

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LORENA MACHADO AMARAL

**Efeitos de polimorfismos genéticos da iNOS sobre a
susceptibilidade a doenças hipertensivas gestacionais**

Ribeirão Preto-SP
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LORENA MACHADO AMARAL

**Efeitos de polimorfismos genéticos da iNOS sobre a
susceptibilidade a doenças hipertensivas gestacionais**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Farmacologia

**Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos**

**Ribeirão Preto-SP
2010**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amaral, Lorena Machado

Efeitos de polimorfismos genéticos da iNOS sobre a susceptibilidade a doenças hipertensivas gestacionais.
Ribeirão Preto, 2010.

64p. il. 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Óxido nítrico sintase induzida (iNOS). 2. Polimorfismos.
3. Pré-eclâmpsia. 4. Hipertensão arterial gestacional.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lorena Machado Amaral

Efeitos de polimorfismos genéticos da iNOS sobre a susceptibilidade a doenças hipertensivas gestacionais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer o que quero. Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte, tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas, elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.”

(Clarice Lispector)

"Ser feliz de uma forma realista é fazer o possível e aceitar o improvável."

(Mário Quintana)

“Buscai, pois, em primeiro lugar, seu reino e a sua justiça, e todas estas coisas vos serão acrescentadas.”

(Mateus 6, 33)

Dedico esse meu trabalho a todos aqueles que sempre acreditaram em mim, e que sempre torceram para que meus objetivos fossem alcançados. A minha mãe Márcia, pelo amor e compreensão, ao meu pai e irmão pelo carinho, aos meus amigos e, em especial Ana Carol que tornou esse trabalho possível e por estar presente em todo esse período.

Agradecimentos

A vida de todos nós é movida a desafios, e aqui lhes apresento o meu mais novo trabalho que só foi possível com ajuda de várias pessoas. Fica o meu carinho e agradecimento a todos que me auxiliaram nesta tarefa.

Agradeço está conquista a Deus, por me erguer nos momentos difíceis e sempre me ajudar a prosseguir para o alcance dos meus objetivos. Portanto, “todo aquele que pede, recebe; o que busca encontra” (Mt 7, 8).

À minha mãe Márcia, pelo apoio, amor e o incansável incentivo, contribuindo para que eu conseguisse enxergar os obstáculos ultrapassados e assim seguir com dignidade para olhar adiante e aceitar as oportunidades que a vida tem me proporcionado.

Ao meu pai Carlos que sempre se fez presente com palavras de amor e carinho, nunca me deixando esquecer que “se pudesse ter ou escolher uma outra filha, que ela fosse exatamente como sou”.

Ao meu irmão Odilon que sempre esteve ao meu lado, torcendo por mim e me fazendo sentir a irmã mais querida e amada.

A todos da minha família, especialmente Tia Neide, Tio Edolier, Tia Marilda, Kynha e a Jú, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, fazendo com que eu nunca pensasse em desistir.

À minha amiga Angélica, que se fez presente, mesmo estando longe, com suas palavras e gestos de carinho em todas as etapas desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pela sua confiança na minha capacidade e por acreditar que eu seria capaz de atender as suas expectativas. E acima de tudo, por me ensinar que o valor dos nossos resultados está na dignidade no momento de sua realização.

À minha amiga-irmã Dani por me incentivar sempre e estar presente em todos os momentos dessa caminhada, principalmente nos mais difíceis. E acima de tudo, por me ensinar que reflexões e mudanças são sempre necessárias e que sempre merecemos nos dar uma nova chance para sermos felizes.

À minha amiga Ana Carol que sempre esteve presente nos meus experimentos, pelo apoio constante, pelo companheirismo, por compartilhar as alegrias e as pequenas decepções, por auxiliar a encontrar soluções para os obstáculos cotidianos, e pela amizade desde o início.

Ao meu amigo Marcelo Luizon, pelos questionamentos, sugestões, esclarecimentos, por demonstrar que é possível descomplicar o que pode ser simplificado.

À minha amiga Jacke pela ajuda e por estar sempre ao meu lado.

À minha amiga Valéria Sandrim, pelo apoio e as palavras de incentivo.

Ao meu eterno amigo Rafael Poloni, por compartilhar uma longa jornada de desafios, de crescimento pessoal e profissional, por sua paciência e dedicação, por me ensinar que amigo: é alguém que você sente presente, mesmo quando está longe e que vem para o seu lado quando você está sozinho... e nunca nega um sentimento sincero.

Ao meu amigo Stefany, por me mostrar com suas palavras carinhosas e de incentivo que realmente “nos tornamos responsáveis por aquilo que cativamos” e mesmo com todos os obstáculos, podemos vencer e conquistar o nosso espaço.

Ao meu amigo poeta Paulo Barros, por sempre se fazer presente com suas incomparáveis poesias e por seu carinho e incentivo em todos os momentos.

À minha amiga Pam, por me ajudar a compreender e acreditar que mesmo tendo uma caminhada difícil: “Tudo podemos NAQUELE que nos fortalece e que não devemos nos inquietar com o dia de amanhã, pois o amanhã trará seus cuidados” (Mt 6,34) .

À minha amiga Fer, pelo carinho e dedicação, pela amizade sincera e as longas conversas de todos os dias, contribuindo para que eu me sentisse preparada para concluir essa etapa da minha vida.

À minha amiga Karina, pela dedicação e os conselhos sinceros.

Á minha amiga Vanessa Belo, que com sua simplicidade me ensinou a enxergar a realidade com mais leveza, pelo carinho e atenção.

À minha amiga Flávia, pelos vários conselhos e conversas que contribuíram para que eu acreditasse que qualquer que seja a nossa escolha ou trajetória, devemos nos sentir felizes com os resultados alcançados, pois, como já dizia o nosso ilustre Mário Quintana: a felicidade está na simplicidade.

Ao fefo, pela convivência diária e as palavras exatas que fizeram toda a diferença e contribuíram para meu crescimento.

À minha amiga Laura, pelo carinho, dedicação e principalmente apoio.

À minha amiga Valzinha, eterna baby, pelo carinho e atenção em todos os momentos.

À minha amiga Élen, pelo carinho e os conselhos que fizeram toda a diferença.

Ao meu amigo Diogo, pelo eterno carinho e apoio.

Ao meu amigo Alisson, pelos conselhos sensatos e apoio.

À minha Joice, pelo carinho e amizade.

A todos do Laboratório, especialmente pelo apoio.

A todos funcionários da Ginecologia/Obstetrícia do HC e em especial o Dr. Ricardo Cavalli pelo apoio e carinho de sempre.

A todas as pacientes que me confiaram suas angústias, em um momento tão importante das suas vidas que é a maternidade e que, apesar de todas as dificuldades, compreenderam a dimensão do objetivo proposto, incentivando e acreditando na realização desse trabalho.

Aos professores do departamento de Farmacologia.

À pós-graduação da Farmacologia – FMRP. Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, Soninha, Fátima e Ramón, por sempre me ajudarem naquilo que precisava

A todos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite, abdicarem dos seus afazeres diários e assim contribuírem para a conclusão desse trabalho. Muito Obrigada.

**“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho
original.” (Einstein)**

Resumo

Amaral, L. M. **Efeitos de polimorfismos genéticos da iNOS sobre a susceptibilidade a doenças hipertensivas gestacionais.** 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez caracterizada pela hipertensão e proteinúria após 20 semanas gestacionais. Afeta 3-5% das gestações no mundo e é a principal responsável pelos partos prematuros, morbidade e mortalidade neonatal. A fisiopatologia da PE não está completamente elucidada e deficiência na formação de óxido nítrico (NO) tem sido relacionada com desordens hipertensivas gestacionais. O objetivo deste trabalho foi verificar se dois polimorfismos da iNOS (NOS2A), C-1026A e S608L, e os haplótipos estão associados com PE/HAG. Estudamos 565 gestantes: 212 gestantes saudáveis (GS), 166 gestantes com hipertensão gestacional (HAG) e 187 gestantes com pré-eclâmpsia (PE). DNA genômico foi extraído através do sangue total e os genótipos dos polimorfismos C-1026A e S608L foram determinados por Real-Time PCR, utilizando Taqman® Allele Discrimination assay. Os haplótipos foram inferidos através do programa PHASE 2.1. Em relação ao polimorfismo C-1026A, nenhuma diferença estatística significativa foi evidenciada nas distribuições genotípicas e alélicas ao comparar PE ou HAG com o grupo das gestantes saudáveis. Entretanto, as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo S608L foram diferentes no grupo PE em comparação ao grupo GS. O genótipo GA e o alelo A foram mais comumente encontrados nas gestantes com PE. Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação às distribuições genotípicas e alélicas do grupo HAG comparado com o grupo GS. Esses resultados sugerem que o polimorfismo S608L do gene da iNOS está associado com PE, mas não com HAG. Nossos estudos sugerem que a iNOS pode estar envolvida na patogênese da pré-eclâmpsia, mas não na hipertensão arterial gestacional.

Abstract

Amaral, L. M. **Effects of genetics polymorphisms of iNOS on the susceptibility in hypertensive disorders of pregnancy.** 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Preeclampsia is a pregnancy-specific syndrome characterized by the new onset of hypertension and proteinuria usually after 20 weeks gestation. It affects 3–5% of pregnancies worldwide and is a leading cause of preterm birth, neonatal morbidity and mortality. The pathophysiology of preeclampsia is not completely known and deficient NO formation has been implicated in hypertensive disorders of pregnancy. The aim of this work was to examine whether two inducible nitric oxide synthase (iNOS) polymorphisms (C-1026A and S608L) and haplotypes are associated with preeclampsia and/or gestational hypertension. We studied 565 pregnant women: 212 healthy pregnant (HP), 166 pregnant with gestational hypertension (GH) and 187 pregnant with preeclampsia (PE). Genomic DNA was extracted from whole blood and genotypes for C-1026A and S608L polymorphisms were determined by Real-Time PCR, using the Taqman® Allele Discrimination assay. Haplotypes were inferred using the PHASE 2.1 program. For the C-1026A polymorphism, no significant differences were found in genotype and allele distributions when PE or GH groups were compared with HP group. However, the genotype and allele frequencies for the S608L polymorphism were different in PE subjects as compared with HP subjects. The GA genotype and the A allele were more commonly found in PE than in HP. No significant differences were found in genotypes and alleles distributions when the GH group was compared with the HP group. These findings suggest that iNOS may be involved in the pathogenesis of preeclampsia, but not with gestational hypertension.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

ANOVA – análise de variância

OR- Odds ratio

DPM- Desvio padrão da média

DHG- Doenças hipertensivas gestacionais

GS- Gestantes saudáveis

HAG- Hipertensão arterial gestacional

PE- Pré-eclâmpsia

CT – controle

DC – débito cardíaco

DCV – doenças cardiovasculares

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etileno diamino tetra acético

iNOS (NOS2A)- sintase induzida do óxido nítrico

eNOS – sintase endotelial do óxido nítrico

nNOS- sintase neuronal do óxido nítrico

FC – frequência cardíaca

HAP – haplótipo

HCl – ácido clorídrico

HT - hipertenso

IMC – índice de massa corpórea

mmHg – milímetros de mercúrio

NaOH – hidróxido de sódio

NO – óxido nítrico

EROS- espécies reativas do oxigênio

NOx – espécies relacionadas ao óxido nítrico

NF-κB- fator nuclear *Kappa* B

NS – não significativo

NT – normotenso

HA– hipertensão arterial

HAS-hipertensão arterial sistêmica

PA – pressão arterial

PAD – pressão sanguínea diastólica

PAS – pressão sanguínea sistólica

PCR – reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

RVP – resistência vascular periférica

SNP – *single nucleotide polymorphism* – polimorfismo de base única

TE – tris-ácido etileno diamino tetra acético

HLA-G- antígeno de histocompatibilidade

TNF- alfa- fator de necrose tumoral

IL-6- interleucina 6

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figuras

Figura 1- Representação esquemática da fisiopatologia da pré-eclâmpsia 24

Figura 2- Biossíntese do Óxido nítrico..... 26

Tabelas:

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados 42

Tabela 2- Equilíbrio de Hardy-Weinberg 43

Tabela 3- Freqüências genóticas e alélicas dos dois polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, gestantes apresentando hipertensão arterial gestacional e com pré-eclâmpsia 44

Tabela 4- Freqüência dos haplótipos estimados entre gestantes saudáveis, gestantes apresentando hipertensão arterial gestacional e com pré-eclâmpsia 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Alterações fisiológicas da gestação normal	17
1.2 Relevância das doenças hipertensivas gestacionais	18
1.3 Classificação das doenças hipertensivas gestacionais	19
1.3.1 Pré-eclâmpsia	19
1.3.2 Hipertensão arterial crônica	20
1.3.3 Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia	21
1.3.4 Hipertensão arterial gestacional	21
1.4 Fisiopatologia das doenças hipertensivas gestacionais	21
1.4.1 Inflamação, estresse oxidativo e pré-eclâmpsia	24
1.5 Papel do óxido nítrico na gestação normal e na pré-eclâmpsia	25
1.6 A iNOS é codificada por um gene que exibe polimorfismos	26
2 HIPÓTESE	30
3 OBJETIVOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Seleção das participantes	34
4.2 Materiais	35
4.2.1 Soluções e Tampões	35
4.2.2 Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais	35
4.3 Métodos	35
4.3.1 Processamento das amostras de sangue	35
4.3.2 Extração do DNA genômico	36
4.3.3 Genotipagens	37
4.3.3.1 Polimorfismos da região Promotora (C-1026A) e Exon 16 (S608L) do gene da iNOS	37
4.4 Análise dos resultados e determinação da frequência estimada dos haplótipos	37
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	54
ANEXOS	61

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alterações fisiológicas da gestação normal

A gestação normal está associada a ajustes fisiológicos e anatômicos que acarretam acentuadas mudanças no organismo materno, incluindo a composição dos elementos figurados e humorais do sangue circulante. São observadas diversas adaptações cardiovasculares na gestante que permitem o suprimento constante de nutrientes e metabólitos ao feto, sem comprometer as necessidades maternas. Estas alterações são resultantes de interações complexas entre hormônios, substâncias vasoativas e vários outros fatores (Pridjian and Puschett 2002; Longo, Dola et al. 2003).

Durante a gravidez, há uma elevação do volume sanguíneo total em cerca de 40 a 50%, como decorrência do aumento tanto do volume plasmático quanto da massa total de eritrócitos e leucócitos na circulação. O débito cardíaco (DC) se eleva de 30% a 50%; a frequência cardíaca (FC) também se eleva (Rovinsky and Jaffin 1965; Hytten 1985). A partir destas alterações hemodinâmicas, poderíamos esperar um aumento da pressão sanguínea durante a gravidez. No entanto o contrário é observado, ou seja, uma gravidez normal é caracterizada por diminuições da pressão sanguínea sistólica e diastólica até a 16^o e 20^o semana de gestação (MacGillivray, Rose et al. 1969; Maynard, Epstein et al. 2008). Esta mudança se deve à diminuição significativa da resistência vascular periférica (RVP), a qual é devida predominantemente à vasodilatação, à redução da resposta aos vasoconstritores e à angiogênese (Roberts and Gammill 2005; Maynard, Epstein et al. 2008).

A gravidez de algumas mulheres não é acompanhada por estas alterações hemodinâmicas que permitem a acomodação do volume corpóreo e conseqüente decréscimo da pressão sanguínea, conduzindo a quadros de doenças hipertensivas gestacionais (Rovinsky and Jaffin 1965).

1.2 Relevância das doenças hipertensivas gestacionais

As doenças hipertensivas gestacionais (DHG) abrangem um amplo espectro de doenças, desde hipertensão gestacional até pré-eclâmpsia (PE) severa.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma complicação comum na gravidez e a maior causa de morbi-mortalidade. Ocorre em torno de 12 a 22% das gestações e é responsável por 17,6% das mortes maternas (1988; MacKay, Berg et al. 2001).

As mulheres que desenvolvem DHG têm risco aumentado de desenvolver descolamento prematuro da placenta, insuficiência renal, complicações cerebrovasculares, cardiovasculares, hepáticas, coagulopatias e morte materna e/ou perinatal (Sibai, Dekker et al. 2005). Ainda, estudos recentes, têm evidenciado que no futuro, essas mulheres terão risco aumentado de desenvolverem doenças cardiovasculares e doenças metabólicas quando comparadas com pacientes que tiveram uma gestação normal (Kaaja and Greer 2005).

Dentre as DHG, a pré-eclâmpsia é a desordem associada à gravidez mais freqüente, liderando as causas de mortalidade e morbidade materna e fetal (MacKay, Berg et al. 2001; Zhang, Meikle et al. 2003).

1.3 Classificação das doenças hipertensivas gestacionais

Entre os tipos de hipertensão presentes na gravidez, merecem destaque as manifestações específicas da gestação, isto é, a pré-eclâmpsia, que ocorre como forma isolada ou associada à hipertensão arterial crônica, e a hipertensão gestacional. A pré-eclâmpsia, isolada ou superposta à hipertensão arterial crônica, está associada aos piores resultados, maternos e perinatais, das síndromes hipertensivas (Roberts, Pearson et al. 2003).

Os critérios de diagnóstico de hipertensão arterial na gravidez são específicos e caracterizam-se por aumento de pelo menos 30mmHg na pressão arterial sistólica (PAS) e/ou 15mmHg na pressão arterial diastólica (PAD), em relação à média dos valores obtidos antes da 20ª semana. Quando a pressão arterial (PA) prévia for desconhecida, valores >140/90mmHg em duas aferições, com intervalo mínimo de 4h, em repouso, são considerados anormais. De acordo com a Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Vasconcelos MJA 2002), podemos classificá-las em: pré-eclâmpsia; hipertensão arterial crônica; hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia e hipertensão arterial gestacional.

1.3.1 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez, envolve a falência de vários órgãos, sendo caracterizada, clinicamente, pelo aumento dos níveis da pressão arterial (PAS > 140mmHg ou PAD > 90mmHg) e proteinúria (excreção de proteína urinária \geq 300mg/24h), com início após 20ª semana

gestacional em gestante previamente normotensa (Pridjian and Puschett 2002; Vasconcelos MJA 2002).

Estima-se que 3-5% das gestantes têm alterações devido a essa desordem, ocasionando em complicações maternas e fetais tais como distúrbios renais, edema cerebral, prematuridade do parto e morte (Samadi, Mayberry et al. 1996). Essas complicações podem explicar a alta incidência de mortalidade e morbidade fetal e materna, o que faz da pré-eclâmpsia uma das principais causas de morte materna no Brasil (37% das causas de morte obstétricas diretas e em vários outros países (Saftlas AF 1990;163(2):460-5.; Laurenti R 2004;7(4):449-60.).

A evolução natural da doença, quando não tratada ou não se interrompe a gestação, é o desenvolvimento para as formas graves, entre elas, a eclâmpsia e a síndrome HELLP.

A eclâmpsia é o aparecimento de convulsões em paciente com pré-eclâmpsia ou hipertensão gestacional, na ausência de epilepsia e outras doenças convulsivas (Longo, Dola et al. 2003). Pode ocorrer durante a gestação, na evolução do trabalho de parto e no puerpério imediato (Vasconcelos MJA 2002).

A síndrome HELLP: associação entre hemólise, plaquetopenia e disfunção hepática, é uma complicação da PE grave/Eclâmpsia e proteinúria pode ou não estar presente nessa síndrome.

1.3.2 Hipertensão arterial crônica

A hipertensão crônica ocorre em cerca de 3 a 5% das gestações. Caracterizada pela presença da hipertensão arterial sistêmica presente antes da gravidez, diagnosticada pela primeira vez antes da 20ª semana gestacional ou

persistente após 12 semanas pós-parto (Vasconcelos MJA 2002; Longo, Dola et al. 2003).

1.3.3 Hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia

A hipertensão arterial crônica superposta por pré-eclâmpsia caracteriza-se pela proteinúria aguda intensa, aumento repentino da pressão arterial, trombocitopenia, ou níveis elevados das enzimas hepáticas iniciados após a 20ª semana gestacional em gestante com hipertensão arterial preexistente. Ocorre em aproximadamente 20 a 25% das mulheres com HAS crônica (Vasconcelos MJA 2002; Longo, Dola et al. 2003).

1.3.4 Hipertensão arterial gestacional

A hipertensão arterial gestacional (HAG) é definida pelo aumento da pressão arterial sem proteinúria. Hipertensão (PAS > 140mmHg ou PAD > 90mmHg) diagnosticada pela primeira vez após a 20ª semana gestacional. Este é um grupo heterogêneo: pacientes com hipertensão crônica que não conheciam esta situação, HAS transitória da gestação que se normaliza no pós-parto e pacientes que desenvolvem PE (Vasconcelos MJA 2002; Longo, Dola et al. 2003).

1.4 Fisiopatologia das doenças hipertensivas gestacionais

A fisiopatologia das DHG permanece não elucidada, mas predisposição genética, mal adaptação imunológica resultante em isquemia placentária e

conseqüente distúrbio materno vascular endotelial, além da falha da placentação, são amplamente aceitos.

A redução da perfusão placentária tem sido citada como um fator primordial para desenvolvimento da pré-eclâmpsia (figura 1). Durante o início do segundo trimestre da gestação normal (18-20^o semanas) instala-se um processo referido como “pseudovasculogenese”, o qual é caracterizado pela migração das células do citotrofoblasto em direção às arteríolas uterinas espiraladas, onde sofrem diferenciação em células com fenótipo endotelial. Nesse processo ocorre remodelação gradual da camada endotelial destes vasos e destruição do tecido elástico-muscular das artérias e arteríolas, tornando-as mais dilatadas (Lyll, Bulmer et al. 1999; Redman and Sargent 2005). Esta migração/diferenciação das células do citotrofoblasto deve-se a alterações nos perfis de expressão de certas citocinas, moléculas de adesão, constituintes da matrix extracelular, metaloproteinases e do antígeno de histocompatibilidade (HLA-G)(Roberts, Taylor et al. 1991). A ação citotrofoblástica combinada (vascular e intersticial) assegura suprimento sanguíneo adequado ao crescimento fetal por aumentar o calibre das artérias maternas (Lyll, Bulmer et al. 1999).

Na pré-eclâmpsia, parece ocorrer uma ausência ou diminuição da invasão trofoblástica, levando à modificação incompleta das artérias espiraladas maternas e, conseqüentemente, à redução da perfusão sanguínea placentária (Roberts, Taylor et al. 1991; Redman and Sargent 2005).

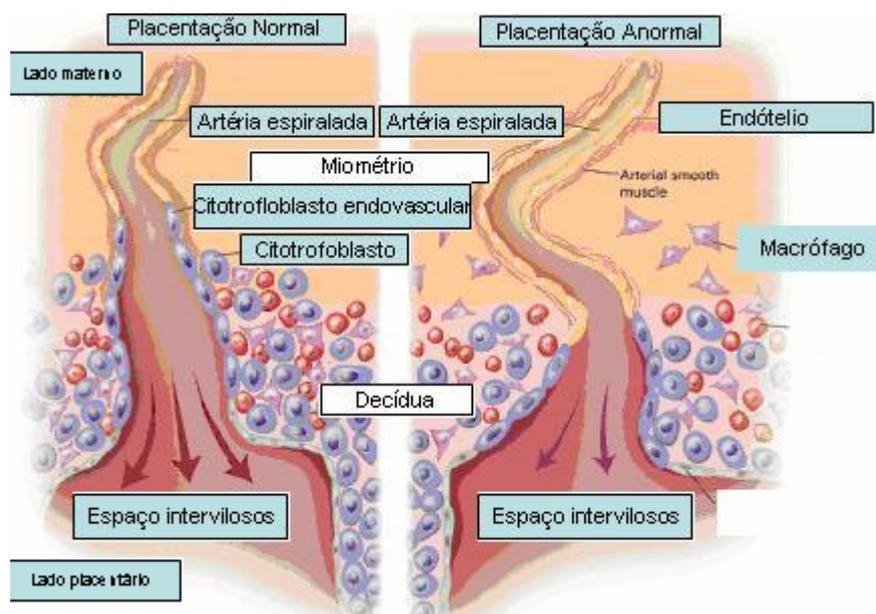


Figura 1. Representação esquemática da fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Redman and Sargent 2005). Adaptado de Redman, *et al.*, 2005.

A demanda placentária para corrigir o suprimento sanguíneo inadequado ao feto está, entretanto, em desproporção com o fluxo sanguíneo materno necessário para irrigar seus órgãos. Nesse estágio, a síndrome torna-se sistêmica na mãe, afetando múltiplos órgãos, com presença clínica de edema generalizado e diversos outros sinais e sintomas (Roberts, Taylor et al. 1991).

Especificamente, a perda do controle do tônus vascular conduz à hipertensão e aumenta a permeabilidade vascular glomerular, provocando a proteinúria, e a expressão endotelial alterada de fatores da coagulação resulta em coagulopatia (Stegers, von Dadelszen et al.).

Na pré-eclâmpsia há evidências de um desequilíbrio entre agentes vasodilatadores e vasoconstritores, resultando em redução da perfusão placentária e hipóxia que, de certa forma, estariam relacionadas à liberação de fatores na circulação materna ocasionando disfunção endotelial sistêmica (Noris, Perico et al. 2005; Sandrim, Palei et al. 2008).

1.4.1 Inflamação, estresse oxidativo e pré-eclâmpsia

A PE não pode ser atribuída somente à redução da perfusão placentária. Atualmente, dois fatores são considerados importantes no processo fisiopatológico da doença: o quadro de peroxidação lipídica e a exacerbação da resposta inflamatória sistêmica (Redman, Sacks et al. 1999). Sob vários aspectos, essas duas hipóteses se confundem em uma só, visto que podem ser entendidas como processos complementares, visto que a primeira é capaz de desencadear a segunda situação clínica.

Parece que gestações com invasão trofoblástica deficiente tendem a desenvolver hipóxia tissular, levando a produção aumentada de peróxido lipídico no tecido placentário e elevação dessa substância na circulação fetoplacentária. A capacidade de peróxidos lipídicos de lesar células endoteliais é conhecida de longa data, sendo este o ponto de contato entre as duas teorias, já que a resposta inflamatória sistêmica, na maior parte das vezes, se inicia com a lesão endotelial (Redman, Sacks et al. 1999; Sankaralingam, Arenas et al. 2006).

Esse estresse oxidativo pode afetar a reatividade vascular por diferentes mecanismos, uma vez que as espécies reativas de oxigênio funcionam como segundos mensageiros, ativando várias moléculas de sinalização, desempenhando um papel importante na fisiopatologia dessa doença.

Dessa maneira, a inflamação e o estresse oxidativo podem agir sinergicamente e ocasionar a disfunção endotelial durante a pré-eclâmpsia.

1.5 Papel do óxido nítrico na gestação normal e na pré-eclâmpsia

Na gravidez normal ocorrem importantes alterações na hemodinâmica cardiovascular materna. Essas modificações incluem o aumento do volume sanguíneo através da vasodilatação sistêmica relacionada à formação do óxido nítrico (NO) (Noris, Todeschini et al. 2004).

Estudos sugerem que o óxido nítrico tem um papel importante na regulação da resistência vascular durante a gestação normal e pré-eclâmpsia. O NO é um potente vasodilatador que é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da óxido nítrico sintase (NOS) (figura 2), uma enzima existente em três isoformas: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS, NOS1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS, NOS2) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, NOS3) (Moncada and Higgs 1993).

A eNOS e a nNOS são enzimas constitutivas produzidas em condições fisiológicas, enquanto a iNOS é uma isoforma induzida da enzima expressa em condições inflamatória (Moncada and Higgs 1993).

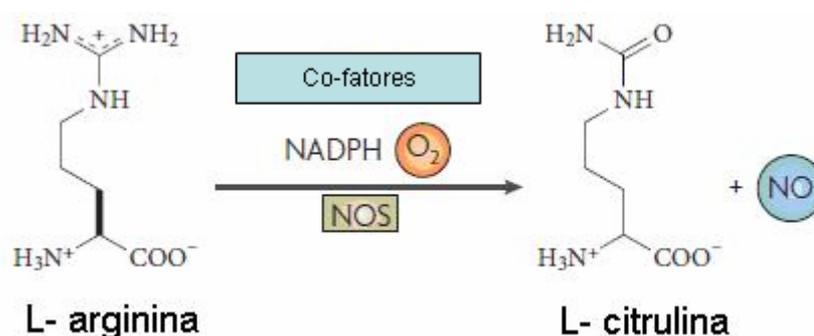


Figura 2. Biossíntese do Óxido nítrico (Calabrese, Mancuso et al. 2007). Adaptado de Calabrese, *et. al.*, 2007.

Em processo fisiológicos cardiovasculares, L-arginina é convertido em NO pela ação da eNOS, existente em células endoteliais (Palmer, Rees et al. 1988). No

entanto, em processos patológicos de doenças cardiovasculares, como no choque séptico, a iNOS, existente principalmente nas células musculares lisas, produz mais NO que a eNOS (Kuo and Schroeder 1995). Essa formação de NO, via iNOS, tem um efeito potencialmente citotóxico, enquanto as quantidades relativamente pequenas de NO, via eNOS, tem uma ação citoprotetora no sistema cardiovascular (Loscalzo and Welch 1995).

Embora a biodisponibilidade do NO possa estar diminuída em mulheres com pré-eclâmpsia (Lopez-Jaramillo, Arenas et al. 2008), níveis aumentados da iNOS tem sido demonstrados na inflamação e alguns estudos tem sido conduzidos para verificação da expressão do mRNA da iNOS em PE e gestações normais (Napolitano, Miceli et al. 2000; Okawa, Asano et al. 2004). Na verdade, o aumento da atividade da iNOS vascular e / ou expressão da proteína têm sido descritos na hipertensão (Hong, Loh et al. 2000).

Durante a pré-eclâmpsia é observado um aumento do estresse oxidativo, com elevação de espécies reativas do oxigênio (EROS), como o ânion O_2^- , que se combina com o NO para formar o $ONOO^-$. A formação de $ONOO^-$ durante essa desordem gestacional pode ser favorecida pelas altas concentrações de NO, como consequência da expressão aumentada da iNOS (Sankaralingam, Arenas et al. 2006).

1.6 A iNOS é codificada por um gene que exhibe polimorfismos

Dizemos que um gene é polimórfico quando variações específicas da seqüência de bases do gene são encontradas com freqüência mínima de 1% em uma população. Essas variações genéticas (polimorfismos) podem condicionar a

variabilidade dos indivíduos à susceptibilidade a doenças, bem como nas respostas aos fármacos (Collins and McKusick 2001).

Um tipo mais comum de polimorfismo investigado em relação a doenças humanas é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) que é caracterizado pela alteração, entre os indivíduos, de um nucleotídeo por outro em uma mesma base do DNA. SNPs na região reguladora de iNOS têm sido amplamente estudados em relação à malária, onde um possível associação foi encontrada (Kun, Mordmuller et al. 1998). Na hipertensão arterial, SNPs do gene da iNOS também têm sido relacionados com a susceptibilidade para desenvolvimento da doença (Li, Liu et al.; Fu, Zhao et al. 2009). Enquanto na pré-eclâmpsia poucos estudos ainda foram realizados (Bhatnagar, Bhattacharjee et al. 2007).

O gene que codifica a iNOS apresenta vários polimorfismos, 27 exons, e está localizado no cromossomo 17 dos seres humanos. O promotor desse gene é um dos maiores e mais complexos entre os conhecidos, indicando que sua expressão está sob fino controle. Inúmeros elementos responsivos a citocinas foram encontrados da região -4Kb até o sítio de início da transcrição (+1) (Chartrain, Geller et al. 1994; Chu, Wu et al. 1995; Taylor, de Vera et al. 1998). A região promotora da iNOS tem sido largamente estudada e relacionada com diversas doenças (Warpeha, Xu et al. 1999; Rutherford, Johnson et al. 2001; Morris, Markus et al. 2002; Shen, Wang et al. 2004; Motallebipour, Rada-Iglesias et al. 2005; Martin, Martinez et al. 2007; Barcellos, Ramsay et al. 2008).

Alterações na expressão de iNOS podem ocasionar em um efeito anti-hipertensivo através do relaxamento vascular de células musculares por NO, ou um efeito pró-hipertensivo através do estresse oxidativo por excesso de NO derivado peroxinitrito (ONOO⁻) (Hong, Loh et al. 2000). Portanto, a investigação do gene iNOS

possivelmente poderá contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia das doenças hipertensivas gestacionais.

Especificamente, no gene da iNOS, dois SNPs parecem ser clinicamente relevantes. Um deles está localizado no nucleotídeo -1026 na região promotora. Nesta base, pode estar presente o nucleotídeo citosina (C, mais comum) ou adenina (A, mais raro). Por isso, este polimorfismo é descrito como C-1026A (*rs2779249*). Estudos demonstraram que esse SNP está relacionado com risco de desenvolvimento da hipertensão em população chinesa (Li, Liu et al.; Fu, Zhao et al. 2009). O outro SNP clinicamente relevante está localizado no exon 16 deste gene e é caracterizado pela troca de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo 2087 do gene. Esta troca leva a alteração de uma serina (mais comum) por uma leucina (mais raro) no aminoácido 608 da proteína iNOS. Por isso, este polimorfismo é descrito como S608L (*rs2297518*). Com relação à funcionalidade destes variantes, várias evidências sugerem que esta alteração (Ser→Leu) modifica a expressão do gene da iNOS e altera a susceptibilidade de doenças, como o câncer (Li, Liu et al.; Wang, Davis et al. 2006; Lee, Kang et al. 2009).

Devido a evidente importância do NO na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, vários estudos relacionados com verificação de expressão do mRNA iNOS têm sido propostos, porém poucos estudos relacionados a polimorfismos da iNOS já foram realizados em relação as desordens hipertensivas gestacionais, sendo o nosso grupo o primeiro a verificar a relevância clínica dos polimorfismos, citados acima, da sintase induzida do óxido nítrico para a susceptibilidade a doenças hipertensivas gestacionais.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Neste estudo, formulamos a hipótese de que pode haver associação entre polimorfismos do gene da iNOS e o risco de desenvolvimento de doenças hipertensivas gestacionais.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- Investigar se existe associação de pré-eclâmpsia ou de doença hipertensiva gestacional com dois polimorfismos genéticos da iNOS: os SNPs C-1026A (*rs2779249*) e S608L (*rs2297518*);
- Investigar se haplótipos do gene da iNOS que incluam os dois polimorfismos acima mencionados estão associados com pré-eclâmpsia ou com doença hipertensiva gestacional.
- Comparar as frequências genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos do gene entre gestantes saudáveis, gestantes apresentando HAG ou pré-eclâmpsia.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das participantes

Para realização deste estudo, foram selecionadas 167 grávidas com HAG e 187 grávidas com pré-eclâmpsia em seguimento no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do HCFMRP-USP, além de 212 gestantes sadias do ambulatório de pré-natal normal da MATER. O presente estudo é um sub-projeto do projeto intitulado “Farmacogenética do tratamento anti-hipertensivo de pacientes com pré-eclâmpsia: relevância do haplótipo da eNOS”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, de acordo com o processo HCRP n° 4682/2006.

Os diagnósticos de HAG e pré-eclâmpsia foram feitos com base nas orientações da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Vasconcelos MJA 2002). Foram assinaladas com HAG as gestantes que apresentaram hipertensão após 20^o semana de gestação, caracterizada por pressão arterial sistólica > 140mmHg e diastólica > 90mmHg em duas aferições de pressão arterial, com intervalo mínimo de 4h, em repouso. Enquanto, foram consideradas pré-eclâmplicas as gestantes que apresentaram hipertensão após a 20^o semana de gestação e proteinúria ($\geq 0,3\text{g}$ em urina de 24 horas).

Dentre as voluntárias que aceitaram participar desse estudo, após explicação detalhada do projeto e assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (anexo ao projeto), foram coletados 8 ml de sangue venoso, empregando procedimentos de rotina. O sangue venoso das gestantes foi coletado durante o atendimento clínico e foi utilizado para genotipagens.

4.2 Materiais

4.2.1 Soluções e Tampões

- Solução de Acetato de potássio
- Solução de Proteinase K
- Etanol 70%
- Isopropanol
- Tampão Cell lysis (1% Tris-Cl pH8, 0,2% EDTA pH8 e 0,1% SDS)
- Tampão Red Blood Cell Lysis (2% Tris-Cl pH8 1M)
- Tampão Tris-EDTA (TE) (1% Tris-Cl pH8 1M, 0,2% EDTA pH8)

4.2.2 Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais:

- Centrífuga (CELM LS – 3 plus)
- Real time PCR (Taqman Allele Discrimination assay -Applied Biosystems)
- Banho Maria (Nova Ética)
- Espectrofotômetro para quantificação da concentração de DNA genômico extraído.

4.3 Métodos

4.3.1 Processamento das amostras de sangue

As amostras de sangue venoso periférico foram coletadas, utilizando EDTA como agente anticoagulante. Após a homogeneização do sangue, alíquotas

destinadas à genotipagem foram armazenadas em três tubos devidamente rotulados e armazenados a -20°C .

4.3.2 Extração do DNA genômico (Sambrook J 2001)

Para a extração do DNA de cada amostra, em três tubos eppendorfs adicionamos 300 μL de *sangue Total* e 900 μL de *Tampão Red Blood Cell*. Homogeneizamos por 10 minutos e após, os tubos foram centrifugados por 20 seg a máxima velocidade (temp. ambiente). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram reunidos em um único tubo. Adicionamos *Tampão Cell Lysis* gelado, e os tubos foram homogeneizados invertendo-os de 30 a 50 vezes (precipitação SDS).

Adicionamos 3 μL de proteinase K (20 mg/mL) e este tubo foi incubado em banho-maria a 55°C de 3 a 16 h, posteriormente sendo resfriado a temperatura ambiente. Então, 200 μL de solução de Acetato de Potássio foram adicionados, misturando em vortex por 20 seg. Incubamos em gelo por 5 min e em seguida centrifugamos a velocidade máxima por 3 min a 4°C . Em um novo tubo colocamos o sobrenadante juntamente com 600 μL de Álcool Isopropílico (Isopropano), este foi homogeneizado e centrifugado a máxima velocidade por 1 min, sendo o sobrenadante descartado por aspiração. Foram adicionados 600 μL de Etanol 70% ao pellet de DNA para lavá-lo. Centrifugamos a máxima velocidade por 1 min. Removemos o sobrenadante por aspiração e com papel de filtro.

O *pellet* de DNA foi seco a temperatura ambiente por 15 min, e em seguida foi redissolvido em 50 μL de TE (pH 7,6), incubando em banho maria a 65°C por 1 hora, ou 16h à temperatura ambiente. Posteriormente realizamos a quantificação do DNA genômico em espectrofotômetro (Thermo Scientific, USA).

4.3.3 Genotipagens (Fu, Zhao et al. 2009; Lee, Kang et al. 2009)

4.3.3.1 Polimorfismos da região Promotora (C-1026A) e Exon 16 (S608L) do gene da iNOS

□ **Real Time PCR - TaqMan (Applied Biosystems)**

Os genótipos para esses polimorfismos foram determinados por Real-Time PCR, sendo o kit utilizado o “Taqman® Allele Discrimination assay” e o detector de fluorescência o Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratories, CA, USA), sendo que todos os ensaios e *probes* utilizados foram desenhados pela Applied Biosystems.

Para a realização da genotipagem preparamos uma solução de PCR contendo, no volume final de 12 uL/amostra: 6uL de TaqMan 2X PCR Master Mix, 0,6 uL de Primer Assay 20X (900 nM de cada primer e 200 nM de cada probe), 4,2 uL de água e 1,2 uL de DNA. Procedemos a PCR conforme instruções do fabricante: 1 ciclo de 10 min a 95°C (Ultra Pure AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Enzyme Activation), seguido de 40 ciclos para a desnaturação do DNA a 92°C por 15s e anelamento/extensão a 60°C por 1 min. Os resultados foram analisados com o software do Chromo 4 Detector.

4.4 Análise dos resultados e determinação da frequência estimada dos haplótipos

As características clínicas e bioquímicas foram comparadas entre os grupos estudados utilizando-se o teste *t* de *Student* não-pareado ou por ANOVA de uma via. Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. As

distribuições dos genótipos para cada polimorfismo foram avaliadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O Programa PHASE v2.1 foi utilizado para a determinação dos haplótipos resultantes da combinação dos dois polimorfismos (C-1026A, S608L) e estimativa da frequência destes, respectivamente (Stephens, Smith et al. 2001; Stephens and Donnelly 2003). Diferenças nas frequências genóticas, alélicas e haplotípicas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

A primeira etapa deste trabalho foi verificar se haveria uma associação entre polimorfismos genéticos da iNOS e a hipertensão arterial gestacional e pré-eclâmpsia na população brasileira, uma vez que não havia dados sobre esta população. Desta maneira, analisamos os polimorfismos da iNOS separadamente e posteriormente verificamos se os mesmos apresentaram interações, contribuindo conjuntamente para susceptibilidade da HAG ou PE.

Na tabela 1 estão sumarizadas as características das 565 gestantes selecionadas neste estudo. Como esperado, as gestantes com hipertensão e pré-eclâmpsia apresentaram uma maior pressão arterial sistólica e diastólica em comparação com as gestantes saudáveis. Entretanto esses valores foram inferiores a 140/80 mmHg, uma vez que a maioria dessas pacientes tinham recebido terapia farmacológica (metildopa, na maioria dos casos). As gestantes saudáveis (GS) e gestantes com hipertensão/pré-eclâmpsia (HAG; PE) foram similares quanto à idade, etnicidade, fumantes, número relativo de primigestas, índice de massa corporal, concentração de glicose, taxas de hemoglobina e hematócrito, idade gestacional e creatinina. Entretanto, houve diferenças significativas quanto a peso fetal, pressão sanguínea sistólica e diastólica e proteinúria. Estes parâmetros foram superiores em mulheres com pré-eclâmpsia quando comparados com gestantes saudáveis.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Parâmetros	GS (n= 212)	HAG (n=166)	PE (n =187)
Idade(anos)	26,54 ± 6,6	26,53 ± 6,8	26,97 ± 6,0
Etnicidade(% brancos)	74,3%	72,3%	67,0%
Fumantes (%)	14,6%	20,7%	16,3%
Primigesta (%)	46,7%	38,9%	43,3%
IMC (kg/m ²)	29,7±3,8	27,9 ±6,3	26,3±5,8
PSS (mmHg)	112,7±10,6	131,4±16,5*	136,9±21,6*
PSD (mmHg)	72,9±8,2	83,1±13,0*	86,7±12,41*
FC (batimentos/min)	82,8±6,8	82,2±7,9	81,71±7,6
Glicemia (mg/dL)	72,7±11,4	73,5±8,4	74,5±11,8
Hb (g/dl)	11,7±1,7	12,1±1,2	11,9±1,7
Hct (%)	35,6±5,2	36,3±3,5	36,2±5,2
Creatinina (µmol/l)	61,9±10,2	53,8±10,3	58,15±13,3
Proteinúria (mg/24 h)	ND	153,5±76,6	1169±1665*
Peso fetal (g)	3258±575,1	3208±595,1	2777±816,5*
Idade gestacional	35,9±4,3	36,2±4,2	35,6±2,9

IMC indica índice de massa corporal (kg/m²); PSS, pressão sanguínea sistólica (mmHg); PSD, pressão sanguínea diastólica (mmHg); FC, frequência cardíaca (batimentos/minuto); Hb, hemoglobina; Hct, hematócrito; ND: não determinado. (teste t de Student).

Valores expressos como médias ± DPM

*P<0,05 comparado ao grupo de grávidas saudáveis.

*P< 0,05 comparado ao grupo de grávidas com hipertensão gestacional.

O exame das frequências genotípicas dos controles (indivíduos livre de doença) quanto à aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) fornece uma indicação da qualidade no planejamento e execução do estudo de associação (Zintzaras and Lau 2008). Desvios do EHW podem ser devidos a erros de genotipagem, estratificação populacional, e viés na escolha do recrutamento dos controles (Xu, Turner et al. 2002; Zintzaras and Lau 2008).

Erros na genotipagem dos dados podem levar a erros severos na análise do estudo de associação, introduzindo viés e perda de precisão e, além disso, o poder de detectar associações é diminuído.

Dessa maneira, observamos que as distribuições dos genótipos para os dois polimorfismos estudados no nosso trabalho se mostraram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2).

Tabela 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

HARDY-WEINBERG	C-1026A	GS (n=212)	HAG (n=166)	PE (n=187)
Observado	CC	88	67	67
	CA	99	78	97
	AA	25	21	23
	p	0,65	0,64	0,62
	q	0,35	0,36	0,38
Esperado	CC	90	68	72
	CA	97	77	88
	AA	26	22	27
	χ^2	0,06	0,03	0,94
	P	0,97	0,98	0,62
Observado	S608L	GS	HAG	PE
	GG	155	122	114
	GA	53	44	68
	AA	6	0	5
	p	0,85	0,87	0,79
q	0,15	0,13	0,21	
Esperado	GG	153	126	117
	GA	54	38	62
	AA	5	3	8
	χ^2	$\chi^2=0.10$	3,50	1,00
	P	0,95	0,17	0,60

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo C-1026A quando comparadas gestantes saudáveis e gestantes com hipertensão/pré-eclâmpsia ($P>0,05$, tabela 3). Entretanto, observamos diferença significativa entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo S608L ($P<0,05$, tabela 3).

Tabela 3. Frequências genótípicas e alélicas dos dois polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia

	Genótipos	GS (n=212)	HAG (n=166)	OR (95% CI)	P	PE (n=187)	OR (95% CI)	P
C-1026^a	CC	88(41%)	67(40%)	1,00 (referencia)		67(36%)	1,00 (referencia)	
	CA	99(47%)	78(47%)	1,03(0,67 - 1,6)	NS	97(52%)	1,29(0,84 - 1,97)	NS
	AA	25(12%)	21(13%)	1,10(0,57 - 2,13)	NS	23(12%)	1,21(0,63 - 2,31)	NS
				$\chi^2 = 0,09$	NS		$\chi^2=1,39$	NS
Alelos								
	C	275(65%)	212(64%)	1,00(referencia)		231(62%)	1,00(referencia)	
	A	149(35%)	120(36%)	1,05(0,77 - 1,41)	NS	143(38%)	1,14(0,86 - 1,53)	NS
			332			374		
S608L	GG	155(73%)	122(73%)	1,00 (referencia)		114(61%)	1,00 (referencia)	
	GA	53(25%)	44(27%)	1,05(0,66 - 1,68)	NS	68(36%)	1,74(1,13 - 2,69)	0,01*
	AA	6(2%)	0	0,10(0,005 - 1,75)	NS	5(3%)	1,13(0,34 - 3,80)	NS
				$\chi^2=4,78$	NS		$\chi^2=6,411, 2$	0,04*
	G	363(85%)	288(87%)	1,00(referencia)		296(79%)	1,00(referencia)	
	A	65(15%)	44(13%)	0,85(0,57 - 1,29)	NS	78(21%)	1,47(1,02 - 2,12)	0,04*

GS, gestantes saudáveis; HAG, gestantes com hipertensão arterial gestacional; PE, gestantes com pré-eclâmpsia; OR, odds ratio; CI, intervalo de confiança; NS: não significativo.

* P<0,05 comparado ao grupo de gestantes saudáveis. (teste do qui-quadrado, X^2).

Como apresentado na introdução, uma possível causa das inconsistências dos estudos de associação se dá devido à análise de cada polimorfismo isoladamente. Desta maneira, o passo seguinte deste trabalho foi avaliar se havia diferenças nas distribuições dos haplótipos envolvendo variantes genéticas dos dois polimorfismos analisados (C-1026A, S608L).

Apesar da análise haplotípica parecer ser uma melhor ferramenta para a identificação de genes candidatos que possam predispor a doenças cardiovasculares, visto que a análise combinada de marcadores genéticos em uma região de interesse (haplótipo) pode ser mais informativa do que o teste de efeitos destes marcadores (polimorfismos) isoladamente (Crawford Dc), observamos pequenas diferenças nas distribuições de frequências haplotípicas entre os

grupos de voluntárias estudadas, embora nenhuma destas diferenças tenham sido estatisticamente significativas ($P > 0,05$, tabela 4).

Tabela 4. Frequência de haplótipos estimados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia

	Haplótipos		GS (n=212)	HAG (n=166)	OR (95% CI)	P	PE (n=187)	OR (95% CI)	P
	C-1026A	S608L							
H1	C	G	0,59	0,59	1,00 0,88(0,411,89)	NS	0,54	1,00	NS
H2	C	A	0,06	0,05	1,09(0,77-1,56)	NS	0,08	1,42(0,72-2,81)	NS
H3	A	G	0,26	0,28	0,86(0,50-1,50)	NS	0,30	1,24(0,88-1,76)	NS
H4	A	A	0,09	0,08		NS	0,09	1,04(0,61-1,80)	NS
					$\chi^2=1,05$				
						$\chi^2=3,80$			

GS, gestantes saudáveis; HAG, gestantes com hipertensão arterial gestacional; PE, gestantes com pré-eclâmpsia; OR, odds ratio; CI, intervalo de confiança.

* $P < 0,0125$ (0,05/4 ou 0,05/número de haplótipos).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo foram: (I) parece haver associação entre genótipos do polimorfismo S608L do gene da iNOS e pré-eclâmpsia; (II) observamos ausência de associação entre o polimorfismo C-1026A e doenças gestacionais; (III) não houve associação de haplótipos da iNOS e doenças hipertensivas da gestação.

Nenhum outro trabalho prévio examinou a possível associação dos polimorfismos da iNOS estudados aqui com doenças hipertensivas da gravidez. Embora esta constatação dificulte a comparação dos nossos resultados com outros estudos, há na literatura apenas um estudo que associou outros polimorfismos da iNOS com PE (Bhatnagar, Bhattacharjee et al. 2007). Nesse único estudo, Bhatnagar e colaboradores (2007) estudaram 4 polimorfismos da iNOS localizados nos éxons 2, 8 e 16 e observaram que dois apresentaram associação com pré-eclâmpsia.

A análise conjunta destes 2 estudos (um prévio e o presente) nos leva a sugerir haver associação entre polimorfismos da iNOS e PE.

O promotor do gene iNOS é um dos maiores e mais complexos entre os conhecidos, indicando que sua expressão está sobre fino controle. Baseando-se no fato de que seu modo predominante de regulação gênica é no estágio transcricional, a região promotora desse gene tem sido largamente estudada e relacionada com diversas doenças (Warpeha, Xu et al. 1999; Rutherford, Johnson et al. 2001; Morris, Markus et al. 2002; Shen, Wang et al. 2004; Motallebipour, Rada-Iglesias et al. 2005; Martin, Martinez et al. 2007; Barcellos, Ramsay et al. 2008).

Fu e colaboradores (2009) demonstraram que o polimorfismo da região promotora, C-1026A, é um SNP funcional e está associado com hipertensão em população chinesa (Fu, Zhao et al. 2009). A atividade transcricional do promotor com alelo C foi aproximadamente quatro vezes menor que com alelo A, indicando que iNOS/C-1026A está envolvido em uma variação funcional potente na transcrição da iNOS.

Uma possível causa da inconsistência de resultados (associação em alguns estudos, mas não em outros) pode ser devido a problemas relacionados à estratificação populacional secundária à diversidade étnica na composição dos grupos de estudo (casos versus controles), que é um fator capaz de reduzir em muito o poder dos estudos de associação (Cardon).

Em relação ao polimorfismo S608L, autores demonstraram que esse polimorfismo, no éxon 16, tem papel importante na susceptibilidade da diabetes, câncer e risco de desenvolvimento de linfoma (Li, Liu et al.; Wang, Davis et al. 2006; Lee, Kang et al. 2009). Wang e colaboradores (2006) demonstraram que a alteração (Ser→Leu) está associada com desenvolvimento de linfoma. Observaram o aumento da atividade enzimática e expressão da iNOS, resultando em uma maior produção de óxido nítrico e inflamação (Wang, Davis et al. 2006).

Durante a pré-eclâmpsia, ocorre um perfil de produção anormal das citocinas, exacerbação da inflamação, sendo hipóxia útero-placentário aceita como fator responsável por essa alteração. Essa inflamação pode alterar a expressão vascular de enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e contribuir para o aumento da produção de NO (Greer, Lyall et al. 1994).

A associação que encontramos entre o alelo A do polimorfismo S608L e pré-eclâmpsia pode ser explicada pelo possível aumento da expressão e atividade

tecidual da iNOS em indivíduos portadores deste alelo. Embora nenhum estudo anterior tenha documentado que indivíduos portadores deste alelo tenham níveis aumentados de iNOS, evidências experimentais mostram haver aumento da expressão e atividade da iNOS em modelos animais de hipertensão arterial. Por exemplo, Hong e colaboradores (2000), demonstraram que o uso de inibidores farmacológicos da iNOS em modelos animais de hipertensão arterial atenuou o desenvolvimento da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), além de não permitir o aumento da pressão arterial (Hong, Loh et al. 2000).

Dentre os mecanismos mais específicos que poderíamos sugerir para explicar a associação do alelo A do polimorfismo S608L e pré-eclâmpsia, poderíamos destacar que o aumento da atividade iNOS nos vasos gera quantidades significativas de NO que são capazes de reagir com o superóxido para formar peroxinitrito (ONOO^-) que por sua vez, reage com resíduos de tirosina das proteínas, com a formação de 3-nitrotirosina. Essa formação de ONOO^- pode ser favorecida, além da inflamação, pelas altas concentrações de NO, como consequência da expressão aumentada da iNOS (Sankaralingam, Arenas et al. 2006).

O peroxinitrito, um potente agente “nitrosante”, pode contribuir para vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica. De fato, isto tem sido demonstrado claramente em modelos animais de hipertensão arterial. Entretanto, esta hipótese não foi ainda demonstrada em modelos animais de pré-eclâmpsia.

Essas espécies reativas do oxigênio são capazes de ativar o fator nuclear κ B (NF- κ B) e outras vias de sinalização celular. De fato, o aumento de peroxidação lipídica em plasma de gestantes com PE tem sido relacionado com ativação desse fator nuclear e aumento da expressão de moléculas de adesão de células intercelulares (ICAM-1) (Takacs, Kauma et al. 2001).

O NF- κ B é um dos fatores transcricionais mais importantes na regulação da expressão da iNOS, sendo que o gene da iNOS possui em sua região promotora uma seqüência de pares de bases (TATA *box*) que é reconhecida como sítio de ligação para o NF- κ B (Kleinert, Pautz et al. 2004). Os mecanismos através dos quais o NF- κ B participa destes processos não estão completamente elucidados.

A busca por mecanismos celulares e vasculares que possam elucidar a fisiopatologia da preeclampsia e HAG, e possam auxiliar na predição de quais mulheres apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento dessas doenças são extremamente importantes, no sentido de aprimorar o acompanhamento médico, os cuidados com a gestante e o desenvolvimento de novos tratamentos.

De acordo com nossos resultados, poderíamos supor que o uso de inibidores seletivos da iNOS em pacientes com pré-eclâmpsia e portadoras do alelo A do polimorfismo S608L traga efeitos benéficos. Entretanto, devido às dificuldades de investigar, em mulheres grávidas, possíveis mecanismos envolvidos na gênese das doenças hipertensivas, principalmente da pré-eclâmpsia, diversos modelos animais de indução da hipertensão na gravidez têm sido propostos.

Dentre os modelos de pré-eclampsia em animais, a redução da pressão de perfusão uterina (RUPP) de maneira crônica tem se mostrado um modelo promissor (Podjarny, Losonczy et al. 2004). Alexander *et. al.* (Alexander, Kassab et al. 2001) demonstrou que ratas grávidas, mas não ratas virgens, que sofreram a cirurgia RUPP apresentaram aumentos na pressão arterial média de 20-25 mmHg e diminuições de aproximadamente 23% no fluxo renal e 40% na taxa de filtração glomerular, além de aumento na excreção de proteínas na urina e restrição de crescimento intrauterino dos fetos. Ademais, há vários trabalhos mostrando que o

modelo RUPP em ratas grávidas apresenta varias adaptações cardiovasculares que compartilham robustas similaridades com as adaptações sofridas por mulheres com pré-eclampsia. Por exemplo, Sholook *et. al.* (Sholook, Gilbert et al. 2007) observaram que a pressão arterial e a resistência periférica total estão aumentadas, enquanto o output cardíaco e os fluxos uterino e placentário estão diminuídos em ratas RUPP comparadas com as ratas sham. Sedeek *et. al.* (Sedeek, Gilbert et al. 2008) verificaram um aumento no estresse oxidativo (8-isoprostano, MDA e superóxido) em ratas RUPP e que o tempol, uma droga antioxidante, foram capaz de atenuar a hipertensão arterial desses animais. E ainda Alexander *et. al.* (Alexander, Rinewalt et al. 2001) mostraram que o modelo RUPP em ratas aumenta a expressão renal cortical e medular de preproendotelina e que a administração de um antagonista seletivo para o receptor ET_A atenua consideravelmente a hipertensão nesses animais.

Contudo, com base no exposto acima, é possível supor que alterações na atividade e expressão da iNOS e o aumento do estresse oxidativo possam ter um papel importante na patogênese da pré-eclâmpsia. De fato, poderíamos pensar em avaliar os efeitos da inibição da sintase induzida do óxido nítrico nas alterações vasculares encontradas no modelo experimental denominado RUPP em ratas grávidas, que mimetiza a pré-eclâmpsia em humanos.

Este trabalho apresentou algumas limitações tais como: existência de outros polimorfismos relevantes da iNOS que não foram considerados nesse estudo, porém somos o primeiro grupo a verificar uma possível associação de polimorfismos da iNOS e o risco de desenvolvimento de doenças hipertensivas gestacionais; número de pacientes limitado, porém muito maior que qualquer outro estudo envolvendo iNOS e pacientes com doenças hipertensivas gestacionais.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nossos achados são consistentes com a sugestão de que o polimorfismo S608L (*rs2297518*) do gene da iNOS influencie a susceptibilidade à pré-eclâmpsia, mas não à hipertensão gestacional. Particularmente, mulheres portadoras do alelo A deste polimorfismo têm risco aumentado de desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

Haplótipos da iNOS não parecem estar associados com doenças hipertensivas da gravidez.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- (1988). "Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy." Am J Obstet Gynecol **158**(1): 80-3.
- Alexander, B. T., S. E. Kassab, et al. (2001). "Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide." Hypertension **37**(4): 1191-5.
- Alexander, B. T., A. N. Rinewalt, et al. (2001). "Endothelin type a receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure." Hypertension **37**(2 Part 2): 485-9.
- Barcellos, L. F., P. P. Ramsay, et al. (2008). "Genetic variation in nitric oxide synthase 2A (NOS2A) and risk for multiple sclerosis." Genes Immun **9**(6): 493-500.
- Bhatnagar, S., J. Bhattacharjee, et al. (2007). "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism in pre-eclampsia: a pilot study in North India." Aust N Z J Obstet Gynaecol **47**(6): 477-82.
- Calabrese, V., C. Mancuso, et al. (2007). "Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity." Nat Rev Neurosci **8**(10): 766-75.
- Cardon, L. R., Bell, J. I. "Association study designs for complex diseases. ." Nat Rev Genet **2**: 91-9, 2001.
- Chartrain, N. A., D. A. Geller, et al. (1994). "Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene." J Biol Chem **269**(9): 6765-72.
- Chu, S. C., H. P. Wu, et al. (1995). "Structural diversity in the 5'-untranslated region of cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase mRNA." J Biol Chem **270**(18): 10625-30.
- Collins, F. S. and V. A. McKusick (2001). "Implications of the Human Genome Project for medical science." Jama **285**(5): 540-4.
- Crawford Dc, N. D. "Definition and clinical importance of haplotypes." Annu Rev Med. **2005**;56:303-20.

- Fu, L., Y. Zhao, et al. (2009). "Functional single nucleotide polymorphism-1026C/A of inducible nitric oxide synthase gene with increased YY1-binding affinity is associated with hypertension in a Chinese Han population." J Hypertens **27**(5): 991-1000.
- Greer, I. A., F. Lyall, et al. (1994). "Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction?" Obstet Gynecol **84**(6): 937-40.
- Hong, H. J., S. H. Loh, et al. (2000). "Suppression of the development of hypertension by the inhibitor of inducible nitric oxide synthase." Br J Pharmacol **131**(3): 631-7.
- Hyttén, F. (1985). "Blood volume changes in normal pregnancy." Clin Haematol **14**(3): 601-12.
- Kaaja, R. J. and I. A. Greer (2005). "Manifestations of chronic disease during pregnancy." Jama **294**(21): 2751-7.
- Kleinert, H., A. Pautz, et al. (2004). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 255-66.
- Kun, J. F., B. Mordmuller, et al. (1998). "Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria." Lancet **351**(9098): 265-6.
- Kuo, P. C. and R. A. Schroeder (1995). "The emerging multifaceted roles of nitric oxide." Ann Surg **221**(3): 220-35.
- Laurenti R, J. M., Gotlieb SLD. (2004;7(4):449-60.). "A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste."
- Lee, K. M., D. Kang, et al. (2009). "Nitric oxide synthase gene polymorphisms and prostate cancer risk." Carcinogenesis **30**(4): 621-5.
- Li, W., H. Liu, et al. "Identification of Yin Yang 1-interacting partners at -1026C/A in the human iNOS promoter." Arch Biochem Biophys **498**(2): 119-26.
- Longo, S. A., C. P. Dola, et al. (2003). "Preeclampsia and eclampsia revisited." South Med J **96**(9): 891-9.

- Lopez-Jaramillo, P., W. D. Arenas, et al. (2008). "The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia." Ther Adv Cardiovasc Dis **2**(4): 261-75.
- Loscalzo, J. and G. Welch (1995). "Nitric oxide and its role in the cardiovascular system." Prog Cardiovasc Dis **38**(2): 87-104.
- Lyall, F., J. N. Bulmer, et al. (1999). "Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide." Am J Pathol **154**(4): 1105-14.
- MacGillivray, I., G. A. Rose, et al. (1969). "Blood pressure survey in pregnancy." Clin Sci **37**(2): 395-407.
- MacKay, A. P., C. J. Berg, et al. (2001). "Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia." Obstet Gynecol **97**(4): 533-8.
- Martin, M. C., A. Martinez, et al. (2007). "Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility." Immunogenetics **59**(11): 833-7.
- Maynard, S., F. H. Epstein, et al. (2008). "Preeclampsia and angiogenic imbalance." Annu Rev Med **59**: 61-78.
- Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." N Engl J Med **329**(27): 2002-12.
- Morris, B. J., A. Markus, et al. (2002). "Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes." J Mol Med **80**(2): 96-104.
- Motallebipour, M., A. Rada-Iglesias, et al. (2005). "The promoter of inducible nitric oxide synthase implicated in glaucoma based on genetic analysis and nuclear factor binding." Mol Vis **11**: 950-7.
- Napolitano, M., F. Miceli, et al. (2000). "Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas." J Clin Endocrinol Metab **85**(6): 2318-23.
- Noris, M., N. Perico, et al. (2005). "Mechanisms of disease: Pre-eclampsia." Nat Clin Pract Nephrol **1**(2): 98-114; quiz 120.

- Noris, M., M. Todeschini, et al. (2004). "L-arginine depletion in preeclampsia orients nitric oxide synthase toward oxidant species." Hypertension **43**(3): 614-22.
- Okawa, T., K. Asano, et al. (2004). "Expression of iNOS mRNA and inhibitory effect of NO on uterine contractile activity in rats are determined by local rather than systemic factors of pregnancy." J Pharmacol Sci **95**(3): 349-54.
- Palmer, R. M., D. D. Rees, et al. (1988). "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation." Biochem Biophys Res Commun **153**(3): 1251-6.
- Podjarny, E., G. Losonczy, et al. (2004). "Animal models of preeclampsia." Semin Nephrol **24**(6): 596-606.
- Pridjian, G. and J. B. Puschett (2002). "Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations." Obstet Gynecol Surv **57**(9): 598-618.
- Redman, C. W., G. P. Sacks, et al. (1999). "Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy." Am J Obstet Gynecol **180**(2 Pt 1): 499-506.
- Redman, C. W. and I. L. Sargent (2005). "Latest advances in understanding preeclampsia." Science **308**(5728): 1592-4.
- Roberts, J. M. and H. S. Gammill (2005). "Preeclampsia: recent insights." Hypertension **46**(6): 1243-9.
- Roberts, J. M., G. Pearson, et al. (2003). "Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy." Hypertension **41**(3): 437-45.
- Roberts, J. M., R. N. Taylor, et al. (1991). "Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia." Am J Hypertens **4**(8): 700-8.
- Rovinsky, J. J. and H. Jaffin (1965). "Cardiovascular Hemodynamics in Pregnancy. I. Blood and Plasma Volumes in Multiple Pregnancy." Am J Obstet Gynecol **93**: 1-15.
- Rutherford, S., M. P. Johnson, et al. (2001). "Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension." Hum Genet **109**(4): 408-15.

- Saftlas AF, O. D., Franks AL, Atrash HK, Pokras R. (1990;163(2):460-5.). "Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986." Am J Obstet Gynecol.
- Samadi, A. R., R. M. Mayberry, et al. (1996). "Maternal hypertension and associated pregnancy complications among African-American and other women in the United States." Obstet Gynecol **87**(4): 557-63.
- Sambrook J, R. D. M. C. (2001). "A Laboratory Manual." 3rd ed. New York: Cold spring Harbor
- Sandrim, V. C., A. C. Palei, et al. (2008). "Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia." Hypertension **52**(2): 402-7.
- Sankaralingam, S., I. A. Arenas, et al. (2006). "Preeclampsia: current understanding of the molecular basis of vascular dysfunction." Expert Rev Mol Med **8**(3): 1-20.
- Sedeek, M., J. S. Gilbert, et al. (2008). "Role of reactive oxygen species in hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats." Am J Hypertens **21**(10): 1152-6.
- Shen, J., R. T. Wang, et al. (2004). "A novel genetic polymorphism of inducible nitric oxide synthase is associated with an increased risk of gastric cancer." World J Gastroenterol **10**(22): 3278-83.
- Sholook, M. M., J. S. Gilbert, et al. (2007). "Systemic hemodynamic and regional blood flow changes in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(4): H2080-4.
- Sibai, B., G. Dekker, et al. (2005). "Pre-eclampsia." Lancet **365**(9461): 785-99.
- Steegers, E. A., P. von Dadelszen, et al. "Pre-eclampsia." Lancet **376**(9741): 631-44.
- Stephens, M. and P. Donnelly (2003). "A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data." Am J Hum Genet **73**(5): 1162-9.
- Stephens, M., N. J. Smith, et al. (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." Am J Hum Genet **68**(4): 978-89.

- Takacs, P., S. W. Kauma, et al. (2001). "Increased circulating lipid peroxides in severe preeclampsia activate NF-kappaB and upregulate ICAM-1 in vascular endothelial cells." Faseb J **15**(2): 279-81.
- Taylor, B. S., M. E. de Vera, et al. (1998). "Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene." J Biol Chem **273**(24): 15148-56.
- Vasconcelos MJA, A. M., Kahhale S, Peraçoli JC, Sass N, Ramos JG. (2002). "Hipertensão na Gravidez." Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia.
- Wang, S. S., S. Davis, et al. (2006). "Polymorphisms in oxidative stress genes and risk for non-Hodgkin lymphoma." Carcinogenesis **27**(9): 1828-34.
- Warpeha, K. M., W. Xu, et al. (1999). "Genotyping and functional analysis of a polymorphic (CCTTT)(n) repeat of NOS2A in diabetic retinopathy." Faseb J **13**(13): 1825-32.
- Xu, J., A. Turner, et al. (2002). "Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?" Hum Genet **111**(6): 573-4.
- Zhang, J., S. Meikle, et al. (2003). "Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States." Hypertens Pregnancy **22**(2): 203-12.
- Zintzaras, E. and J. Lau (2008). "Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches." J Clin Epidemiol **61**(7): 634-45.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ESTUDO

Projeto: “Farmacogenética do tratamento anti-hipertensivo de pacientes com pré-eclâmpsia: relevância do haplótipo da eNOS”

Responsáveis:

- Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP) – CREMESP 84.966
- Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli – CREMESP 91.680
- Valéria Cristina Sandrim

Você está sendo convidada a participar de um estudo cujos detalhes são:

1) Este projeto pretende basicamente estudar se algumas variações comuns de alguns dos seus genes (que transmitem características hereditárias) podem contribuir no aumento da sua pressão sanguínea durante sua gravidez. Além disso, pretendemos estudar como estas variações podem modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo e presentes no seu sangue. Isto poderá nos auxiliar no entendimento das alterações cardiovasculares que acontecem durante a gravidez e na obtenção de marcadores genéticos de susceptibilidade à pressão sanguínea elevada durante a gestação.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, no máximo, 30 mL do seu sangue, coletados por punção venosa utilizando técnica adequada. Este volume de sangue é cerca de 15 (quinze) vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todos os estudos bioquímicos e genéticos mencionados acima. Uma segunda coleta (10 mL de sangue venoso) será realizada caso o seu médico prescreva para o tratamento da pressão alta o medicamento α -metildopa. Com isto, encerra-se a sua participação neste estudo.

3) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso haja gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.

4) Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito à indenização.

5) **NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTA PESQUISA.**

6) Indiretamente, acreditamos que este estudo trará como benefício um entendimento da fisiopatologia da pré-eclâmpsia, bem como na obtenção de

marcadores genéticos de susceptibilidade a pré-eclâmpsia e de resposta à α -metildopa.

7) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

8) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

9) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetida. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (telefone 0xx16 3602-3163), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), ao Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli (telefone 0xx16 36022588), do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) ou à Doutoranda Valéria Cristina Sandrim (telefone 0xx16 36262851, 0xx16 36023329) do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

Eu, _____, abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui devidamente informada em detalhes pelo pesquisador responsável no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRÁVIDAS CONTROLE

Projeto: “Farmacogenética do tratamento anti-hipertensivo de pacientes com pré-eclâmpsia: relevância do haplótipo da eNOS”

Responsáveis:

- Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP) – CREMESP 84.966
- Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli – CREMESP 91.680
- Valéria Cristina Sandrim

Você está sendo convidada a participar deste estudo COMO UMA VOLUNTÁRIA APRESENTANDO GESTAÇÃO NORMAL. Sua participação visa oferecer dados CONTROLES.

Você está sendo convidada a participar deste estudo cujos detalhes são:

1) Este projeto pretende basicamente estudar se algumas variações comuns de alguns dos seus genes (que transmitem características hereditárias) podem contribuir em manter sua pressão sanguínea em níveis normais durante sua gravidez. Além disso, pretendemos estudar como estas variações podem modificar as quantidades de algumas substâncias produzidas pelo seu organismo e presentes no seu sangue. Isto poderá nos auxiliar no entendimento das alterações cardiovasculares que acontecem durante a gravidez e na obtenção de marcadores genéticos de susceptibilidade à pressão sanguínea elevada durante a gestação.

2) Sua participação neste estudo será:

Serão retirados, no máximo, 30 mL do seu sangue, coletados por punção venosa utilizando técnica adequada. Este volume de sangue é cerca de 15 (quinze) vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar todos os estudos bioquímicos e genéticos mencionados acima.

3) Você terá direito a ressarcimento financeiro caso haja gastos gerados exclusivamente pela sua participação como voluntário desta pesquisa.

4) Caso haja dano comprovadamente decorrente da pesquisa você terá direito à indenização.

5) **NÓS NÃO PODEMOS E NÃO GARANTIREMOS QUE VOCÊ RECEBERÁ QUALQUER BENEFÍCIO DIRETO DESTA PESQUISA.**

6) Indiretamente, acreditamos que este estudo trará como benefício um entendimento da fisiopatologia da pré-eclâmpsia, bem como na obtenção de

marcadores genéticos de susceptibilidade a pré-eclâmpsia e de resposta à α -metildopa.

7) Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos voluntários nela envolvidos.

8) Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo para você.

9) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetida. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (telefone 0xx16 3602-3163), do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), ao Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli (telefone 0xx16 3602-2588), do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) ou à Doutoranda Valéria Cristina Sandrim (telefone 0xx16 36262851, 0xx16 36023329) do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

Eu, _____, abaixo assinado, declaro que em ____/____/____ fui devidamente informada em detalhes pelo pesquisador responsável no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como à indenização quanto por danos decorrentes da pesquisa. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Assinatura do voluntário

Assinatura do investigador/testemunha

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)