Nova Zelândia, em busca de genes que estivessem relacionados à pré-eclâmpsia. Após a varredura do genoma, eles obtiveram evidência sugestiva de ligação no cromossomo 2 (LOD = 2,58) e no cromossomo 11q23-24 (LOD = 2,02) (MOSES et al., 2000). O grupo designou o *locus* 2p de “PREG1”. Arngrímsson e colaboradores em estudos realizados com uma população da Islândia também identificaram um *locus* de

suscetibilidade materna no cromossomo 2p13 (ARNGRIMSSON et al., 1999). A análise detalhada do locus 2q, utilizando a abordagem de priorização de genes candidatos, integrando ferramentas de bioinformática quantitativa, expressão gênica (*microarray*) e análise de associação de SNPs, apontou os genes ACVR2A e ACVR1C como os principais candidatos (MOSES et al., 2006). Estudos posteriores demonstraram a associação entre o gene ACVR2A e pré-eclâmpsia em uma população da Noruega (ROTEN et al., 2009), porém sem validação para a população da Austrália/Nova Zelândia (FITZPATRICK et al., 2009). Portanto, torna-se necessário a realização de outros estudos em diferentes populações para confirmar a associação genética entre o ACVR2A e a pré-eclâmpsia.

1.4.3. ERAP1, ERAP2 e LNPEP

Os genes ERAP1 (ARTS-1 ou A-LAP), ERAP2 (L-RAP) e LNPEP (P-LAP ou CAP) codificam aminopeptidases, que são enzimas essenciais nos processos de ativação, modulação e degradação de peptídeos bioativos, assim como na maturação e estabilidade de proteínas. Essas enzimas agem hidrolisando substratos protéicos e peptídeos e são encontradas em diferentes tipos celulares, sugerindo uma importante participação em diferentes processos biológicos (SHIBATA et al., 2004).

Aminopeptidase-1 do retículo endoplasmático (ERAP1) está envolvida com o processamento e apresentação de antígenos a moléculas de MHC-I, através da degradação de proteossomas com a produção de epítomos de 8 a 9 resíduos de aminoácidos (SHIBATA et al., 2004). A indução da ERAP1 pelo interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) é particularmente importante na geração e apresentação de epítomos ao MHC de classe I (SARIC et al., 2002). Outra importante característica da ERAP1 é sua capacidade de degradar a angiotensina II/III, o que sugere a participação dessa enzima na regulação da pressão arterial (HATTORI et al., 2000).

Aminopeptidase-leucina placentária (P-LAP ou LNPEP) exerce funções importantes durante a gravidez, como a regulação da pressão arterial e das contrações uterinas durante o trabalho de parto. Essas funções estão relacionadas à capacidade dessa enzima degradar a ocitocina, um hormônio

peptídico uterotônico; a vasopressina e a angiotensina III (MITSUI et al., 2004). A LNPEP é uma proteína transmembrana, mas que também pode ser encontrada na sua forma solúvel, e isto parece ser regulado por processos pós-traducionais e não por *splicing* alternativo do RNAm (NOMURA et al., 2005). Durante uma gravidez normal a atividade da LNPEP aumenta gradualmente até próximo a termo, o que está associado à manutenção da homeostase na gravidez assim como ao início do trabalho de parto. Na pré-eclâmpsia leve a atividade da P-LAP encontra-se pouco elevada, enquanto que na pré-eclâmpsia severa sua atividade é reduzida acentuadamente (MITSUI et al., 2004).

Utilizando uma abordagem de ligação baseada em componentes de variância, Johnson e colaboradores re-analisaram os dados da varredura do genoma realizada anteriormente na população da Austrália/Nova Zelândia (MOSES et al., 2000), e identificaram dois novos *loci* com forte evidência de ligação nos cromossomos 5q (LOD 3,12) e 13q (LOD 3,10). A busca por genes nessas regiões cromossômicas resultou na identificação de três genes no cromossomo 5q: ERAP1, LNPEP e CRHBP. Já no cromossomo 13q, genes do colágeno tipo IV foram apontados como candidatos (COL4A1 e COL4A2) (JOHNSON et al., 2007). Recentemente foi publicado um estudo demonstrando a associação entre o gene ERAP2 e a pré-eclâmpsia nas populações da Austrália/Nova Zelândia e Noruega (JOHNSON et al., 2009). Adicionalmente, já foi descrito a associação entre polimorfismos no gene ERAP1 e hipertensão essencial, em uma população Japonesa (YAMAMOTO et al., 2002).

1.4.4. CRHBP

O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é um neuropeptídeo de 41 aminoácidos que age como regulador chave da resposta ao estresse no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e parece estar relacionado com diversos processos biológicos, incluindo reações imunológicas e inflamatórias (SEHRINGER et al., 2004). Os genes CRH, CRH-R1 e CRH-R2 (receptores do CRH) e o CRHBP (proteína ligadora do CRH) são expressos na placenta humana, decídua, membrana fetal, endométrio e miométrio (HILLHOUSE ; GRAMMATOPOULOS, 2002), o que reflete a importância dessas proteínas

durante a gravidez. O gene CRHBP codifica uma proteína que se liga especificamente ao hormônio liberador de corticotrofina, atenuando a atividade biológica do CRH. O CRH é produzido por trofoblastos e pela decídua materna e secretado na circulação, de modo que durante a gravidez o nível plasmático desse hormônio está aumentado, enquanto que a concentração de CRHBP encontra-se reduzida (KLIMAVICIUTE et al., 2006). Em modelo animal, foi demonstrado que a produção do CRH promove a implantação e a tolerância no início da gravidez, principalmente pela morte das células T ativadas via apoptose mediada por FasL (MAKRIGIANNAKIS et al., 2001). Estudos têm demonstrado que mulheres com pré-eclâmpsia apresentam níveis elevados de RNAm do CRH livres na circulação (NG et al., 2003; PURWOSUNU et al., 2007).

CRHBP é, potencialmente, um gene importante no desenvolvimento da gravidez e, portanto, pode estar envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Apesar de já ter sido apontado como um gene candidato de suscetibilidade materna à pré-eclâmpsia (JOHNSON et al., 2007), ainda não foram descritos estudos de associação genética envolvendo o CRHBP e a pré-eclâmpsia.

Nosso trabalho partiu da hipótese de que a pré-eclâmpsia, eclâmpsia e a síndrome HELLP apresentam bases genéticas distintas. Para investigar tal hipótese testamos a associação de marcadores genéticos com os diferentes fenótipos. A escolha dos genes candidatos alvos do nosso estudo foi baseada na literatura, porém a partir de diferentes abordagens. Todos os genes escolhidos estão diretamente relacionados à fisiopatologia da doença, nos seus diferentes aspectos (disfunção endotelial, controle da pressão sanguínea e disfunção placentária).

1.5. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal testar a associação entre polimorfismos em genes candidatos e a susceptibilidade materna à pré-eclâmpsia e suas variantes clínicas.

1.6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.6.1. Analisar marcadores (SNPs) dentro dos seguintes genes candidatos:

- ACVR2A (*activin A receptor*)
- CRHBP (*corticotropin releasing hormone-binding protein*)
- ERAP1 (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 1*)
- ERAP2 (*endoplasmic reticulum aminopeptidase 2*)
- LNPEP (*leucyl/cystinyl aminopeptidase*)
- FLT1 (*vascular endothelial growth factor receptor 1*)

1.6.2. Comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, assim como os dados demográficos, entre o grupo controle e os demais grupos estudados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desenho de Estudo

O estudo realizado foi do tipo caso-controle, no qual comparamos as frequências alélica e genotípica entre gestantes normotensas (controles) e gestantes com pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP.

2.2. População de estudo

A população de estudo é oriunda do estado do Rio Grande do Norte, Brasil, sendo os casos compostos por gestantes doentes internadas na Enfermaria de Alto Risco e os controles formados por gestantes com níveis pressóricos normais, internadas na Unidade de Parto Humanizado (UPH) da Maternidade Escola Januário Cicco (MEJC), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em virtude de alguma complicação da gravidez, como desproporção céfalo-pélvica. Os controles não tinham história atual ou pregressa de doença hipertensiva. Os dados clínicos, laboratoriais e sócio-econômicos foram obtidos através da aplicação de um extenso questionário (ver Apêndice) respondido pela paciente. Os critérios diagnósticos para a inclusão dos casos na pesquisa foram estabelecidos de acordo com a *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy*:

- **Pré-eclâmpsia:** pressão sistólica $>140\text{mmHg}$ ou diastólica $>90\text{mmHg}$ e proteinúria $\geq 0,3\text{g}$ em urina de 24 horas ou $\geq 1+$ na fita.
- **Eclâmpsia:** os mesmos sintomas da pré-eclâmpsia acrescidos de convulsão.
- **Síndrome HELLP:** LDH $\geq 600\text{u/l}$, bilirrubina total $\geq 1,2\text{mg/dl}$, AST $\geq 70\text{u/dl}$ e plaquetopenia ≤ 100000 plaquetas/ μl .

O grupo de mulheres com pré-eclâmpsia foi subdividido de acordo com dois aspectos:

- Gravidade dos sintomas
 - **Pré-eclâmpsia leve:** pressão sistólica $<160\text{mmHg}$ ou diastólica $<110\text{mmHg}$ e proteinúria $<2+$ na fita.

- **Pré-eclâmpsia grave:** pressão sistólica ≥ 160 mmHg ou diastólica ≥ 110 mmHg e proteinúria $\geq 2+$ na fita.
- Período de início dos sintomas
 - **Pré-eclâmpsia precoce:** surgimento dos sintomas antes da 34^a semana de gestação.
 - **Pré-eclâmpsia tardia:** surgimento dos sintomas após a 34^a semana de gestação.

Critérios de exclusão:

- Pacientes portadoras de doenças mentais, imunossupressoras, neoplasias, doenças infecciosas, diabetes e doenças cardíaca e renal.
- Mulheres cujos critérios estabelecidos tenham deixado dúvidas quanto ao resultado.
- Recusa da paciente em participar do estudo.

As tabelas 1 e 2 mostram a distribuição dos fenótipos dentro da população estudada.

Tabela 1 - Distribuição dos fenótipos na população estudada.

Fenótipos	Número	%
Controle	231	30,8
Pré-eclâmpsia	278	36,9
Eclâmpsia	51	6,8
HELLP	76	10,1
Total genotipados	636	84,6
HAS crônica ^e	65	8,6
Diabetes ^e	21	2,8
Doença renal ^e	14	1,9
Outros ^{*e}	16	2,1
Total de arrolamentos	752	100

*: Hipertireoidismo, hipotireoidismo, doença do coração e lúpus eritematoso sistêmico.

e: Pacientes excluídos das análises genéticas.

Tabela 2 - Proporção dos subgrupos da pré-eclâmpsia na população estudada.

Subgrupos da pré-eclâmpsia	Porcentagem (n)
PE leve	51,1% (142)
PE grave	48,9% (136)
PE precoce	18,4% (51)
PE tardia	81,6% (227)
PE total	100% (278)

2.3. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas pela equipe de enfermagem da MEJEC e pelos acadêmicos de medicina e enfermagem, pertencentes à base de pesquisa. Após o consentimento da paciente, foram retirados aproximadamente 20 ml de sangue periférico através de punção venosa.

2.4. Extração de DNA

A extração de DNA dos indivíduos foi realizada baseado na técnica descrita por Grimberg e colaboradores (GRIMBERG et al., 1989). Cerca de 8,0mL de sangue periférico foram colhidos em tubo contendo anticoagulante (EDTA) e transferidos para um tubo de 50mL, contendo 35mL da solução de lise de hemácias (NH_4Cl 1,3mM e NH_4CO_3 88,54mM) mantidos a 4°C, por 30-60 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 3000xg, 4° C, por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a camada leucocitária depositada no fundo do tubo ressuspensa em 5mL de tampão de lise de células brancas (TRIS 0,2M, SDS 1%, EDTA 10mM, pH 8,5). Após a lise dos leucócitos, adicionou-se 3,0 mL de acetato de amônio 5M, seguido de centrifugação a 3000xg, à temperatura ambiente, por 30-45 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico estéril de 15ml e adicionou-se álcool isopropílico num volume de 1:1, para precipitar o DNA. O DNA precipitado foi transferido para tubo cônico de microcentrifuga, lavado com etanol 70% e secado à temperatura ambiente. Por fim, o DNA foi solubilizado em 500µl de tampão TE pH 8,0 e quantificado por espectrofotometria a 260 nm. O DNA estoque foi diluído a 20ng/µl (concentração de uso) e armazenado a -20° C.

2.5. Escolha dos marcadores genéticos

Todas as variantes genéticas que analisamos foram do tipo polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). A escolha dos SNPs foi baseada em três fontes (ver tabela 3):

- **Projeto HapMap** (<http://www.hapmap.org/>): O Projeto Internacional HapMap é um esforço de cientistas e agências de fomento do Japão, Reino Unido, Canadá, China, Nigéria e Estados Unidos, que tem por objetivo identificar e catalogar variantes genéticas comuns presentes nos seres humanos. Estima-se que o número de SNPs ao longo do genoma humano seja em torno de 10 milhões. Quanto mais próximos esses SNPs estiverem uns dos outros maior será a chance deles estarem em Desequilíbrio de Ligação (LD), o que significa que serão herdados em conjunto (bloco). A combinação dos SNPs pertencentes ao mesmo bloco numa determinada região cromossômica é denominada Haplótipo. Nesse tipo de abordagem buscamos identificar a variante causal indiretamente, através da genotipagem de SNPs (tagSNPs) que estão em LD com as variantes que, de fato, estão associadas ao fenótipo estudado (Figura 1).

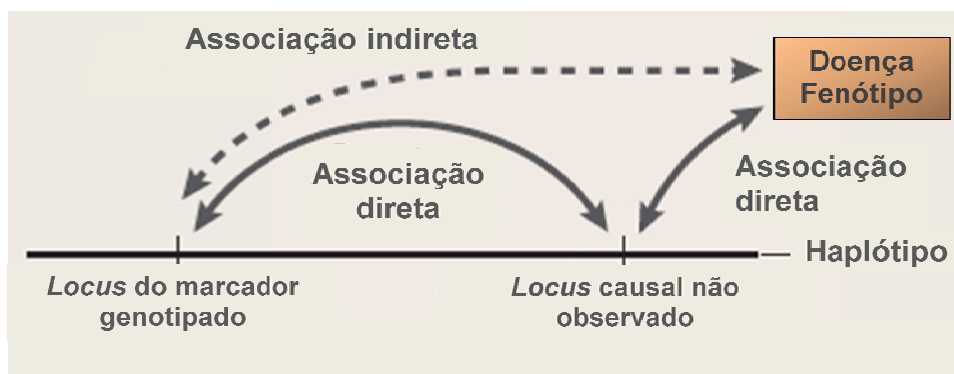


Figura 1 - Associação genética utilizando a abordagem de *tagSNP* (adaptado de BALDING, 2006).

A escolha dos *tagSNPs* foi feita a partir do banco de dados do HapMap, com o auxílio do programa Haploview. Selecionamos os dados referentes à população de ascendência Européia (CEU). A estrutura dos haploblocos e dos *tagSNPs* presentes em cada gene é mostrada na figura 2.



Figura 2 - Estrutura dos haploblocos nos genes estudados. As cores nos esquemas refletem o nível de ligação entre dois SNPs específicos, medido pelo valor de D' (vermelho- alto D' e branco-baixo D'). O painel superior mostra a estrutura dos haploblocos nos genes CRHBP, ACVR2A, ERAP2 e LNPEP. Esses genes variam em tamanho (CRHBP 16,6kb – LNPEP, 93,7kb), porém se assemelham quanto à estrutura dos haplótipos, apresentando um único haplobloco que compreende todo o gene. O painel inferior mostra a estrutura do gene FLT1. É um gene relativamente grande (192,8kb), possuindo 12 haploblocos em sua estrutura. Para este gene foram selecionados três SNPs, situados nos blocos 2, 8 e 11. Como pertencem a diferentes haploblocos, estes SNPs não estão em LD entre si.

- **Banco de dados do NCBI - *National Center for Biotechnology Information*** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>): Este banco de dados disponibiliza informações sobre os milhares de SNPs já descritos em diferentes espécies de organismos. As informações desse banco de dados foram utilizadas para escolher SNPs presentes nas regiões funcionais (exon, promotor, 5'UTR e 3'UTR) dos genes candidatos, alvos do presente estudo. Diferentemente da abordagem anterior (HapMap), aqui nós buscamos uma associação direta entre o SNP analisado e o fenótipo, por acreditar que a alteração funcional no gene pode influenciar no surgimento do fenótipo.

- **Dados da literatura:** Os marcadores presentes no gene ACVR2A foram escolhidos a partir dos estudos realizados pelo grupo de Moses. Partindo de um estudo de varredura do genoma em uma população da Austrália/Nova Zelândia, o grupo de Moses foi afunilando as regiões de busca pelo gene da pré-eclâmpsia através de estudos subseqüentes de *finemapping* e priorização de genes candidatos, resultando na identificação da região 2q22, que contém o gene ACVR2A (MOSES et al., 2006). Os trabalhos de Moses também identificaram a região 5q, contendo os genes candidatos ERAP1, ERAP2 e CRHBP (JOHNSON et al., 2007). Adicionalmente a essa informação, dois dos SNPs do gene ERAP1 foram escolhidos a partir do estudo multicêntrico realizado pelo Wellcome Trust Case Control Consortium, onde foi mostrada a associação entre esses SNPs e pacientes com espondilite anquilosante (BURTON et al., 2007). Por último, o SNP Rep53 no gene FLT1 foi escolhido a partir do trabalho de Menendez et al, onde foi demonstrado que essa variante integrava o sistema VEGF na rede transcricional da p53 (MENENDEZ et al., 2006).

Tabela 3 - Descrição dos SNPs estudados.

Gene	SNP	Alelo	Cromossomo (posição)	Região do gene	Heterozigosidade	Fonte
FLT1	Rep53	C/T	13 (29069265)	Promotor	ND	Menendez et al., 2005
	rs35832528	G/T	13 (9717885)	Exon 21	0,5	NCBI
	<u>rs56071338</u>	C/G	13 (9734382)	Intron 16	nd	NCBI
	rs9513095	T/C	13 (9788421)	Intron 12	0,542	HapMap
	rs17619037	A/G	13 (9711623)	Intron 25	0,351	HapMap
	rs7323184	T/C	13 (9859451)	Intron 3	0,103	HapMap
LNPEP	rs2303138	G/A	5 (91540423)	Exon 13	0,317	NCBI
	rs27300	T/C	5 (91553123)	Intron 16	0,424	HapMap
	rs38034	T/C	5 (91512233)	Intron 4	0,417	HapMap
ACVR2A	rs1424954	G/A	2 (140597886)	5' near	0,437	Moses et al., 2006
	rs1424941	G/A/C/T	2 (140640179)	Intron 1	0,317	Roten et al, 2008
	rs1014064	A/G	2 (140609270)	Intron 1	0,533	Roten et al, 2008
	rs2161983	T/C	2 (140646451)	Intron 1	0,525	Roten et al, 2008
	rs3768687	G/A	2 (140669388)	Intron 4	0,525	Roten et al, 2008
ERAP1	rs30187	T/C	5 (91314575)	Exon 11	0,479	WTCCC
	rs27044	G/C	5 (91309104)	Exon 15	0,45	WTCCC
ERAP2	rs2549796	C/T	5 (91435602)	Exon 14	0,433	HapMap
	rs2927609	C/T	5 (92136609)	Intron 17	0,393	HapMap
	rs11135484	A/G	5 (91412184)	Intron 2	0,367	HapMap
CRHBP	rs3792738	C/A	5 (71454445)	5' near	0,194	NCBI
	rs2174444	A/G	5 (71472183)	3' near	0,497	NCBI
	rs10055255	A/T	5 (71470654)	Intron 6	0,467	HapMap

ND – não disponível.

2.6. Genotipagem

A análise dos marcadores genéticos foi realizada pela técnica de SNaPshot® (Applied Biosystems), através da genotipagem de um total de 22 SNPs distribuídos em quatro painéis. Essa técnica permite a genotipagem de até 8 marcadores por reação. Através da reação em cadeia da polimerase (PCR) amplificamos a região do DNA que contém o SNP a ser genotipado. Em seguida os produtos das PCRs são submetidos a uma limpeza enzimática seguido da reação de SNaPshot® propriamente dita. Neste método os produtos de PCR são usados como molde para a adição de um único didesoxirribonucleotídeo marcado com fluoróforo na posição do sítio polimórfico. Para isso um terceiro oligonucleotídeo (primer de SNaPshot), além do par de primers da PCR, é usado para cada marcador. O primer de SNaPshot® é desenhado de modo a se anelar no produto de PCR na região exatamente anterior ao nucleotídeo polimórfico, de modo que quando a reação ocorrer, a DNA polimerase incorporará 1 nucleotídeo, exatamente correspondente ao sítio polimórfico (nucleotídeo na fita complementar). Como a reação de SNaPshot® utiliza didesoxirribonucleotídeos, após a colocação do primeiro nucleotídeo a reação pára e o produto de reação é o oligonucleotídeo de SNaPshot® mais o nucleotídeo marcado. O produto da reação é desnaturado em formamida (Formamide Hi-Di, Applied Biosystems) e submetido à eletroforese capilar em um analisador genético (ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer, Applied Biosystems). O dado gerado pelas corridas eletroforéticas é analisado através do software GeneMapper® (Applied Biosystems).

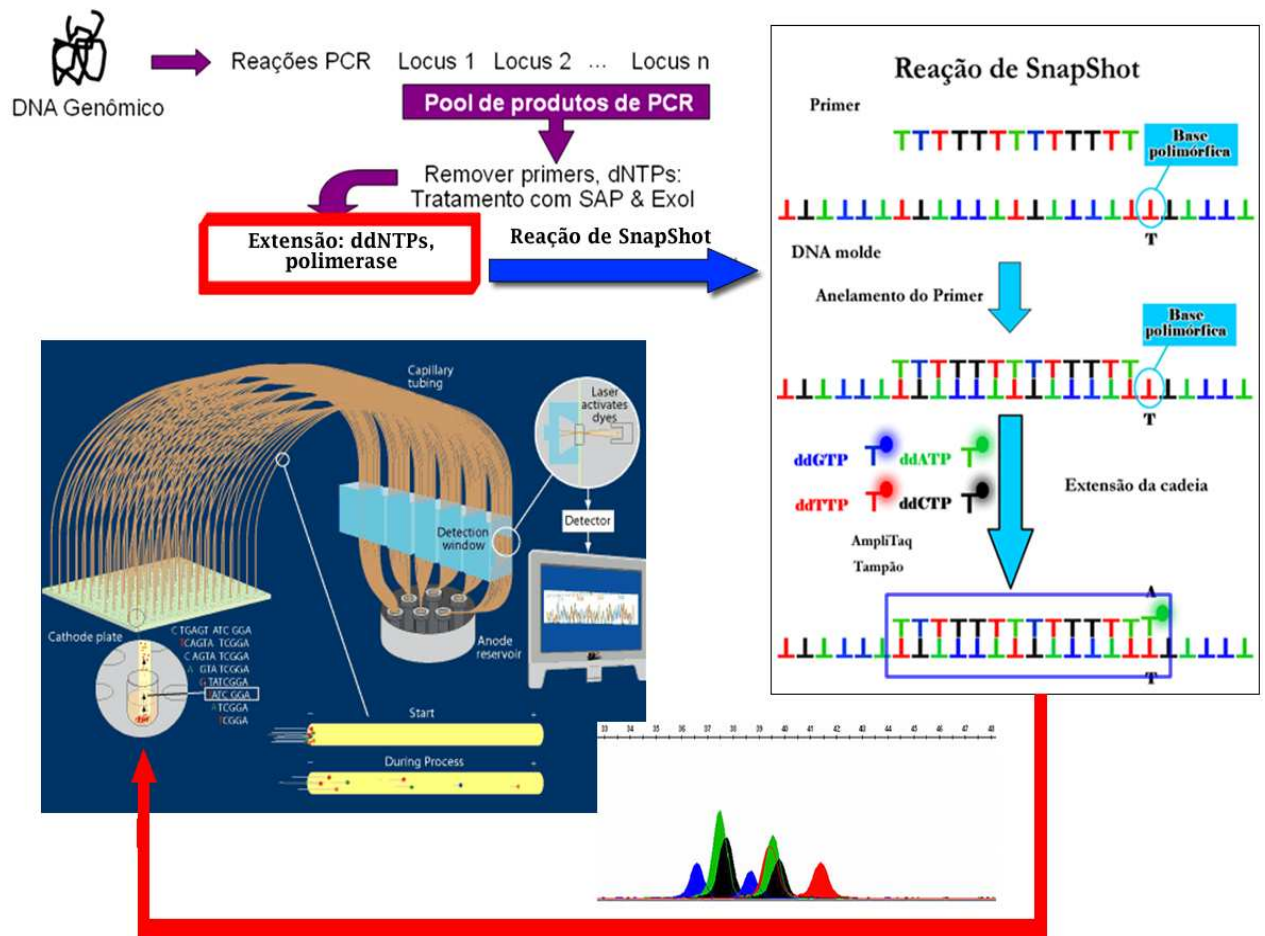


Figura 3 – Técnica de SNaPshot. Utilizando o DNA genômico como molde, é realizada uma PCR pra cada SNP a ser genotipado. É feito um *pool* de produtos de PCR por painel, seguido da limpeza enzimática com SAP e EXOI, com o objetivo de remover o excesso de nucleotídeos e primers não incorporados na reação. Após a limpeza, é feita a reação de SNaPshot, na qual é utilizado apenas didesoxiribonucleotídeos marcados com fluoróforos específicos pra cada base (A, T, C e G). Os primers de SNaPshot se anelam exatamente um nucleotídeo antes do sítio polimórficos, de modo que a DNA polimerase irá adicionar apenas o nucleotídeo polimórfico marcado, já que trata-se de um nucleotídeo de parada (didesoxiribonucleotídeo). Em seguida, o produto de SNaPshot é desnaturado e submetido a uma corrida eletroforética em capilar, em um analisador genético automatizado. Os fragmentos serão separados por tamanho e detectados de acordo com o comprimento de onda emitido pelo fluoróforo ligado à base polimórfica.

2.7. Análises dos dados genéticos

Todas as análises dos dados de genotipagem foram realizadas através dos programas SNPStats (SOLE et al., 2006) e SNPAnalyzer. O teste do qui-quadrado foi utilizado para investigar se os polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para analisar a associação genética entre genótipo e fenótipo, utilizamos o teste exato de Fisher, sob diferentes modelos de herança (recessivo, dominante, codominante, aditivo e superdominante). Na análise de múltiplos SNPs, foi utilizado o algoritmo EM (expectativa de maximização) para estimar a frequência dos haplótipos. A correlação estatística entre dois SNPs foi medida pelo D' , variando de -1 (SNPs não ligados) a 1 (SNPs em total desequilíbrio de ligação).

2.8. Análises estatísticas

Todos os testes foram realizados com a finalidade de comparar o grupo controle com os demais grupos separadamente (pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP). O número de gestações foi transformado em variável categórica (Primigesta vs Multigesta) e, portanto, analisada através do teste exato de Fisher. As variáveis quantitativas foram analisadas pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey para comparação múltipla das médias. Consideramos as diferenças estatisticamente significativas para as análises com $p < 0,05$. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.00.

3. RESULTADOS

3.1. Características da população estudada

As tabelas 4-7 comparam os dados demográficos entre o grupo controle e os grupos de casos, com os respectivos *P* valores. O grupo eclâmpsia apresentou menor média de idade materna (19,9 anos), enquanto o grupo de mulheres com síndrome HELLP a maior média (27,1 anos). O grupo de mulheres com pré-eclâmpsia foi o que apresentou a maior média do IMC (Controles: 23,3 kg/m² vs Pré-eclâmpsia: 24,8 kg/m², *p*<0,05). Conforme esperado, os grupos eclâmpsia e pré-eclâmpsia apresentaram maior proporção de primigestas, 73,1% e 53,5%, respectivamente, enquanto o grupo de mulheres com HELLP não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo controle (Controle: 39,7% vs HELLP: 42,8%). A média da idade gestacional no parto foi menor em todos os grupos estudados, quando comparado com o grupo controle, chamando a atenção para o grupo de mulheres com síndrome HELLP, que apresentou a menor média (34,4 semanas), o que reflete o grau de gravidade da doença.

Tabela 4 – Média da idade materna (anos) nos diferentes fenótipos.

	Controle	Pré-eclâmpsia	Eclâmpsia	HELLP
N	230	276	51	71
Média	24,6	25,0	19,9	27,1
Desv. Padrão	6,1	7,3	5,1	7,1
p Valor*	-	NS	< 0,05	< 0,05

* Teste de Tukey para comparação múltipla das médias do grupo controle com cada grupo caso.

Tabela 5 – Média do índice de massa corpórea (kg/m²) nos diferentes fenótipos.

	Controle	Pré-eclâmpsia	Eclâmpsia	HELLP
N	231	206	18	19
Média	23,3	24,8	23	24,3
Desv. Padrão	4,0	4,8	4,7	5,0
p Valor*	-	< 0,05	NS	NS

* Teste de Tukey para comparação múltipla das médias do grupo controle com cada grupo caso.

Tabela 6 – Proporção do número de primigestas nos diferentes fenótipos.

	Controle	Pré-eclâmpsia	Eclâmpsia	HELLP
N Total	229	267	52	77
Primigesta (%)	91 (39,7)	143 (53,5)	38 (73,1)	33 (42,8)
p Valor*	-	0,0022	< 0,0001	NS
Nº de gestação	2,2	2,2	1,3	2,3
Desv. Padrão	1,6	2,0	0,6	1,6
p Valor**	-	NS	< 0,05	NS

*Teste exato de Fisher comparando a proporção de primigestas no grupo controle com cada grupo caso.

** Teste de Tukey para comparação múltipla das médias do grupo controle com cada grupo caso.

Tabela 7 - Idade gestacional no parto (semanas) nos diferentes fenótipos.

	Controle	Pré-eclâmpsia	Eclâmpsia	HELLP
N	197	267	39	69
Média	39,1	37,1	36,7	34,4
Desv. Padrão	2,6	3,3	4,2	4,0
p Valor*	-	< 0,05	< 0,05	< 0,05

* Teste de Tukey para comparação múltipla das médias do grupo controle com cada grupo caso.

3.2. Análise de associação entre os marcadores genéticos e os fenótipos

Para testar a associação dos genes candidatos com as diferentes formas das doenças hipertensivas da gravidez (pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP), comparamos as frequências alélicas e genotípicas entre o grupo controle e os demais grupos de casos. Quatro marcadores não foram utilizados para os testes de associação: rs56071338 (monomórfico), Rep53 (MAF<2%), rs35832528 (MAF<2%) e rs1424941 (fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Nas tabelas abaixo se encontram descritos os SNPs que se mostraram associados com o fenótipo específico testado, além de apresentar informações sobre o modelo de herança, as frequências genotípicas e/ou alélicas, a Odds

Ratio e o valor de *P*. As tabelas com a descrição de todos os SNPs testados para os diferentes fenótipos encontram-se no Apêndice.

Tabela 8 - Associação genética com o grupo pré-eclâmpsia.

Gene	SNP	Modelo	Genótipos	Controle	Pré-eclâmpsia	OR (95% CI)	p
FLT1	rs9513095	Recessivo	TT/CT	221 (98,2%)	250 (94,3%)	-	0,021
			CC	4 (1,8%)	15 (5,7%)	3,31 (1,08-10,14)	
ACVR2A	rs2161983	Aditivo	C	177 (73%)	312 (66%)	-	0,039
			T	65 (27%)	164 (34%)	1,42 (1,01-2,00)	
	rs1424954	Aditivo	G	176 (75%)	323 (66%)	-	0,0089
			A	58 (25%)	165 (34%)	1,63 (1,12-2,36)	
	rs1014064	Recessivo	AA/GA	142 (94%)	223 (87,1%)	-	0,021
			GG	9 (6%)	33 (12,9%)	2,33 (1,08-5,03)	
CRHBP	rs2174444	Dominante	GG	44 (29,3%)	105 (41,3%)	-	0,015
			GA/AA	106 (70,7%)	149 (58,7%)	0,59 (0,38-0,91)	

Tabela 9 - Associação genética com o grupo eclâmpsia.

Gene	SNP	Modelo	Genótipos	Controle	Eclâmpsia	OR (95% CI)	p
FLT1	rs7323184	Recessivo	CC/CT	18 (31%)	5 (11,6%)	1,00	0,030
			TT	40 (69%)	38 (88,4%)	3,42 (1,15-10,13)	
ERAP1	rs30187	Superdominante	CC/TT	71 (48,3%)	35 (71,4%)	1,00	0,0043
			CT	76 (51,7%)	14 (28,6%)	0,37 (0,19-0,75)	
	rs27044	Superdominante	CC/GG	78 (52,7%)	34 (72,3%)	1,00	0,016
			CG	70 (47,3%)	13 (27,7%)	0,43 (0,21-0,87)	

Tabela 10 - Associação genética com o grupo síndrome HELLP.

Gene	SNP	Modelo	Genótipos	Controle	HELLP	OR (95% CI)	p
FLT1	rs7323184	Superdominante	TT/CC	42 (72,4%)	58 (86,6%)	1,00	0,048
			CT	16 (27,6%)	9 (13,4%)	0,41 (0,16-1,01)	
	rs9513095	Codominante	TT	142 (63,1%)	36 (46,8%)	1,00	0,0008
			CT	79 (35,1%)	32 (41,6%)	1,60 (0,92-2,77)	
			CC	4 (1,8%)	9 (11,7%)	8,87 (2,59-30,46)	

3.3. Análise de desequilíbrio de ligação (LD) entre os marcadores

A análise de desequilíbrio de ligação foi feita para os SNPs localizados no mesmo gene. A medida de LD utilizada foi o D' (quanto mais próximo de 1 for o valor de D' , mais fortemente ligados estarão os dois SNPs). De acordo com as tabelas abaixo, percebe-se claramente que os SNPs nos genes ACVR2A, ERAP2 e CRHBP (exceto o SNP rs3792738) estão em LD, enquanto que os SNPs no gene FLT1 não estão em LD e, portanto, são herdados de maneira independente.

Tabela 11 - Medida do LD no gene ACVR2A - D' statistic.

SNP	rs2161983	rs1014064	rs1424954	rs3768687
rs2161983	.	0.983	0.936	0.979
rs1014064	.	.	0.954	0.998
rs1424954	.	.	.	0.950
rs3768687	.	.	.	.

Tabela 12 - Medida do LD no gene ERAP2 - D' statistic.

SNP	rs2549796	rs2927609	rs11135484
rs2549796	.	0.999	0.961
rs2927609	.	.	0.991
rs11135484	.	.	.

Tabela 13 - Medida do LD no gene CRHBP - D' statistic.

SNP	rs3792738	rs2174444	rs10055255
rs3792738	.	0.425	0.506
rs2174444	.	.	0.985
rs10055255	.	.	.

Tabela 14 - Medida do LD no gene FLT1 - D' statistic.

SNP	rs9513095	rs17619037	rs7323184
rs9513095	.	0.016	0.169
rs17619037	.	.	0.018
rs7323184	.	.	.

Tabela 15 - Medida do LD no gene LNPEP - D' statistic.

SNP	rs2303138	rs27300	rs38034
rs2303138	.	0.958	0.999
rs27300	.	.	0.999
rs38034	.	.	.

3.4. Análise dos haplótipos

Haplótipo consiste na combinação de alelos em diferentes *loci* de um mesmo segmento cromossômico. As frequências dos haplótipos são estimadas através da implementação do algoritmo EM (expectativa de maximização) pelo programa SNPStats. As tabelas abaixo mostram os haplótipos associados ao fenótipo específico testado. Os haplótipos foram definidos de acordo com a distribuição de suas frequências dentro dos grupos:

Comum: haplótipo de maior frequência na população geral.

Risco: haplótipo de maior frequência no grupo dos casos.

Proteção: haplótipo de maior frequência no grupo dos controles.

Tabela 16 - Associação entre o haplótipo do gene ACVR2A e a pré-eclâmpsia.

Haplótipo	ACVR2A				Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs2161983	rs1014064	rs1424954	rs3768687	Total	PE total	Controle		
Comum	C	A	G	G	0,654	0,624	0,707	-	-
Risco	T	G	A	A	0,316	0,342	0,270	1,47 (1,07 - 2,03)	0,018

Tabela 17 - Associação entre o haplótipo do gene ERAP2 e a pré-eclâmpsia.

Haplótipo	ERAP2			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs2549796	rs2927609	rs11135484	Total	PE total	Controle		
Comum	T	C	G	0,484	0,470	0,508	-	-
Risco	C	C	G	0,056	0,071	0,034	2,23 (1,06 - 4,68)	0,036

Tabela 18 - Associação entre o haplótipo do gene CRHBP e a pré-eclâmpsia.

Haplótipo	CRHBP			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs3792738	rs2174444	rs10055255	Total	PE total	Controle		
Comum	C	G	A	0,488	0,507	0,458	-	-
Proteção	C	A	T	0,312	0,275	0,369	0,67 (0,48 – 0,94)	0,021

Tabela 19 - Associação entre o haplótipo do gene CRHBP e a eclâmpsia.

Haplótipo	CRHBP			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs3792738	rs2174444	rs10055255	Total	Eclâmpsia	Controle		
Comum	C	G	A	0,473	0,511	0,458	-	-
Risco	A	G	A	0,037	0,100	0,024	3,75 (1,11 – 12,66)	0,034

3.5. Pré-eclâmpsia: um grupo heterogêneo

A pré-eclâmpsia é uma doença que apresenta um espectro de sintomas variado. De acordo com parâmetros clínico-laboratoriais, a pré-eclâmpsia pode

ser classificada em leve ou grave. Alguns autores sugerem a classificação de acordo com o tempo de início dos sintomas, classificando a doença em pré-eclâmpsia precoce (sintomas antes da 34^a semana de gestação) ou tardia (sintomas após a 34^a semana de gestação). Analisamos separadamente os achados demográficos e genéticos, estratificando o grupo de pré-eclâmpsia total nesses quatro grupos (leve ou grave e precoce ou tardia) e observamos que a classificação da pré-eclâmpsia em precoce ou tardia sugere a melhor separação desses subgrupos do ponto de vista de suscetibilidade genética à doença.

A tabela 2 descreve a proporção dos subgrupos de pré-eclâmpsia, quando classificados de acordo com a gravidade ou o tempo de início dos sintomas. A análise dos dados demográficos mostrou que os grupos PE grave e PE precoce se comportam de maneira semelhante ao grupo controle, sugerindo que os fatores de risco estudados (idade materna, IMC e paridade) influenciam menos o surgimento da doença nesses grupos (tabela 20). No entanto, a análise dos dados genéticos demonstrou claramente que os genótipos de risco estão mais fortemente associados ao grupo PE precoce (5 SNPs e 2 haplótipos), enquanto que o grupo PE tardia esteve fracamente associado (apenas 1 SNP e 1 haplótipo). Por outro lado, 3 SNPs e 2 haplótipos estiveram associados com o grupo PE leve e 2 SNPs e 1 haplótipo com o grupo PE grave, o que reflete a heterogeneidade desses subgrupos (tabela 21). Em conjunto, as análises dos dados sugerem que as mulheres que apresentam suscetibilidade genética à doença estão sob maior risco de desenvolver os sintomas da pré-eclâmpsia antes da 34^a semana de gestação (PE precoce).

Tabela 20 - Comparação dos dados demográficos entre os subgrupos de pré-eclâmpsia.

Característica	PE total	PE leve	PE grave	PE tardia	PE precoce
Idade materna	24,9 (±7,3)	25,1 (±7,6)	24,9 (±7,1)	24,8 (±7,5)	25,6 (±7,2)
IMC	24,8 (±4,8)*	25,2 (±5,1)*	24,4 (±4,3)	24,9 (±4,8)*	24,4 (±4,8)
Primigesta	53,5%**	56,3%**	49,6%	56%**	43,1%

*p < 0,05 quando comparado com o grupo controle (Teste de Tukey para comparação múltipla das médias)

**p < 0,05 quando comparado com o grupo controle (Teste exato de Fisher)

Tabela 21 - Comparação entre as associações genéticas encontradas nos diferentes subgrupos da pré-eclâmpsia.

Marcador Genético	<i>P</i> valor OR (95% CI)				
	PE total	PE leve	PE grave	PE tardia	PE precoce
<i>FLT1</i>					
rs9513095	0,021 ^r 3,31 (1,08-10,14)	NS	0,0028 ^r 5,19 (1,62-16,67)	NS	0,0087 ^r 6,42 (1,66-24,90)
<i>ACVR2A</i>					
rs1424954	0,0089 ^{ad} 1,63 (1,12-2,36)	0,0048 ^d 2,07 (1,24-3,44)	NS	0,031 ^d 1,65 (1,04-2,61)	0,0018 ^{ad} 2,41 (1,37-4,23)
rs1014064	0,021 ^r 2,33 (1,08-5,03)	0,037 ^{ad} 1,48 (1,02-2,14)	0,014 ^r 2,78 (1,20-6,45)	NS	0,0023 ^{ad} 2,21 (1,32-3,72)
rs2161983	0,039 ^{ad} 1,42 (1,01-2,00)	0,017 ^{ad} 1,62 (1,08-2,41)	NS	NS	0,0017 ^d 3,37 (1,51-7,49)
rs3768687	NS	NS	NS	NS	0,018 ^{ad} 1,99 (1,11-3,57)
<u>Haplótipos*</u>					
<i>ACVR2A</i> (risco)	0,018 1,47 (1,07 - 2,03)	0,024 1,56 (1,06-2,28)	NS	NS	0,0016 2,38 (1,40-4,06)
<i>ERAP2</i> (risco)	0,036 2,23 (1,06 - 4,68)	NS	0,021 2,69 (1,16-6,20)	NS	0,0046 4,24 (1,58-11,39)
<i>CRHBP</i> (proteção)	0,021 0,67 (0,48-0,94)	0,014 0,58 (0,38-0,90)	NS	0,037 0,68 (0,47-0,98)	NS

*As tabelas com as frequências dos haplótipos estão descritas no apêndice.

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

3.6. Associação genética após correção para testes múltiplos

Com o objetivo de diminuir a probabilidade de associação ao acaso, ajustamos o valor de *P* de acordo com o número de testes independentes realizados. Para aplicar essa correção consideramos apenas os SNPs que se comportaram de maneira independente. De acordo com as tabelas 11-14, os marcadores nos genes *ACVR2A*, *ERAP2* e *CRHBP* estão em desequilíbrio de ligação ($D' > 0,9$) e, portanto, são herdados em blocos. Adicionalmente os marcadores rs56071338, Rep53, rs35832528 e rs1424941 foram excluídos das

análises genéticas já que estão fora do equilíbrio de Hardy-Weimberg. Portanto, consideramos um número efetivo de 10 SNPs para correção, o que gerou como *threshold* um $p < 0,005$ ($P_{\text{corrigido}} = 0,05/10$). A tabela 22 descreve os SNPs que permaneceram associados após a correção para testes múltiplos.

Tabela 22 - Associação genética após a correção para testes múltiplos.

Fenótipo	Gene (SNP associado)
PE leve	ACVR2A (rs1424954)
PE grave	FLT1 (rs9513095)
PE precoce	ACVR2A (rs1424954, rs1014064 e rs2161983) ERAP2 (haplótipo de risco)
Eclâmpsia	ERAP1 (rs30187)
HELLP	FLT1 (rs9513095)

4. DISCUSSÃO

A pré-eclâmpsia é uma doença multifatorial de etiologia ainda desconhecida com ampla variação no seu espectro de sintomas. A influência de fatores ambientais, juntamente com a predisposição genética, parece ser determinante para o grau de severidade da doença. Nossos dados sugerem que eclâmpsia e síndrome HELLP, consideradas variantes severas da pré-eclâmpsia, apresentam etiologia distinta, sendo influenciada por diferentes fatores ambientais e genéticos. Nosso trabalho também reforça a idéia de que a pré-eclâmpsia é uma doença heterogênea, apresentando diferentes causas de acordo com o período de início e gravidade dos sintomas.

Nosso estudo com genes candidatos identificou a associação dos genes ACVR2A e FLT1 com a pré-eclâmpsia. Outros estudos utilizando populações da Austrália, Nova Zelândia e Noruega já haviam demonstrado a associação do gene ACVR2A com a pré-eclâmpsia (FITZPATRICK et al., 2009; ROTEN et al., 2009), o que reforça a hipótese de que esse gene realmente desempenha um papel importante nessa doença, por tratar-se de validações em populações com *background* genético totalmente distinto. A eclâmpsia, apesar de ser considerada uma forma severa da pré-eclâmpsia, não esteve associada com o gene ACVR2A, e sim com o gene ERAP1, sugerindo que essas doenças podem apresentar bases genéticas distintas. Outro importante achado do nosso trabalho foi a forte associação entre o gene FLT1 e a síndrome HELLP. Observando as frequências alélicas e genotípicas das mulheres com síndrome HELLP percebe-se claramente que trata-se de um grupo totalmente distinto dos demais, reforçando a hipótese de que a síndrome HELLP possui etiologia diferente da pré-eclâmpsia.

As mulheres que apresentaram co-morbidades como diabetes, hipo ou hipertireoidismo, hipertensão crônica, doenças renal e cardíaca foram excluídas das análises genéticas. Esse cuidado foi tomado pelo fato de muitas dessas doenças serem multifatoriais e apresentarem um componente genético influenciador, o que poderia introduzir um viés nas análises genéticas. Para correção de testes múltiplos foi utilizado a abordagem clássica (frequentista), na qual o valor de P é ajustado de acordo com o número de testes realizados.

No entanto, levamos em conta o fato de que SNPs em desequilíbrio de ligação não se comportam de maneira independente. É importante ressaltar que todos os genes estudados são potencialmente relevantes na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, o que, do ponto de vista *Bayesiano*, aumenta a probabilidade *a priori* de associação, garantindo maior poder aos testes.

4.1. Características da população

Atualmente vários fatores de risco são conhecidos para pré-eclâmpsia: gravidez múltipla, diabetes, história prévia de pré-eclâmpsia, nuliparidade, IMC elevado antes da gravidez, idade materna elevada, doença renal, hipertensão e presença de anticorpos antifosfolipídios (DUCKITT ; HARRINGTON, 2005). Já para a síndrome HELLP os principais fatores de risco são: idade materna avançada, multiparidade e origem étnica branca (JOSHI et al., 2010). Alguns trabalhos apontam a baixa idade materna (<20 anos) e a primiparidade como os principais fatores de risco para eclâmpsia (BI-SAID et al., 1995; MAYI-TSONGA et al., 2006).

Os dados do nosso estudo referentes à idade materna, paridade e IMC estão de acordo com os dados da literatura. Quando comparamos a idade materna entre os diferentes grupos, observamos que o grupo de mulheres com síndrome HELLP apresentou a maior média, 27 anos, enquanto que o grupo eclâmpsia apresentou a menor média, 19 anos. A quantidade de primigestas nos grupos PE total (53,5%) e eclâmpsia (73%) foram bem maiores quando comparadas com o grupo controle (39%). Não houve diferença significativa quanto ao número de primigestas entre o grupo de mulheres com HELLP e o grupo controle, já que a multiparidade é fator de risco para síndrome HELLP. Interessantemente, quando subdividimos o grupo pré-eclâmpsia total de acordo com a gravidade ou tempo de início dos sintomas encontramos que os subgrupos PE grave e PE precoce parecem ser pouco influenciados pelos fatores ambientais, já que não houve diferença significativa nos dados demográficos analisados, quando comparados com o grupo controle (ver tabela 20). Já os grupos PE leve e PE tardia parecem ser mais influenciados pelos fatores ambientais, como IMC e paridade.

4.2. Genes candidatos

4.2.1. ACVR2A

Nossos resultados demonstram a clara associação entre o gene ACVR2A e a forma precoce da pré-eclâmpsia. Quando analisamos o grupo pré-eclâmpsia total, três marcadores estiveram associados com esse fenótipo (rs1424954, rs1014064 e rs2161983). No entanto, ao analisarmos o grupo pré-eclâmpsia de acordo com a gravidade dos sintomas (leve ou grave) ou de acordo com o período de surgimento dos sintomas (precoce ou tardia), concluímos tratar-se de subgrupos distintos do ponto de vista da suscetibilidade genética. O subgrupo PE precoce apresentou uma alta frequência dos genótipos de risco, como demonstrado pela forte associação para os quatro marcadores testados (ver Tabela 21). Por outro lado, apenas um marcador esteve associado com o grupo PE tardia. Adicionalmente, o haplótipo formado pelos alelos de risco também foi encontrado numa maior proporção nas mulheres com PE precoce quando comparado com o grupo controle ($p=0,0016$). Não foi encontrada associação entre o gene ACVR2A e os fenótipos síndrome HELLP e eclâmpsia. Mesmo após a correção para testes múltiplos, o gene ACVR2A permaneceu associado à pré-eclâmpsia precoce.

A associação entre o SNP rs1424954 e a pré-eclâmpsia já havia sido descrita por Moses et al., em uma população da Austrália/Nova Zelândia (MOSES et al., 2006). Recentemente Roten et al., demonstraram a associação dos marcadores rs1424941, rs1014064 e rs2161983 com a pré-eclâmpsia em uma população da Noruega (ROTEN et al., 2009). O fato de validarmos esses estudos em uma população reconhecidamente miscigenada, como a brasileira, somado ao papel da Activina A/ACVR2A no desenvolvimento da placenta, reforça de maneira considerável a hipótese de que o gene ACVR2A está realmente envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

O gene ACVR2A codifica o receptor da Activina A tipo II, uma proteína da superfamília do TGF- β . Esta superfamília de proteínas está diretamente envolvida com processos reprodutivos e com o remodelamento de tecidos, incluindo a regulação da função do endométrio, decidualização e desenvolvimento embrionário e placentário (JONES et al., 2006b). A expressão

in vivo de activina A pelos citotrofoblastos invasivos é baixa, sugerindo que a activina de origem materna é a responsável pela invasão trofoblástica (JONES et al., 2006a). Vários trabalhos mostram uma elevação na concentração de activina A no soro de mulheres com pré-eclâmpsia assim como a expressão alterada de seus receptores na placenta e decídua materna (MANUEL PILLAI et al., 2001; MUTTUKRISHNA et al., 1997).

A pré-eclâmpsia precoce é caracterizada pela alteração no desenvolvimento placentário (*poor placentation*) e está associada ao elevado risco de recorrência e agregação familiar da doença (OUDEJANS et al., 2007; REDMAN ; SARGENT, 2005). O gene ACVR2A parece, de fato, estar envolvido nas bases genéticas da pré-eclâmpsia, no entanto, estudos funcionais serão necessários para confirmar o papel desse gene na etiologia e fisiopatologia da doença.

4.2.2. FLT1

Dos seis marcadores estudados para o gene FLT1, três tiveram frequência alélica mínima (MAF) menor que 2%: rs35832528, Rep53 e rs56071338 (monomórfico). Apesar do SNP rs35832528 levar à substituição do ácido glutâmico pela alanina na cadeia polipeptídica, essa alteração não parece ser importante na função do Flt1 no contexto da pré-eclâmpsia. Interessantemente, apenas três indivíduos apresentaram genótipo heterozigoto para esse polimorfismo, enquanto que nas populações da Ásia, Europa e África a frequência de heterozigotos é de mais de 90% (dados do HapMap). A variante Rep53 foi descrita por Menendez et al., como a responsável por criar um elemento *cis* de resposta à p53 no promotor do gene FLT1, integrando o sistema VEGF à rede transcricional da p53. Essa variante foi encontrada numa frequência muito baixa na nossa população, apenas 3% do total de indivíduos analisados foram heterozigotos, sem associação com os fenótipos estudados.

Os outros três polimorfismos estudados foram escolhidos baseado nos dados do projeto HapMap. Cada *tagSNP* está localizado em um bloco de LD diferente (blocos 2, 8 e 11) espaçados ao longo do gene FLT1 (ver Figura 2). Os SNPs foram estrategicamente escolhidos de maneira a capturar o máximo de informação das variantes genéticas da região. O marcador rs9513095 apresentou uma forte associação com os grupos de pacientes com síndrome

HELLP ($p=0,0008$) e PE grave ($p=0,0028$), o que faz bastante sentido do ponto de vista biológico, tendo em vista que já foi demonstrado experimentalmente que o sFlt1, agindo em conjunto com a endoglina solúvel, causa os sintomas da pré-eclâmpsia severa, incluindo a síndrome HELLP (VENKATESHA et al., 2006).

Apesar da forte evidência do envolvimento do gene FLT1 com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia, poucos estudos tem sido conduzidos no sentido de testar a associação desse gene com a doença. Apenas recentemente, Kim et al., testaram associação de um polimorfismo na região 3'UTR do gene FLT1 em pacientes com pré-eclâmpsia na Coréia do Sul (KIM et al., 2008); e Muetze et al., analisaram mutações nos genes PIGF, FLT1, IGF-I e IGF-IR em mulheres com restrição do crescimento intra-uterino (MUETZE et al., 2010). Em ambos os estudos não houve evidência de associação entre os polimorfismos estudados e as respectivas doenças, o que não invalida a hipótese de outros polimorfismos/mutações no gene FLT1 estarem envolvidos nas causas da pré-eclâmpsia.

Recentemente foi demonstrado que um dos principais mecanismos de regulação do *splicing* alternativo no gene FLT1, se dá através de seqüências sinais de poli-adenilação e elementos *cis* situados dentro do intron 13 (THOMAS et al., 2010). Esses elementos regulatórios podem direcionar o processamento preferencialmente para o transcrito sFlt1 (receptor solúvel) em detrimento do Flt1 (receptor integral), o que parece de fato ocorrer nos casos de pré-eclâmpsia grave e síndrome HELLP (TSATSARIS et al., 2003; VENKATESHA et al., 2006; ZHOU et al., 2002). O SNP rs9513095, que está fortemente associado com a PE grave e a síndrome HELLP em nosso estudo, está localizado no intron 12. A proximidade desse marcador com a região regulatória citada anteriormente, nos leva a criar a hipótese de que o marcador rs9513095 está em desequilíbrio de ligação com alguma variante causal localizada nos elementos de regulação do *splicing* alternativo do intron 13.

4.2.3. ERAP1, ERAP2 e LNPEP

Atualmente, ERAP1 é conhecida como uma enzima multifuncional que atua na regulação da angiogênese, modulação da resposta inflamatória e apresentação de antígenos a moléculas de MHC classe I. LNPEP tem a

capacidade de inativar os hormônios ocitocina e vasopressina, sugerindo que essa enzima desempenha importante papel na manutenção da gravidez normal (TSUJIMOTO et al., 2008). Juntamente com ERAP2, essas enzimas pertencem à subfamília das ocitocinases de aminopeptidases M1 (TSUJIMOTO ; HATTORI, 2005). Esses três genes estão situados na mesma região cromossômica, 5q15, apontada pelo trabalho de Johnson et al., como uma região que pode abrigar importantes genes de suscetibilidade à pré-eclâmpsia (JOHNSON et al., 2007).

Nosso estudo identificou a associação entre o gene ERAP1 e o grupo eclâmpsia. Analisado sob o modelo de herança superdominante, o alelo C do marcador rs30187 apresentou um efeito protetor contra a eclâmpsia, evidenciado pela diferença na proporção de heterozigotos entre os grupos controle (51,7% de CT) e eclâmpsia (28,6% de CT), com um $p=0,0043$, OR 0,37 (0,19-0,75, 95% CI). Não foi encontrada associação entre os marcadores dos genes ERAP2 e LNPEP com nenhum dos fenótipos estudados. No entanto, o haplótipo de risco do gene ERAP2 foi encontrado em maior frequência nos grupos PE total ($p=0,036$), PE grave ($p=0,021$) e PE precoce ($p=0,0046$), quando comparado com o grupo controle.

A associação entre o gene ERAP2 e a pré-eclâmpsia já havia sido demonstrada nas populações da Austrália e Noruega (JOHNSON et al., 2009), porém nesse mesmo estudo não houve evidência de associação para os genes ERAP1 e LNPEP. No entanto, um estudo conduzido no Japão demonstrou a associação do polimorfismo missense rs30187 (Lis528Arg) no gene ERAP1 em sujeitos com hipertensão essencial (YAMAMOTO et al., 2002). Diversos estudos utilizando diferentes populações tem demonstrado a associação entre os marcadores rs30187 e rs27044 e pacientes com espondilite anquilosante (BURTON et al., 2007; MAKSYMOWYCH et al., 2009; PAZAR et al., 2010; TSUI et al., 2010), sugerindo que esses polimorfismos devem alterar consideravelmente a função da proteína. Em virtude da limitação no número amostral utilizado no nosso estudo, não podemos excluir a hipótese de que os genes ERAP2 e LNPEP também estejam associados com a pré-eclâmpsia. Outro aspecto importante é a localização dos três genes na mesma região cromossômica, o que aumenta as chances da variante causal está em

desequilíbrio de ligação com os marcadores dos outros genes. Portanto, serão necessários outros estudos utilizando uma maior amostragem para confirmar a associação dos genes LNPEP, ERAP1 e ERAP2 com a pré-eclâmpsia e suas variantes clínicas.

4.2.4. CRHBP

O gene CRHBP, que codifica a proteína ligadora do hormônio liberador da corticotrofina, havia sido apontado como um importante gene candidato de suscetibilidade à pré-eclâmpsia (JOHNSON et al., 2007). O nosso estudo identificou um possível efeito protetor do alelo A do marcador rs2174444, através da associação entre esse SNP e o grupo pré-eclâmpsia ($p=0,015$). A análise de haplótipos também revelou o efeito protetor do haplótipo A (rs3792738) G (rs2174444) A (rs10055255) nos grupos pré-eclâmpsia ($p=0,021$) e eclâmpsia ($p=0,034$). No entanto, após a correção para testes múltiplos, não houve mais evidência de associação entre o gene CRHBP e os fenótipos estudados. Outros estudos maiores serão necessários para determinar a influência que SNPs no gene CRHBP podem ter no risco de desenvolver pré-eclâmpsia.

4.2.5. Especulações e questionamentos

Cada vez mais tem se estudado os mecanismos patogênicos que levam aos sintomas da pré-eclâmpsia, o que tem resultado na identificação de diversas vias bioquímicas e marcadores moleculares e genéticos associados à doença. No entanto, o maior desafio tem sido estabelecer as inter-relações entre essas vias e, principalmente, determinar a relação de causalidade entre os diferentes mecanismos e a pré-eclâmpsia. O mecanismo fisiopatológico da pré-eclâmpsia é conhecido em parte: devido a um defeito no desenvolvimento placentário, a placenta entra em estado de hipóxia e passa a produzir certas proteínas em excesso, principalmente fatores anti-angiogênicos (sFlt1 e sEng), que, ao entrarem na circulação materna, desencadeiam os sintomas da pré-eclâmpsia.

Primeira pergunta: ***qual a causa do desenvolvimento anormal da placenta?*** Uma das hipóteses é que células do sistema imune materno (macrófagos e células NK) limitem a migração dos trofoblastos em direção à

decídua materna. A invasão parcial ou incompleta dos trofoblastos leva à alteração no remodelamento das artérias uterinas. Como consequência, haverá um aumento na resistência vascular que leva ao quadro de hipóxia placentária. Trabalhos mostram que a interação entre receptores de células NK materna e moléculas de HLA de trofoblastos (fetal) é determinante para o desenvolvimento placentário e pode estar associada ao risco elevado de pré-eclâmpsia e aborto recorrente (HANNA et al., 2006; HIBY et al., 2004; HIBY et al., 2008). Outra hipótese é que genes maternos de suscetibilidade possam levar ao desenvolvimento defeituoso da placenta. O gene ACVR2A está envolvido com o desenvolvimento placentário e já foi relatado estar associado com a pré-eclâmpsia em populações da Austrália e Noruega (FITZPATRICK et al., 2009; ROTEN et al., 2009). Nosso estudo validou a associação desse gene com a pré-eclâmpsia e, portanto, sugere que o ACVR2A possa, de fato, estar envolvido na etiologia dessa doença. Outro gene que está envolvido com a vasculogênese da placenta é o FLT1. Nosso trabalho, de maneira inédita, identificou a associação entre o gene FLT1 e a pré-eclâmpsia grave. Estudos funcionais serão necessários para determinar se os genes ACVR2A e FLT1 estão envolvidos nas causas da pré-eclâmpsia ou apenas na gravidade dos sintomas.

Segunda pergunta: ***Por que alguns casos de doença placentária evoluem apenas com restrição do crescimento intra-uterino, sem doença materna?*** Pré-eclâmpsia e PIG (neonato pequeno para idade gestacional) compartilham alguns mecanismos de doença, como isquemia uteroplacentária crônica e disfunção endotelial. Esse fato sugere que o defeito placentário por si só não é suficiente para causar pré-eclâmpsia. Então, qual é o fator que determina o surgimento dos sintomas maternos? Um estudo longitudinal demonstrou que mulheres com pré-eclâmpsia e PIG (pequeno para idade gestacional) apresentam níveis plasmáticos reduzidos de PIGF e aumentados de sEng, no entanto, apenas o grupo com pré-eclâmpsia apresentou níveis elevados de sFlt1, quando comparado com os controles (gravidez normal) (ROMERO et al., 2008). Esse achado reforça a hipótese de que o sFlt1 é um dos principais responsáveis pelos sintomas da pré-eclâmpsia. Seguindo um raciocínio lógico, a próxima pergunta seria: *por que mulheres com pré-*

eclâmpsia apresentam níveis elevados de sFlt1? Sabe-se que o grau de hipóxia está diretamente relacionado com o nível de sFlt1 secretado pela placenta. Portanto, talvez, níveis diferentes de disfunção placentária (isquemia/hipóxia) justifiquem o destino da gravidez em pré-eclâmpsia ou PIG. Nesse momento, faz-se necessário retomar à questão anterior (*“Qual a causa do desenvolvimento anormal da placenta?”*). Nosso trabalho sugere que alterações no gene ACVR2A possam causar o defeito placentário, levando ao aumento do sFlt1 em níveis suficientes para desencadear os sintomas da pré-eclâmpsia. Um próximo passo interessante do trabalho seria testar a associação genética entre ACVR2A e mulheres com PIG, a fim de investigar a hipótese de que pré-eclâmpsia e PIG possam apresentar como causa comum para a disfunção placentária a alteração no gene ACVR2A.

É importante ressaltar que mulheres com desenvolvimento placentário normal também podem desenvolver pré-eclâmpsia. Fisiologicamente durante a gravidez há uma elevação nos níveis de sFlt1 e sEng. Mulheres suscetíveis a, ou que sofram de, doença microvascular, como diabetes e hipertensão, podem não suportar o estresse da gravidez e desenvolver os sintomas da pré-eclâmpsia. Nesses casos, na maioria das vezes, os sintomas surgem após a 34ª semana de gestação (pré-eclâmpsia tardia), quando os níveis de sFlt1 e sEng atingem seus valores máximos durante a gravidez.

Terceira pergunta: ***O que justifica o espectro da doença? Porque algumas mulheres têm apenas pré-eclâmpsia enquanto outras evoluem para as formas mais graves, como eclâmpsia e síndrome HELLP?*** A ação conjunta de fatores genéticos e ambientais parece determinar a gravidade da doença. Essas diferentes doenças apresentam fatores de riscos específicos. Por exemplo, enquanto idade materna reduzida e primiparidade são fatores de risco para eclâmpsia, idade materna elevada e multiparidade são fatores de riscos para a síndrome HELLP. Já para a pré-eclâmpsia, o IMC elevado, assim como co-morbidades como hipertensão crônica e diabetes são os principais fatores de riscos. Os mecanismos pelos quais esses fatores de riscos influenciam o surgimento dessas doenças ainda não estão totalmente esclarecidos. Diferentemente dos fatores ambientais, os potenciais fatores genéticos específicos de cada doença são pouco conhecidos. Há relatos de

genes associados com a pré-eclâmpsia, no entanto, com grande inconsistência nos resultados encontrados. Nosso estudo descreve a associação específica de três genes diferentes com as três formas da doença. (ACVR2A com pré-eclâmpsia; ERAP1 com eclâmpsia e FLT1 com síndrome HELLP). Nossa hipótese é que, a maneira como uma mulher irá responder ao estresse da gravidez, desenvolvendo pré-eclâmpsia, eclâmpsia ou síndrome HELLP, irá depender da influencia conjunta dos fatores ambientais e genéticos específicos de cada doença. O esquema da figura 4 sumariza como os fatores ambientais e genéticos podem influenciar a etiologia e o espectro da pré-eclâmpsia.

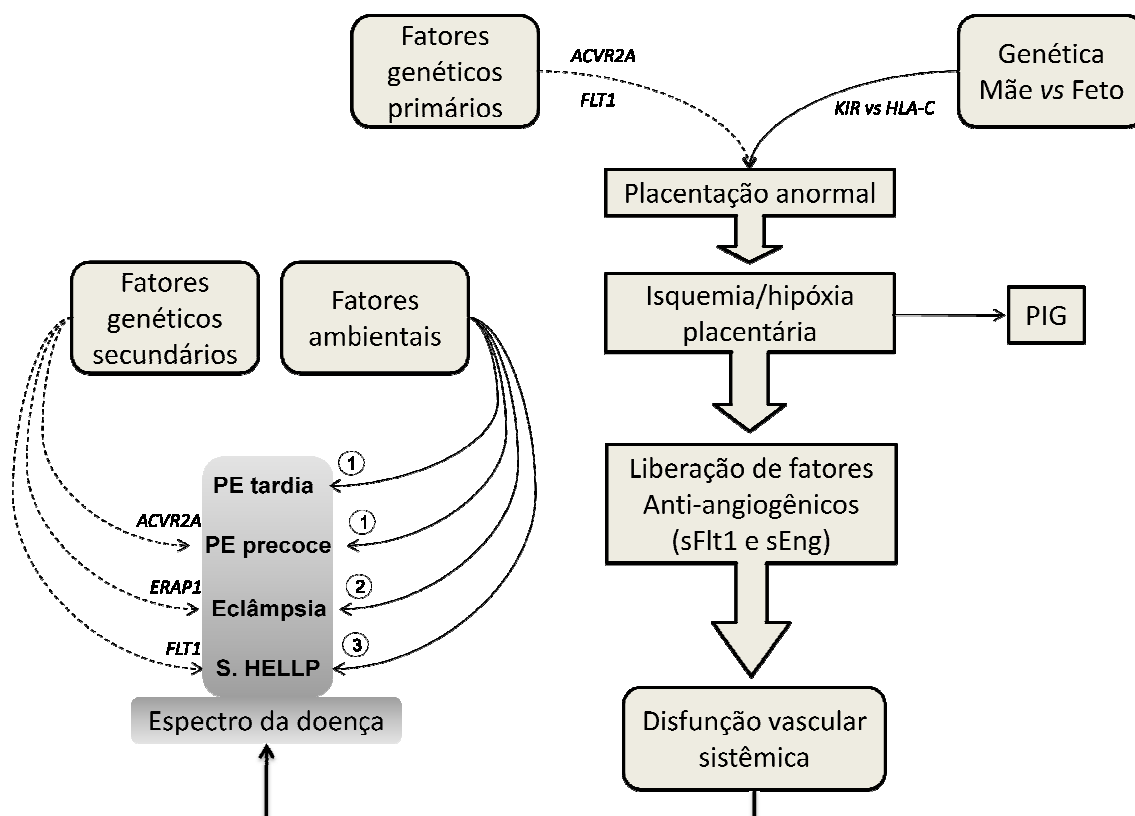


Figura 4 - Influência dos fatores genéticos e ambientais na etiologia e fisiopatologia da pré-eclâmpsia. A pré-eclâmpsia é uma doença multifatorial, influenciada por fatores ambientais e genéticos. Embora ainda existam algumas lacunas no entendimento da fisiopatologia da pré-eclâmpsia, sabe-se que a hipóxia placentária leva à produção de fatores anti-angiogênicos, responsáveis por parte dos sintomas. Acredita-se que fatores genéticos maternos e/ou fetais possam estar envolvidos nas causas do desenvolvimento defeituoso da placenta. Outra questão a ser esclarecida é quanto aos fatores que influenciam o espectro da pré-eclâmpsia. Uma das hipóteses é que a interação entre fatores ambientais e genéticos específicos de cada doença seja determinante no grau de severidade dos sintomas que compreende o espectro da pré-eclâmpsia. *Fatores ambientais:* 1- IMC pré-gestacional elevado, primiparidade, hipertensão crônica, diabetes, dentre outros; 2- Idade materna reduzida e primiparidade; 3- Idade materna elevada e multiparidade. PIG: pequeno para idade gestacional.

5. CONCLUSÃO

- 5.1. O gene ACVR2A está associado com a pré-eclâmpsia, principalmente com a forma precoce da doença.
- 5.2. O gene FLT1 está associado com a síndrome HELLP e com pré-eclâmpsia grave, o que reforça a hipótese de que este gene está relacionado à gravidade dos sintomas nas doenças hipertensivas da gravidez.
- 5.3. O gene ERAP1 está associado com a eclâmpsia.
- 5.4. Pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP parecem possuir bases genéticas distintas, embora o gene FLT1 pareça estar envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia e síndrome HELLP.

Referências

Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v. 183, n. 1, p. S1-S22, 2000.

ARNGRIMSSON, R.; SIGURARD, t. S.; FRIGGE, M. L.; BJARNAD TTIR, R. I.; JONSSON, T.; STEFANSSON, H. et al. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum.Mol.Genet.*, v. 8, n. 9, p. 1799-1805, 1999.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat.Rev.Genet.*, v. 7, n. 10, p. 781-791, 2006.

BI-SAID, D.; ANNEGERS, J. F.; COMBS-CANTRELL, D.; FRANKOWSKI, R. F.; WILLMORE, L. J. Case-control study of the risk factors for eclampsia. *Am.J.Epidemiol.*, v. 142, n. 4, p. 437-441, 1995.

BUIMER, M.; KEIJSER, R.; JEBBINK, J. M.; WEHKAMP, D.; VAN KAMPEN, A. H.; BOER, K. et al. Seven placental transcripts characterize HELLP-syndrome. *Placenta*, v. 29, n. 5, p. 444-453, 2008.

BURTON, P. R.; CLAYTON, D. G.; CARDON, L. R.; CRADDOCK, N.; DELOUKAS, P.; DUNCANSON, A. et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat.Genet.*, v. 39, n. 11, p. 1329-1337, 2007.

CHAPPELL, S. ; MORGAN, L. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clin.Sci.(Lond)*, v. 110, n. 4, p. 443-458, 2006.

DUCKITT, K. ; HARRINGTON, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*, v. 330, n. 7491, p. 5652005.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat.Med.*, v. 9, n. 6, p. 669-676, 2003.

FITZPATRICK, E.; JOHNSON, M. P.; DYER, T. D.; FORREST, S.; ELLIOTT, K.; BLANGERO, J. et al. Genetic association of the activin A receptor gene (ACVR2A) and pre-eclampsia. *Mol.Hum.Reprod.*, v. 15, n. 3, p. 195-204, 2009.

FOWLER, P. A.; EVANS, L. W.; GROOME, N. P.; TEMPLETON, A.; KNIGHT, P. G. A longitudinal study of maternal serum inhibin-A, inhibin-B, activin-A, activin-AB, pro-alphaC and follistatin during pregnancy. *Hum.Reprod.*, v. 13, n. 12, p. 3530-3536, 1998.

GAIO, D. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; NUCCI, L. B.; MATOS, M. C.; BRANCHTEIN, L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens.Pregnancy*, v. 20, n. 3, p. 269-281, 2001.

GODDARD, K. A.; TROMP, G.; ROMERO, R.; OLSON, J. M.; LU, Q.; XU, Z. et al. Candidate-gene association study of mothers with pre-eclampsia, and their infants, analyzing 775 SNPs in 190 genes. *Hum.Hered.*, v. 63, n. 1, p. 1-16, 2007.

GRIMBERG, J.; NAWOSCHIK, S.; BELLUSCIO, L.; MCKEE, R.; TURCK, A.; EISENBERG, A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.*, v. 17, n. 20, p. 8390-1989.

HABLI, M.; EFTEKHARI, N.; WIEBRACHT, E.; BOMBRYIS, A.; KHABBAZ, M.; HOW, H. et al. Long-term maternal and subsequent pregnancy outcomes 5 years after hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP) syndrome. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v. 201, n. 4, p. 385-385, 2009.

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S. et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat.Med.*, v. 12, n. 9, p. 1065-1074, 2006.

HARAM, K.; SVENDSEN, E.; ABILDGAARD, U. The HELLP syndrome: clinical issues and management. A Review. *BMC.Pregnancy.Childbirth.*, v. 9, p. 82009.

HATTORI, A.; KITATANI, K.; MATSUMOTO, H.; MIYAZAWA, S.; ROGI, T.; TSURUOKA, N. et al. Characterization of recombinant human adipocyte-derived leucine aminopeptidase expressed in Chinese hamster ovary cells. *J.Biochem.*, v. 128, n. 5, p. 755-762, 2000.

HAYWARD, C.; LIVINGSTONE, J.; HOLLOWAY, S.; LISTON, W. A.; BROCK, D. J. An exclusion map for pre-eclampsia: assuming autosomal recessive inheritance. *Am.J.Hum.Genet.*, v. 50, n. 4, p. 749-757, 1992.

HIBY, S. E.; REGAN, L.; LO, W.; FARRELL, L.; CARRINGTON, M.; MOFFETT, A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum.Reprod.*, v. 23, n. 4, p. 972-976, 2008.

HIBY, S. E.; WALKER, J. J.; O'SHAUGHNESSY, K. M.; REDMAN, C. W.; CARRINGTON, M.; TROWSDALE, J. et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J.Exp.Med.*, v. 200, n. 8, p. 957-965, 2004.

HILLHOUSE, E. W. ; GRAMMATOPOULOS, D. K. Role of stress peptides during human pregnancy and labour. *Reproduction.*, v. 124, n. 3, p. 323-329, 2002.

HOGBERG, U. The World Health Report 2005: "make every mother and child count" - including Africans. *Scand.J.Public Health*, v. 33, n. 6, p. 409-411, 2005.

JOHNSON, M. P.; FITZPATRICK, E.; DYER, T. D.; JOWETT, J. B.; BRENNECKE, S. P.; BLANGERO, J. et al. Identification of two novel quantitative trait loci for pre-eclampsia susceptibility on chromosomes 5q and 13q using a variance components-based linkage approach. *Mol.Hum.Reprod.*, v. 13, n. 1, p. 61-67, 2007.

JOHNSON, M. P.; ROTEN, L. T.; DYER, T. D.; EAST, C. E.; FORSMO, S.; BLANGERO, J. et al. The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Hum.Genet.*, v. 126, n. 5, p. 655-666, 2009.

JONES, R. L.; FINDLAY, J. K.; FARNWORTH, P. G.; ROBERTSON, D. M.; WALLACE, E.; SALAMONSEN, L. A. Activin A and inhibin A differentially regulate human uterine matrix metalloproteinases: potential interactions during decidualization and trophoblast invasion. *Endocrinology*, v. 147, n. 2, p. 724-732, 2006a.

JONES, R. L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J. K.; SALAMONSEN, L. A. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction.*, v. 132, n. 2, p. 217-232, 2006b.

JOSHI, D.; JAMES, A.; QUAGLIA, A.; WESTBROOK, R. H.; HENEGHAN, M. A. Liver disease in pregnancy. *Lancet*, v. 375, n. 9714, p. 594-605, 2010.

KATZ, V. L.; FARMER, R.; KULLER, J. A. Preeclampsia into eclampsia: toward a new paradigm. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v. 182, n. 6, p. 1389-1396, 2000.

KIM, S. Y.; LIM, J. H.; YANG, J. H.; KIM, M. Y.; HAN, J. Y.; AHN, H. K. et al. Dinucleotide repeat polymorphism in Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1) gene is not associated with preeclampsia. *BMC.Med.Genet.*, v. 9, p. 682008.

KLIMAVICIUTE, A.; CALCIOLARI, J.; BERTUCCI, E.; BELIN-TORNBLOM, S.; STJERNHOLM-VLADIC, Y.; BYSTROM, B. et al. Corticotropin-releasing hormone, its binding protein and receptors in human cervical tissue at preterm and term labor in comparison to non-pregnant state. *Reprod.Biol.Endocrinol.*, v. 4, p. 292006.

LACHMEIJER, A. M.; ARNGRIMSSON, R.; BASTIAANS, E. J.; FRIGGE, M. L.; PALS, G.; SIGURDARDOTTIR, S. et al. A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur.J.Hum.Genet.*, v. 9, n. 10, p. 758-764, 2001.

LAIVUORI, H.; LAHERMO, P.; OLLIKAINEN, V.; WIDEN, E.; HAIVA-MALLINEN, L.; SUNDSTROM, H. et al. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. *Am.J.Hum.Genet.*, v. 72, n. 1, p. 168-177, 2003.

LEVINE, R. J.; MAYNARD, S. E.; QIAN, C.; LIM, K. H.; ENGLAND, L. J.; YU, K. F. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N.Engl.J.Med.*, v. 350, n. 7, p. 672-683, 2004.

LUO, Z. C.; AN, N.; XU, H. R.; LARANTE, A.; AUDIBERT, F.; FRASER, W. D. The effects and mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia: a systematic review. *Paediatr.Perinat.Epidemiol.*, v. 21 Suppl 1, p. 36-45, 2007.

MAKRIGIANNAKIS, A.; ZOUMAKIS, E.; KALANTARIDOU, S.; COUTIFARIS, C.; MARGIORIS, A. N.; COUKOS, G. et al. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat.Immunol.*, v. 2, n. 11, p. 1018-1024, 2001.

MAKSYMOWYCH, W. P.; INMAN, R. D.; GLADMAN, D. D.; REEVE, J. P.; POPE, A.; RAHMAN, P. Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.*, v. 60, n. 5, p. 1317-1323, 2009.

MANUELPIILLAI, U.; SCHNEIDER-KOLSKY, M.; DOLE, A.; WALLACE, E. M. Activin A and activin receptors in gestational tissue from preeclamptic pregnancies. *J.Endocrinol.*, v. 171, n. 1, p. 57-64, 2001.

MAYI-TSONGA, S.; AKOUO, L.; NGOU-MVE-NGOU, J. P.; MEYE, J. F. [Risk factors for eclampsia in Libreville (Gabon): a case-control study]. *Sante*, v. 16, n. 3, p. 197-200, 2006.

MBAH, A. K.; KORNOSKY, J. L.; KRISTENSEN, S.; AUGUST, E. M.; ALIO, A. P.; MARTY, P. J. et al. Super-obesity and risk for early and late pre-eclampsia. *BJOG.*, 2010.

MENENDEZ, D.; KRYSIAK, O.; INGA, A.; KRYSIAK, B.; RESNICK, M. A.; SCHONFELDER, G. A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 103, n. 5, p. 1406-1411, 2006.

MITSUI, T.; NOMURA, S.; ITAKURA, A.; MIZUTANI, S. Role of aminopeptidases in the blood pressure regulation. *Biol.Pharm.Bull.*, v. 27, n. 6, p. 768-771, 2004.

MOSES, E. K.; FITZPATRICK, E.; FREED, K. A.; DYER, T. D.; FORREST, S.; ELLIOTT, K. et al. Objective prioritization of positional candidate genes at a quantitative trait locus for pre-eclampsia on 2q22. *Mol.Hum.Reprod.*, v. 12, n. 8, p. 505-512, 2006.

MOSES, E. K.; LADE, J. A.; GUO, G.; WILTON, A. N.; GREHAN, M.; FREED, K. et al. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am.J.Hum.Genet.*, v. 67, n. 6, p. 1581-1585, 2000.

MUETZE, S.; KAPAGEROF, A.; VLACHOPOULOS, L.; EGGERMANN, T.; KAUFMANN, P.; ZERRES, K. et al. Mutation analysis of the growth factor genes PIGF, Flt1, IGF-I, and IGF-IR in intrauterine growth restriction with abnormal placental blood flow. *J.Matern.Fetal Neonatal Med.*, v. 23, n. 2, p. 142-147, 2010.

MUTTER, W. P. ; KARUMANCHI, S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc.Res.*, v. 75, n. 1, p. 1-8, 2008.

MUTTUKRISHNA, S.; KNIGHT, P. G.; GROOME, N. P.; REDMAN, C. W.; LEDGER, W. L. Activin A and inhibin A as possible endocrine markers for pre-eclampsia. *Lancet*, v. 349, n. 9061, p. 1285-1288, 1997.

MUTZE, S.; RUDNIK-SCHONEBORN, S.; ZERRES, K.; RATH, W. Genes and the preeclampsia syndrome. *J.Perinat.Med.*, v. 36, n. 1, p. 38-58, 2008.

NATALE, D. R.; HEMBERGER, M.; HUGHES, M.; CROSS, J. C. Activin promotes differentiation of cultured mouse trophoblast stem cells towards a labyrinth cell fate. *Dev.Biol.*, v. 335, n. 1, p. 120-131, 2009.

NG, E. K.; LEUNG, T. N.; TSUI, N. B.; LAU, T. K.; PANESAR, N. S.; CHIU, R. W. et al. The concentration of circulating corticotropin-releasing hormone mRNA in maternal plasma is increased in preeclampsia. *Clin.Chem.*, v. 49, n. 5, p. 727-731, 2003.

NOMURA, S.; ITO, T.; YAMAMOTO, E.; SUMIGAMA, S.; IWASE, A.; OKADA, M. et al. Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase/oxytocinase during pregnancy. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1751, n. 1, p. 19-25, 2005.

NORAIHAN, M. N.; SHARDA, P.; JAMMAL, A. B. Report of 50 cases of eclampsia. *J.Obstet.Gynaecol.Res.*, v. 31, n. 4, p. 302-309, 2005.

NORIS, M.; PERICO, N.; REMUZZI, G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat.Clin.Pract.Nephrol.*, v. 1, n. 2, p. 98-114, 2005.

OUDEJANS, C. B.; VAN, D. M.; OOSTERKAMP, M.; LACHMEIJER, A.; BLANKENSTEIN, M. A. Genetics of preeclampsia: paradigm shifts. *Hum.Genet.*, v. 120, n. 5, p. 607-612, 2007.

PAZAR, B.; SAFRANY, E.; GERGELY, P.; SZANTO, S.; SZEKANECZ, Z.; POOR, G. Association of ARTS1 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in the Hungarian population: the rs27044 variant is associated with HLA-B*2705 subtype in Hungarian patients with ankylosing spondylitis. *J.Rheumatol.*, v. 37, n. 2, p. 379-384, 2010.

PURWOSUNU, Y.; SEKIZAWA, A.; FARINA, A.; WIBOWO, N.; OKAZAKI, S.; NAKAMURA, M. et al. Cell-free mRNA concentrations of CRH, PLAC1, and selectin-P are increased in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Prenat.Diagn.*, v. 27, n. 8, p. 772-777, 2007.

RAJAKUMAR, A.; MICHAEL, H. M.; RAJAKUMAR, P. A.; SHIBATA, E.; HUBEL, C. A.; KARUMANCHI, S. A. et al. Extra-placental expression of vascular endothelial growth factor receptor-1, (Flt-1) and soluble Flt-1 (sFlt-1), by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in normotensive and preeclamptic pregnant women. *Placenta*, v. 26, n. 7, p. 563-573, 2005.

REDMAN, C. W. ; SARGENT, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, v. 308, n. 5728, p. 1592-1594, 2005.

ROBINSON, M.; MATTES, E.; ODDY, W. H.; DE KLERK, N. H.; LI, J.; MCLEAN, N. J. et al. Hypertensive diseases of pregnancy and the development of behavioral problems in childhood and adolescence: the Western Australian Pregnancy Cohort Study. *J.Pediatr.*, v. 154, n. 2, p. 218-224, 2009.

ROMERO, R.; NIEN, J. K.; ESPINOZA, J.; TODEM, D.; FU, W.; CHUNG, H. et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J.Matern.Fetal Neonatal Med.*, v. 21, n. 1, p. 9-23, 2008.

ROTEN, L. T.; JOHNSON, M. P.; FORSMO, S.; FITZPATRICK, E.; DYER, T. D.; BRENECKE, S. P. et al. Association between the candidate susceptibility gene ACVR2A on chromosome 2q22 and pre-eclampsia in a large Norwegian population-based study (the HUNT study). *Eur.J.Hum.Genet.*, v. 17, n. 2, p. 250-257, 2009.

SARIC, T.; CHANG, S. C.; HATTORI, A.; YORK, I. A.; MARKANT, S.; ROCK, K. L. et al. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat.Immunol.*, v. 3, n. 12, p. 1169-1176, 2002.

SEHRINGER, B.; ZAHRADNIK, H. P.; SIMON, M.; ZIEGLER, R.; NOETHLING, C.; SCHAEFER, W. R. mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing hormone, urocortin, CRH-binding protein and CRH receptors in human term gestational tissues determined by real-time quantitative RT-PCR. *J.Mol.Endocrinol.*, v. 32, n. 2, p. 339-348, 2004.

SHIBATA, D.; ANDO, H.; IWASE, A.; NAGASAKA, T.; HATTORI, A.; TSUJIMOTO, M. et al. Distribution of adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP)/ER-aminopeptidase (ERAP)-1 in human uterine endometrium. *J.Histochem.Cytochem.*, v. 52, n. 9, p. 1169-1175, 2004.

SHIBUYA, M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, v. 33, n. 4, p. 409-420, 2001.

SIBAI, B. M. Magnesium sulfate prophylaxis in preeclampsia: Lessons learned from recent trials. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, v. 190, n. 6, p. 1520-1526, 2004.

SIBAI, B. M. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet.Gynecol.*, v. 105, n. 2, p. 402-410, 2005.

SOLE, X.; GUINO, E.; VALLS, J.; INIESTA, R.; MORENO, V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.*, v. 22, n. 15, p. 1928-1929, 2006.

TABIASCO, J.; RABOT, M.; GUERRE-GIRR, M.; EL, C. H.; BERREBI, A.; PARANT, O. et al. Human decidual NK cells: unique phenotype and functional properties -- a review. *Placenta*, v. 27 Suppl A, p. S34-S39, 2006.

THOMAS, C. P.; RAIKWAR, N. S.; KELLEY, E. A.; LIU, K. Z. Alternate processing of Flt1 transcripts is directed by conserved cis-elements within an intronic region of FLT1 that reciprocally regulates splicing and polyadenylation. *Nucleic Acids Res.*, 2010.

TSATSARIS, V.; GOFFIN, F.; MUNAUT, C.; BRICHANT, J. F.; PIGNON, M. R.; NOEL, A. et al. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 88, n. 11, p. 5555-5563, 2003.

TSUI, F. W.; HAROON, N.; REVEILLE, J. D.; RAHMAN, P.; CHIU, B.; TSUI, H. W. et al. Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Ann.Rheum.Dis.*, v. 69, n. 4, p. 733-736, 2010.

TSUJIMOTO, M.; GOTO, Y.; MARUYAMA, M.; HATTORI, A. Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail.Rev.*, v. 13, n. 3, p. 285-291, 2008.

TSUJIMOTO, M. ; HATTORI, A. The oxytocinase subfamily of M1 aminopeptidases. *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1751, n. 1, p. 9-18, 2005.

VENKATESHA, S.; TOPORSIAN, M.; LAM, C.; HANAI, J.; MAMMOTO, T.; KIM, Y. M. et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat.Med.*, v. 12, n. 6, p. 642-649, 2006.

WALSH, S. W. Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends Endocrinol.Metab*, v. 18, n. 10, p. 365-370, 2007.

WASSEFF, S. Mechanisms of convulsions in eclampsia. *Med.Hypotheses*, v. 72, n. 1, p. 49-51, 2009.

YAMAMOTO, N.; NAKAYAMA, J.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; HAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, R.; ARINAMI, T. Identification of 33 polymorphisms in the adipocyte-derived leucine aminopeptidase (ALAP) gene and possible association with hypertension. *Hum.Mutat.*, v. 19, n. 3, p. 251-257, 2002.

YOUNG, B. C.; LEVINE, R. J.; KARUMANCHI, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu.Rev.Pathol.*, v. 5, p. 173-192, 2010.

ZHOU, Y.; MCMASTER, M.; WOO, K.; JANATPOUR, M.; PERRY, J.; KARPANEN, T. et al. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am.J.Pathol.*, v. 160, n. 4, p. 1405-1423, 2002.

APÊNDICE**Questionário de arrolamento****DOENÇAS HIPERTENSIVAS DA GRAVIDEZ - MEJC - UFRN****CADASTRO DO INDIVÍDUO****I. IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____ Apellido: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino

Idade: _____

Nome do pai: _____

Nome da mãe: _____

II. ENDEREÇO

Estado: _____ Cidade: _____ Bairro/Distrito: _____

Rua: _____ Nº: _____

CEP: _____ Bloco: _____ Apto.: _____

Telefone: _____

Referência(Ex: Igreja, mercado, bar, farmácia, escola, etc...): _____

III. PESQUISA, ID

ID Indivíduo: _____

ID Pai: _____

ID Mãe: _____

ID Residência: _____

Nº da família: _____

Tipo de cadastramento: () Novo () Recadastramento

ID antigo do indivíduo: _____

DOENÇAS HIPERTENSIVAS DA GRAVIDEZ - MEJC - UFRN

QUESTIONÁRIO DE ARROLAMENTO

FICHA

Preenchida por: _____ Data: ____/____/____

Revisada por: _____ Data: ____/____/____

Nome: _____ RG do Hospital: _____

Data da admissão: ____/____/____

Grupo: () Caso () Controle

PESO

Antes da gravidez: _____ Kg Altura: _____ m IMC: _____

Durante a gravidez (antes do parto): _____ Kg IG: _____ Data: ____/____/____

Na alta: _____ Kg Nº de dias pós-parto: _____ Data: ____/____/____

I. DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS:

Estado civil: () casada () vive com parceiro () solteira () viúva () Divorciada

Escolaridade: () não alfabetizada () Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo () Ensino médio incompleto () Ensino médio completo () Ensino superior incompleto () Ensino superior completo

Renda Familiar: () até 1 salário () + de 1 a 3 salários () + de 3 a 6 salários () + de 6 a 9 salários () + de 9 salários () NS

Nº de pessoas dependentes da renda: _____

II. INQUÉRITO FAMILIAR

MÃE:

Pré-eclâmpsia? () NS; () Não; () Sim Em qual gestação? () NA; () NS; () 1ª; () outra

Eclâmpsia? () NS; () Não; () Sim Em qual gestação? () NA; () NS; () 1ª; () outra

HELLP? () NS; () Não; () Sim Em qual gestação? () NA; () NS; () 1ª; () outra

IRMÃS: Nº _____ Quantas já engravidaram? _____ NS(); NA(). As que engravidaram tiveram:

Pré-eclâmpsia? () NA; () NS; () Não; () Sim Quantas? ____ () NA Em qual gestação? () NA; () NS; () 1ª; () outra

Eclâmpsia? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra
HELLP? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra

IRMÃOS: Nº _____ Quantos já engravidaram alguém? _____ NS(); NA() Alguma mulher de irmão seu (cunhada) já teve:

Pré-eclâmpsia? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra
Eclâmpsia? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra
HELLP? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra

SOGRA: A mãe do pai do seu bebê, sua sogra, já teve:

Pré-eclâmpsia? ()NS; ()Não; ()Sim Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra
Eclâmpsia? ()NS; ()Não; ()Sim Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra
HELLP? ()NS; ()Não; ()Sim Em qual gestação? ()NA; ()NS; ()1ª; ()outra

CUNHADA: O pai do seu bebê tem irmãs? ()Não ()Sim Quantas já engravidaram? _____ NS(); NA(). Alguma teve:

Pré-eclâmpsia? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA;
Eclâmpsia? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA;
HELLP? ()NA; ()NS; ()Não; ()Sim Quantas? ____ ()NA;

III. ANTECEDENTES FAMILIARES DA GESTANTE:

Hipertensão crônica: ()Não; ()Pai; ()Mãe; ()Irmão(ã); ()Sobrinho(a); ()NS
Diabetes: ()Não; ()Pai; ()Mãe; ()Irmão(ã); ()Sobrinho(a); ()NS
Epilepsia: ()Não; ()Pai; ()Mãe; ()Irmão(ã); ()Sobrinho(a); ()NS
Obesidade: ()Não; ()Pai; ()Mãe; ()Irmão(ã); ()Sobrinho(a); ()NS

MATERNAL

Hipertensão crônica: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS
Diabetes: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS
Epilepsia: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS
Obesidade: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS

PATERNAL

Hipertensão crônica: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS
Diabetes: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS
Epilepsia: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS
Obesidade: ()Não; ()Tio(a); ()Avó(ô); ()Primo(a); ()NS

IV. ANTECEDENTES PESSOAIS PATOLÓGICOS:

Hipertensão arterial crônica	()NS;	()Não;	()Sim	Se for hipertensa crônica (HAS):
Diabetes	()NS;	()Não;	()Sim	
Hipertireoidismo ou bócio	()NS;	()Não;	()Sim	Há quanto tempo tem hipertensão?
Hipotireoidismo	()NS;	()Não;	()Sim	()anos; ()meses; ()NS; ()NA;
Lupus eritematoso	()NS;	()Não;	()Sim	Já fez tratamento com remédio p/ baixar a PA?
Outra colagenose	()NS;	()Não;	()Sim	
Doença renal	()NS;	()Não;	()Sim	()NS; ()NA; ()Não; ()Sim.
D da coagulação (trombofilia)	()NS;	()Não;	()Sim	
Doença do coração	()NS;	()Não;	()Sim	
Enxaqueca	()NS;	()Não;	()Sim	
Epilepsia	()NS;	()Não;	()Sim	

V. ANTECEDENTES PESSOAIS GINECO-OBSTÉTRICOS ANTES DO PARTO: (Se a paciente já tiver parido no dia do preenchimento desta ficha, considere os antecedentes antes do parto. Exemplo: se a paciente já for Gesta I Para I, escreva Gesta I para 0)

Nº de Gestações	_____	Nº de RN de termo	_____
Nº de Partos	_____	Nº de RN pré-termo	_____
Nº de Partos vaginais	_____	Nº de RN ≥ 4000g	_____
Nº de Cesáreas	_____	Nº de Natimortos	_____
Nº de Abortos espontâneos	_____	Nº de filhos mortos:	_____

Nº de Abortos provocado _____

Nº de filhos vivos: _____

Pré-eclâmpsia ()NS; ()Não; ()Sim; ()NA
 Eclâmpsia ()NS; ()Não; ()Sim; ()NA
 HELLP ()NS; ()Não; ()Sim; ()NA
 Hipertensão só na gravidez? ()NS; ()Não; ()Sim; ()NA
 Gravidez molar (Mola) ()NS; ()Não; ()Sim; ()NA
 Gemelaridade ()NS; ()Não; ()Sim; ()NA

Mesmo pai (parceiro)? ()Não ()Sim ()NA
 Mesmo pai (parceiro)? ()Não ()Sim ()NA
 Mesmo pai (parceiro)? ()Não ()Sim ()NA
 Mesmo pai (parceiro)? ()Não ()Sim ()NA

VI. HÁBITOS DE VIDA NA GESTAÇÃO:**FUMO:**

() Não
 () < 10 cig./dia
 () 10 a 20 cig./dia
 () > 20 cig./dia
 () Fuma cachimbo

ÁLCOOL:

() Não
 () Ocasional
 () Moderado (uma dose/dia)
 () Etilista (+ 1 dose/dia)

DROGAS:

() Não
 () Maconha
 () Cocaína
 () Outra _____

VII. GESTAÇÃO ATUAL (Data da coleta do dado: ____/____/____)**DUM:** ____/____/____

Dúvidas? ()Não; ()Sim

Ciclo regular: ()Não ()Sim

DPP: ____/____/____

IG atual pela DUM: ____ sem ____ dias

Pré-Natal: ()Não ()Sim

Local: ()MEJC ()Outro

Mês de Início: _____

Nº de consultas: _____

VIII. SINTOMAS NA ADMISSÃO HOSPITALAR:

() Cefaléia (dor de cabeça)
 () Tonturas
 () Náuseas
 () Vômitos
 () Vista turva
 () Escotomas (ver estrelas)
 () Amaurose (cegueira)
 () Convulsões
 () Mal estar
 () Febre
 () Epistaxis
 () Dor epigástrica / HCD
 () Dor hipogástrica / cólicas
 () Perda de líquido amniótico
 () Hemorragia / sangramento transvaginal
 () Tosse com expectoração
 () Tosse seca
 () Cansaço
 () Dispnéia aos esforços
 () Palpitações
 () Gengivorragia
 () SEM SINTOMAS

IX. EXAME FÍSICO NA ADMISSÃO: (se esta ficha for preenchida depois do dia do internamento, olhar no prontuário – folha de admissão, evolução e folha de sinais vitais da enfermagem. Complementar com o exame do dia do preenchimento da ficha).

CONSCIÊNCIA: () Lucidez () Desorientação () Torpor () Coma CONVULSÕES: () Não () Generalizadas N ^o _____ () Focais N ^o _____ EDEMA: () Ausente; () Presente MMII ()Não; ()Sim; ()NA	Icterícia: ()Não ()Sim CORAÇÃO: FC _____ bpm REFLEXOS PATELARES: () Normais () Exaltados () Deprimidos () Não pesquisados () SI	PULMÕES: Edema agudo de pulmão: ()Sim ()Nao Outros: _____ PRESSÃO ARTERIAL (MSD): SR: _____ x _____ mmHg Pós decúbito: _____ x _____ mmHg
---	--	--

Face ()Não; ()Sim; ()NA Mãos ()Não; ()Sim; ()NA Genitália ()Não; ()Sim; ()NA Parede abdominal ()Não; ()Sim; ()NA Anasarca ()Não; ()Sim; ()NA OUTROS: 		
---	--	--

X. DIAGNÓSTICO PROVISÓRIO NA ADMISSÃO HOSPITALAR:

Caso:

() HAS crônica; ()Pré-eclâmpsia LEVE; ()Pré-eclâmpsia GRAVE; ()Eclâmpsia; ()HELLP; () HAS gestacional;
()HAS crônica + pré-eclâmpsia.

Controle:

() Sem intercorrências; () Amniorrexe/Tempo ____h () Prematuridade; () Infecção / Local _____; ()
Placenta prévia; () DPP; () Cesárea anterior; () Diabetes Mellitus; () Diabetes gestacional.

Outros: _____

XI. INTERCORRÊNCIAS E COMPLICAÇÕES DURANTE O INTERNAMENTO ATUAL, ANTES DO PARTO:

() HAS gestacional
() Iminência de eclâmpsia
() Eclâmpsia
() HELLP
() AVC
() Ed. Agudo de Pulmão
() Insuficiência hepática
() Ruptura hepática
() Oligúria *
() Insuficiência renal
() Hemorragia

() Discrasia sangüínea
() Trombose periférica
() Hepatite
() Insuf. respiratória
() Trabalho parto premat.
() S. hemolítico-urêmica
() Coma
() Óbito
() SEM INTERCORRÊNCIAS
Outro: _____

*Oligúria: < 30ml / hora de urina ou < 400ml / 24 horas em qualquer 24 horas do internamento

Nº DE CONVULSÕES (durante o internamento, antes do parto): _____

PICOS HIPERTENSIVOS (PAD $\geq$ 110mmHg)

() Não () Sim

PA NAS CONVULSÕES:

() NA

PA na 1ª convulsão _____ x _____ mmHg

PA na 2ª convulsão _____ x _____ mmHg

PA na 3ª convulsão _____ x _____ mmHg

USO DE SULFATO DE MAGNÉSIO

() Não () Sim

USO DE OUTRAS DROGAS:

XII. EXAMES NESTA GRAVIDEZ:

() SEM EXAMES

Data

TTGO 75g (antes)							
TTGO 75g (depois)							
Glicose (> 90 mg/dl)							
Uréia (> 20 mg/dl)							
Ac. úrico (> 4mg/dl)							
TGO/AST (=ou >70 U/ml)							
TGP/ALT (=ou >60 U/ml)							
DHL (= ou > 600 U/ml)							
Creatinina (> 0.8 mg/dl)							
BT (> 1.2 mg/dl)							
BD (> 0.3 mg/dl)							
BI (> 0.8 mg/dl)							
Hb (< 11,5 g/dl)							
Ht (< 35 %)							
Plaquetas(<150.000/ μ l)							
Proteinúria de 24 horas (mg/24 horas)							
Proteinúria de Fita							

XIII. 1. CARDIOTOCOGRAFIA (CTG):

	CTG 1: DATA / / .	CTG 2: DATA / / .
Alterada	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Bradycardia fetal (<120bpm) :	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Taquicardia fetal (= ou > 160bpm)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Redução da variabilidade (< 10 bpm)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Aumento da variabilidade (>25 bpm)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Acelerações transitórias (≥ 15 bat/min por 15 seg c/ MF)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Acelerações periódicas (≥ 15 bat/min por 15 seg c/ CU)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Desacelerações (Queda da FCF associada a CU)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Dip I (precoc)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Dip II (tardio)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Dip III (variável – Dip umbilical)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI

	CTG 3: DATA / / .	CTG 4: DATA / / .
Alterada	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Bradycardia fetal (<120bpm) :	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Taquicardia fetal (= ou > 160bpm)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Redução da variabilidade (< 10 bpm)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Aumento da variabilidade (>25 bpm)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Acelerações transitórias (≥ 15 bat/min por 15 seg c/ MF)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Acelerações periódicas (≥ 15 bat/min por 15 seg c/ CU)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Desacelerações (Queda da FCF associada a CU)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Dip I (precoc)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Dip II (tardio)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI
Dip III (variável – Dip umbilical)	() Não; () Sim; () NA; () SI	() Não; () Sim; () NA; () SI

XIII. 2. US OBSTÉTRICO: () Não fez; () Fez () Não trouxe Data: ____/____/____

PRIMEIRA US:

Idade Gestacional (IG): ____ semanas e ____ dias $\pm$ ____ dias; () NA; () SI
 Placenta: () Grau 0; () Grau I; () Grau II; () Grau III; () NA; () SI
 Líquido amniótico: () Normal; () Oligodrâmnio; () Polidrâmnio; ILA = ____ cm; () NA; () SI
 Peso fetal ____ g $\pm$ ____%; () NA; () SI
 Restrição do cresc. intra-uterino: () Não; () Sim; () NA; () SI
 Malformação fetal: () Não; () Sim; () NA; () SI
 Descreva: _____

() Não fez; () Fez () Não trouxe Data: ____/____/____

ÚLTIMA US:

Idade Gestacional (IG): ____ semanas e ____ dias $\pm$ ____ dias; () NA; () SI
 Placenta: () Grau 0; () Grau I; () Grau II; () Grau III; () NA; () SI
 Líquido amniótico: () Normal; () Oligodrâmnio; () Polidrâmnio; ILA = ____ cm; () NA; () SI
 Peso fetal ____ g $\pm$ ____%; () NA; () SI
 Restrição do cresc. intra-uterino: () Não; () Sim; () NA; () SI
 Malformação fetal: () Não; () Sim; () NA; () SI
 Descreva: _____

XIII. 3. DOPPLERVELOCIMETRIA: () Não fez; () Fez Data ____/____/____

Doppler da Art. Uterina direita: () Normal; () Incisura protodiastólica; () Fluxo reverso. IR ____; IP ____; () NA; () SI
 Doppler da Art. Uterina esq.: () Normal; () Incisura protodiastólica; () Fluxo reverso. IR ____; IP ____; () NA; () SI
 Doppler do cordão umbilical: () Normal; () Fluxo com alta resistência; () NA; () SI
 Doppler da Art. Cerebral média: () Normal; () Fluxo com baixa resistência; () NA; () SI
 Centralização de fluxo fetal: () Não; () Sim; 3() Não descrito; () NA; () SI

XIII. 4. AMNIOCENTESE: () Não fez; () Fez Data ____/____/____

Características do líquido amniótico:

() Claro sem grumos;
 () Com grumos;
 () Tinto meconial;
 () Achocolatado.
 () NA;
 () SI

Teste de Clements:

() Feto imaturo
 () Feto maduro
 () NA;
 () SI

XIV. MEDICAÇÃO QUE VINHA EM USO QUANDO CHEGOU AO HOSPITAL PARA SE INTERNAR:

() SEM MEDICAÇÃO

() Metildopa (Aldomet)	Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Pindolol (Visken)	Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Nifedipina (Adalat)	Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Propranolol (Inderal)	Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Insulina NPH	Dose: ____ U/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Anticonvulsivante	Qual? ____ Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Vitaminas	Qual? ____ Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Sulfato Ferroso	Qual? ____ Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Ácido Fólico	Qual? ____ Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Outro	Qual? ____ Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI
() Outro	Qual? ____ Dose: ____ mg/dia; () NA; () SI	Tempo de uso: ____ () NA; () SI

XV. MEDICAÇÃO USADA DURANTE O INTERNAMENTO:

* (DOSE TOTAL)

HIPOSENSORES LENTOS: DOSE MÁXIMA:
☐ Metildopa (Aldomet) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Pindolol (Visken) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Atenolol (Atenol) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Propranolol (Inderal) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Nifedipina retard _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Outro _____
☐ **NENHUM**

HIPOSENSORES RÁPIDOS: DOSE MÁXIMA:
☐ Nifedipina 10mg (Adalat) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Hidralazina _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Dinitrato de isosorbida (Isordil) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Outro _____
☐ **NENHUM**

OUTRAS DROGAS: DOSE MÁXIMA:
☐ Furosemida (Lasix) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Betametasona (Celestone) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Celestone soluspan _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Dexametasona _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ **NENHUM**

SANGUE E DERIVADOS: DOSE MÁXIMA:
☐ Sangue total _____ U de _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Plasma _____ U de _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Concentrado de hemácias _____ U de _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Crioprecipitado _____ U de _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Outro _____
☐ **NENHUM**

ANTICONVULSIVANTES: DOSE MÁXIMA:
☐ Sulfato de Mg (Ataque) _____ g; () NA; () SI
☐ Sulfato de Mg (Manut.)* _____ g/h por ____ h; () NA; () SI
☐ Diazepan _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Hidantoina (Hidantal) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Fenobarbital (Gardenal) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ Carbamazepina (Tegretol) _____ mg ____ X dia; () NA; () SI
☐ **NENHUM**

ANTIDIABÉTICOS: DOSE MÁXIMA:
☐ Insulina NPH _____ U / dia; () NA; () SI
☐ Insulina Simples _____ U / dia; () NA; () SI
☐ Outros _____
☐ **NENHUM**

SOROS E SOLUÇÕES: DOSE MÁXIMA:
☐ Soro glicosado a 5% _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Soro fisiológico _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Ringer lactato _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Ringer simples _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Manitol _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ Albumina _____ ml / dia; () NA; () SI
☐ **NENHUM**

ANTIBIÓTICOS:

☐ Profilático (só até 24 horas)
☐ Terapêutico (vários dias)
 Nomes: _____
☐ **NENHUM**

XVI. PARTO (DATA: ____ / ____ / ____)

☐ Alta antes do parto

IG: ____ sem. e ____ dias.

LOCAL:

☐ MEJC
☐ Outro hospital
☐ Em casa

TIPO:

☐ Eutócico
☐ Fórceps de alívio
☐ Distócico com manobras
☐ Cesárea

LAQUEADURA:

☐ Não
☐ Sim

COMPLICAÇÕES:

☐ Convulsão
☐ Hipotensão
☐ Choque
☐ DPP
☐ Hemorragia
☐ Óbito
☐ Outras
 Quais? _____

☐ **SEM COMPLICAÇÕES**

ANESTESIA:

☐ Nenhuma
☐ Local
☐ Peridural
☐ Peridural contínua
☐ Raque
☐ Geral

Nº de convulsões: _____

PA na hora da convulsão:

_____ x _____ mmHg; () NA

COMPLICAÇÃO ANESTÉSICA:

☐ Não; () Sim

Qual? _____

* < 30ml / hora de urina ou < 400ml / 24 horas em qualquer 24 horas do internamento

XIX. ALTA: Data ____ / ____ / ____

() Bem

PA na ALTA: ____ X ____ mmHg

() Transferida

() Óbito

Nº de dias de internamento ____ (Não considerar o dia da alta)

XX. DIAGNÓSTICO FINAL (DEFINITIVO):

Caso:

() HAS crônica; () Pré-eclâmpsia LEVE; () Pré-eclâmpsia GRAVE; () Eclâmpsia; () HELLP; () HAS gestacional;

() HAS crônica + pré-eclâmpsia.

Controle:

() Sem intercorrências; () Amniorrexe/Tempo ____ h () Prematuridade; () Infecção / Local _____;

() Placenta prévia; () DPP; () Cesárea anterior; () Diabetes Mellitus;

() Diabetes gestacional.

Outros: _____

Descrição das frequências alélicas dos SNPs nos diferentes grupos estudados

Gene	SNP	Região do gene	Controle		Pré-eclâmpsia total		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (0,998)	G (0,002)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,99)	T (0,01)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,77)	C (0,23)	0,021 ^r
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,86)	G (0,14)	0,079 ^{ad}
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,85)	C (0,15)	NS
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,86)	A (0,14)	0,076 ^{ad}
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,60)	C (0,40)	NS
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,61)	T (0,39)	NS
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,66)	A (0,34)	0,0089 ^{ad}
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,65)	G (0,35)	0,021 ^r
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,66)	T (0,34)	0,039 ^{ad}
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,67)	A (0,33)	0,10 ^r
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,84)	A (0,16)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,47)	C (0,53)	0,074 ^r
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,64)	G (0,36)	0,13 ^r
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,52)	T (0,48)	NS
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,62)	T (0,38)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,46)	G (0,54)	NS
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,89)	A (0,11)	NS
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,36)	G (0,64)	0,015 ^d
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,51)	T (0,49)	0,14 ^{od}

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Gene	SNP	Região do gene	Controle		PE leve		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (1,00)	G (0,00)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,99)	T (0,01)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,79)	C (0,21)	NS
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,85)	G (0,15)	0,064 ^{ad}
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,84)	C (0,16)	NS
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,86)	A (0,14)	0,14 ^{ad}
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,61)	C (0,39)	0,18 ^r
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,61)	T (0,39)	0,16 ^r
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,65)	A (0,35)	0,0048 ^d
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,65)	G (0,35)	0,037 ^{ad}
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,63)	T (0,37)	0,017 ^{ad}
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,66)	A (0,34)	0,087 ^{ad}
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,84)	A (0,16)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,48)	C (0,52)	0,095 ^{ad}
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,64)	G (0,36)	NS
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,49)	T (0,51)	NS
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,63)	T (0,37)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,44)	G (0,56)	NS
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,85)	A (0,15)	0,022 ^{ad}
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,35)	G (0,65)	0,018 ^r
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,50)	T (0,50)	NS

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Gene	SNP	Região do gene	Controle		PE grave		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (0,996)	G (0,004)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,99)	T (0,01)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,75)	C (0,25)	0,0028 ^r
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,87)	G (0,13)	NS
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,86)	C (0,14)	NS
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,86)	A (0,14)	0,14 ^{ad}
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,59)	C (0,41)	NS
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,61)	T (0,39)	NS
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,67)	A (0,33)	0,051 ^{ad}
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,66)	G (0,34)	0,014 ^r
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,68)	T (0,32)	0,053 ^r
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,68)	A (0,32)	0,069 ^r
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,84)	A (0,16)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,45)	C (0,55)	0,053 ^r
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,64)	G (0,36)	0,014 ^{od}
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,55)	T (0,45)	0,13 ^r
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,61)	T (0,39)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,49)	G (0,51)	NS
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,93)	A (0,07)	NS
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,37)	G (0,63)	0,092 ^d
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,52)	T (0,48)	0,031 ^{od}

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Gene	SNP	Região do gene	Controle		PE precoce		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (1,00)	G (0,00)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,99)	T (0,01)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,69)	C (0,31)	0,0087 ^r
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,85)	G (0,15)	NS
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,81)	C (0,19)	NS
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,87)	A (0,13)	NS
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,61)	C (0,39)	NS
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,62)	T (0,38)	NS
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,57)	A (0,43)	0,0018 ^{ad}
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,56)	G (0,44)	0,0023 ^{ad}
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,55)	T (0,45)	0,0017 ^d
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,59)	A (0,41)	0,018 ^{ad}
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,81)	A (0,19)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,45)	C (0,55)	NS
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,69)	G (0,31)	NS
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,55)	T (0,45)	NS
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,63)	T (0,37)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,47)	G (0,53)	NS
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,95)	A (0,05)	NS
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,32)	G (0,68)	0,017 ^d
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,57)	T (0,43)	0,14 ^d

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Gene	SNP	Região do gene	Controle		PE tardia		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (0,998)	G (0,002)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,99)	T (0,01)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,79)	C (0,21)	0,085 ^r
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,86)	G (0,14)	0,11 ^{ad}
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,86)	C (0,14)	NS
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,86)	A (0,14)	0,079 ^{ad}
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,60)	C (0,40)	NS
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,61)	T (0,39)	NS
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,68)	A (0,32)	0,031 ^d
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,68)	G (0,32)	0,071 ^r
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,68)	T (0,32)	0,10 ^r
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,68)	A (0,32)	0,17 ^r
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,85)	A (0,15)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,47)	C (0,53)	0,066 ^r
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,63)	G (0,37)	0,085 ^r
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,51)	T (0,49)	NS
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,62)	T (0,38)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,46)	G (0,54)	NS
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,87)	A (0,13)	0,073 ^{ad}
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,37)	G (0,63)	0,041 ^d
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,50)	T (0,50)	NS

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Gene	SNP	Região do gene	Controle		Eclâmpsia		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (1,00)	G (0,00)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,99)	T (0,01)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,82)	C (0,18)	NS
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,94)	G (0,06)	0,14 ^{ad}
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,93)	C (0,07)	0,030 ^r
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,86)	A (0,14)	NS
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,64)	C (0,36)	NS
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,66)	T (0,34)	0,16 ^r
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,66)	A (0,34)	0,08 ^{ad}
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,68)	G (0,32)	NS
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,69)	T (0,31)	NS
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,68)	A (0,32)	NS
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,87)	A (0,13)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,39)	C (0,61)	0,0043 ^{od}
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,65)	G (0,35)	0,016 ^{od}
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,43)	T (0,57)	0,091 ^r
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,66)	T (0,34)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,40)	G (0,60)	0,086 ^r
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,90)	A (0,10)	NS
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,34)	G (0,66)	0,068 ^d
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,59)	T (0,41)	0,07 ^d

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Gene	SNP	Região do gene	Controle		HELLP		P-valor
			Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	Alelo 1 (freq)	Alelo 2 (freq)	
FLT1	rs35832528*	exon 21	T (0,996)	G (0,004)	T (1,00)	G (0,00)	-
	rs56071338	intron 16	NP	NP	NP	NP	-
	Rep53*	promotor	C (0,99)	T (0,01)	C (0,98)	T (0,02)	NS
	rs9513095	intron12	T (0,81)	C (0,19)	T (0,68)	C (0,32)	0,0008 ^{cd}
	rs17619037	intron25	A (0,90)	G (0,10)	A (0,86)	G (0,14)	0,18 ^{ad}
	rs7323184	intron3	T (0,83)	C (0,17)	T (0,89)	C (0,11)	0,048 ^{od}
LNPEP	rs2303138	exon 13	G (0,90)	A (0,10)	G (0,89)	A (0,11)	NS
	rs27300	intron16	T (0,59)	C (0,41)	T (0,61)	C (0,39)	NS
	rs38034	intron4	C (0,58)	T (0,42)	C (0,62)	T (0,38)	NS
ACVR2A	rs1424954	5' near	G (0,75)	A (0,25)	G (0,72)	A (0,28)	NS
	rs1014064	intron1	A (0,73)	G (0,27)	A (0,69)	G (0,31)	NS
	rs2161983	intron1	C (0,73)	T (0,27)	C (0,70)	T (0,30)	NS
	rs3768687	intron4	G (0,73)	A (0,27)	G (0,69)	A (0,31)	NS
	rs1424941**	intron1	G (0,86)	A (0,14)	G (0,86)	A (0,14)	-
ERAP1	rs30187	exon11	T (0,41)	C (0,59)	T (0,38)	C (0,62)	NS
	rs27044	exon15	C (0,66)	G (0,34)	C (0,72)	G (0,28)	0,15 ^{ad}
ERAP2	rs2549796	exon14	C (0,50)	T (0,50)	C (0,48)	T (0,52)	NS
	rs2927609	intron17	C (0,61)	T (0,39)	C (0,63)	T (0,37)	NS
	rs11135484	intron2	A (0,45)	G (0,55)	A (0,41)	G (0,59)	NS
CRHBP	rs3792738	5' near	C (0,92)	A (0,08)	C (0,93)	A (0,07)	NS
	rs2174444	3' near	A (0,43)	G (0,57)	A (0,40)	G (0,60)	0,058 ^{od}
	rs10055255	intron6	A (0,49)	T (0,51)	A (0,48)	T (0,52)	0,18 ^{od}

Modelos de herança: r-recessivo; d-dominante; cd-codominante; ad-aditivo e od-superdominante.

*SNP com MAF < 0,02

**SNP fora do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

NP - não polimórfico

NS - não significativo

Associação genética entre os haplótipos e os diferentes subgrupos de pré-eclâmpsia

Haplótipo	CRHBP			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs3792738	rs2174444	rs10055255	Total	PE tardia	Controle		
Comum	C	G	A	0,477	0,492	0,458	-	-
Proteção	C	A	T	0,315	0,271	0,369	0,68 (0,47 – 0,98)	0,037

Haplótipo	ERAP2			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs2549796	rs2927609	rs11135484	Total	PE precoce	Controle		
Comum	T	C	G	0,489	0,422	0,508	-	-
Risco	C	C	G	0,052	0,124	0,034	4,24 (1,58 – 11,39)	0,0046

Haplótipo	ACVR2A				Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs2161983	rs1014064	rs1424954	rs3768687	Total	PE precoce	Controle		
Comum	C	A	G	G	0,664	0,520	0,707	-	-
Risco	T	G	A	A	0,310	0,444	0,270	2,38 (1,40 – 4,06)	0,0016

Haplótipo	ACVR2A				Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs2161983	rs1014064	rs1424954	rs3768687	Total	PE leve	Controle		
Comum	C	A	G	G	0,663	0,616	0,707	-	-
Risco	T	G	A	A	0,307	0,346	0,270	1,56 (1,06 – 2,28)	0,024

Haplótipo	ERAP2			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	P
	rs2549796	rs2927609	rs11135484	Total	PE grave	Controle		
Comum	T	C	G	0,492	0,432	0,508	-	-
Risco	C	C	G	0,054	0,079	0,034	2,69 (1,16 – 6,20)	0,021

Haplótipo	CRHBP			Frequência Haplotípica			OR (95% CI)	p
	rs3792738	rs2174444	rs10055255	Total	PE leve	Controle		
Comum	C	G	A	0,475	0,498	0,458	-	-
Proteção	C	A	T	0,310	0,238	0,369	0,58 (0,38 – 0,90)	0,014

Primers para PCR

Gene	SNP	Primer Forward	Primer Reverse	Tm (°C)	Produto (pb)
FLT1	rs35832528	5'-TATCTCAGCGCGTAGGACAG-3'	5'-GTGCTGGAGCTCCTTTTCAC-3'	61	241
	rs56071338	5'-GCTCACACTGCTCATCCAAA-3'	5'-GCCACACAGTTTCAACCAAA-3'	59	192
	rs9513095	5'-TGCTTGTTTCAAGTGGATGC-3'	5'-TGCCTTCCAAATTGATGAAA-3'	57	108
	rs17619037	5'-GGCCTCAAAGTGCAAACAT-3'	5'-TTTtaggaataggcccagca-3'	56	156
	rs7323184	5'-TTTTCCCACTAAGCCTGGAA-3'	5'-GCAAGCCTCTCCACTCAGTC-3'	62	329
	REp53	5'-CAGTTTCACGCCTCAGCTTT-3'	5'-ACAAGGCACTGAACCTGGAG-3'	61	215
LNPEP	rs2303138	5'-CAAGAGGGCCTTTGATTTGA-3'	5'-CACCAGTCTTGAGGCCAGAT-3'	61	139
	rs2762	5'-TGTAGGCAAAGGTTGAGCAA-3'	5'-TGCCATCTTTCTGTCTGCAC-3'		385
	rs27300	5'-TCCTTCCCACCGACAATAAG-3'	5'-CCAGAGGGAACCTGAAGAAA-3'	60	182
	rs38034	5'-CTTGGTTGCTTTTATTGTGG-3'	5'-TTCACACAGCAAATACCAGGA-3'	60	152
ACVR2A	rs1424954	5'-GACTTGGCTTTGTGGGAAAA-3'	5'-GGAATGGGATCCAACAGGTA-3'	62	387
	rs1424941	5'-TTCCAAGCCACAAATATCCA-3'	5'-AGAGGTTTCTGAGGGAATAGA-3'	60	233
	rs1014064	5'-GCTTTGAAAACACAAAGCTATTCA-3'	5'-GGCAAATAAAGAGTAATCCTCTCG-3'	60	402
	rs2161983	5'-AGGGCTGCTACCACCACTTA-3'	5'-AATTCACAGAGCCCCCTTTC-3'	62	597
	rs3768687	5'-CTCAGAGATACCGGCAGTCA-3'	5'-ATGCTTTCAATGGAGGGTTG-3'	62	381
CRHBP	rs3792738	5'-CCAGAGCTCAGAATTGTCCTG-3'	5'-GCTTTCCTACCCCTTTCCAG-3'	62	190
	rs2174444	5'-TGTAAGGTCTTGCTGTCTTTG-3'	5'-GCTAGAACTCTGGGCCATTG-3'	62	181
	rs10055255	5'-GCAAGGATATCAGAAGCCATTT-3'	5'-TTTGCCTGCAAAGCCTAAGT-3'	58	418
ERAP1	rs30187	5'-AGGAGCATTACCCAGTGTCC-3'	5'-GGGTGATGTGTCTGCCTTTT-3'	60	200
	rs27044	5'-TCTGTACGCACGGCTGATAG-3'	5'-CTGGTCCCTGTTTCCCTGTA-3'	62	168
ERAP2	rs2549796	5'-GGGGAAAGATTGGGAAAGAT-3'	5'-AGGAGCATGGTTCAGGTCAC-3'	60	239
	rs2927609	5'-AAGATCATTAAGTACGCTTCCAAA-3'	5'-AAAAGCCCCTGACTCTTAAAAAT-3'	60	158
	rs11135484	5'-TTGGAGTCACACGGTCACAT-3'	5'-TAATGGCCCCTTTCCCTTTA-3'	60	239

Primers de SNaPshot

Gene	SNP	Primers de SNaPshot	Tamanho do primer (pb)
FLT1	rs35832528	AGGAATTAATACCTACCCTCCTCT	24
	rs56071338	CCCCCCCCGTCAGTCTTTATTTTCAGAAGAAGA	32
	rs9513095	CCCCCCCCCCCCCCCCGAGTCGAAGCGGTCAAGGATTCTAA	40
	rs17619037	CCCCCCCCCCCCCCCCGAAAAAAGTGTCCAAGACAGGCA	40
	rs7323184	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAAGGCACTGTACCAGGGAGGCACA	48
	REp53	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCATGCGGCCGAAAAAGACACGGACA	56
LNPEP	rs2303138	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCTATCTTGAAATGAGAACCATACT	48
	rs2762	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGCATTCTTCCAAAAACAAAGAAT	56
	rs27300	ACGCTTTACCAGCAGCTGCCTAAT	24
	rs38034	TTTTTTTTTCTGAAAGCCTGTGTCACAAGAGG	32
ACVR2A	rs1424954	AACTTTGTAGAGTACATTAACAGA	24
	rs1424941	CCCCCCCCGGTTGGTTTTTTAATTGTGCTACA	32
	rs1014064	CCCCCCCCCTCCTACTGACTCTTCTTTGACCTTTGAC	38
	rs2161983	CCCCCCCCCCCCCCCCAAAAGCAATATTCAATGCCCCCA	38
	rs3768687	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGGATATGGTAAATGAAAGAAAC	44
CRHBP	rs3792738	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGTATTTTAAAACTGAAAATATAG	56
	rs2174444	CGTATTCTGAGGATAGCGGAAAAT	24
	rs10055255	CCCCCCCCGTTTATGTATAAAACAGTTTTTTGT	32
ERAP1	rs30187	GTGATGGTTATTAGGGGAAAACCC	24
	rs27044	CCCCCCCCGCACACAGGCGAGGAGTAGTAGTT	32
ERAP2	rs2549796	TTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGCAAAGCTGGAGTGACAAGGG	40
	rs2927609	CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCACTTTAATATAATCACTCTTGCAT	48
	rs11135484	CCCCCCCCCCCCCCCCCAACAACACCAACCTCACACCCAC	40