

SISBI/UFU



1000202348

*Marcadores Moleculares Associados à
Pré-Eclâmpsia.*

Elisângela Rosa da Silva

*Uberlândia-MG
Maio/2001*

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

MON
618.3-06:616.8-007.24
C586m
TES/4EM

*Marcadores Moleculares Associados à
Pré-Eclâmpsia.*

Elisângela Rosa da Silva

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia como
parte das exigências para a obtenção do
Título de Mestre em Genética e Bioquímica,
área de Concentração Genética.

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

1-TÍTULO: Marcadores Moleculares Associados à Pré-Eclâmpsia.

2-ALUNA: Elisângela Rosa da Silva

3-PROFESSOR ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

4-DATA: 21/05/2001

5-BANCA EXAMINADORA:

Titular: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Titular: Dr. Renato Enrique Sologuren Achá

Titular: Dra. Ana Maria Bonetti

Aos meus pais, Sebastião e Maria de Lourdes, por terem me proporcionado o exemplo e as condições para que eu pudesse concluir mais uma etapa de meus estudos e as minhas irmãs, Cristiane e Rosangela pela amizade e carinho que sempre demonstraram.

Ao meu amigo, companheiro e esposo, Ronaldo, pela paciência, compreensão, carinho e incentivo que me tornaram mais segura para concluir este trabalho e me fizeram acreditar que mesmo com poucos recursos é possível realizar um trabalho de pesquisa sério.

À enfermeira Maria do Carmo, pela boa vontade e disposição que sempre demonstrou ao coletar as amostras para que este trabalho pudesse ser realizado e a todas as pacientes que concordaram em participar deste estudo.

Agradecimentos

O meu muito obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho por ter acreditado na minha força de vontade em trabalhar com Genética Molecular e conceder-me a oportunidade de concluir mais um trabalho nesta área.

À Prof.^a Ana Maria Bonetti pela contribuição dada ao longo da minha vida acadêmica e por ter aceitado o convite para participar da minha banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Renato Sologuren pela coorientação e exemplo de doação à profissão, que hoje é rara na maioria dos profissionais da saúde.

Ao Prof. Heyder Silva de Diniz pela contribuição essencial na análise e interpretação estatística dos dados obtidos.

À colega de laboratório e amiga Renata Ríspoli Gatti pela contribuição ao longo de todo o período do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas e amigos de bancada que tornaram o desenvolver deste trabalho numa lição, sim, uma lição de que o trabalho em grupo é mais produtivo e, quando feito entre pessoas às quais podem-se chamar de AMIGOS, ele só produz bons resultados. Muito obrigada.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Abreviações.....	XII
Introdução Geral.....	1-19
-Hipertensão e pré-eclâmpsia.....	1-3
-Epidemiologia da pré-eclâmpsia.....	4-5
-Diagnóstico da pré-eclâmpsia:.....	5
-Diagnóstico clínico da pré-eclâmpsia.....	6
-Diagnóstico clínico laboratorial da pré-eclâmpsia.....	6-7
-Genética da pré-eclâmpsia.....	7-8
-O sistema renina-angiotensina-aldosterona.(SRAA).....	8-10
-A variante M235T do angiotensinogênio.....	10-11
-O gene do receptor I de angiotensina II.....	11-12
-O gene da enzima conversora de angiotensina I.....	13-14
-O sistema de coagulação sangüínea.....	14-15
-O gene do fator V de Leiden.....	15-16
-O Gene da protrombina.....	16-18
-PCR (Polymerase Chain Reaction).....	18-19
-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-Stranded Conformation Polymorphism)....	19
 Referências Bibliográficas.....	 20-34
 Capítulo I: Marcadores Moleculares Associados à Pré-Eclâmpsia.....	 35
Abstract.....	36-37
Resumo.....	38-39
<u>1-Introdução</u>.....	40-42
<u>2-Objetivos</u>	43
<u>3-Pacientes e Métodos</u>	44-51
3.1-Material biológico.....	44
3.2-Extração de DNA.....	44-45

3.3-PCR para genotipagem do gene do angiotensinogênio.....	45-46
3.4-PCR para genotipagem do gene da enzima conversora da angiotensina II.....	46-47
3.5-PCR para genotipagem do gene do fator V de Leiden.....	47-48
3.6-PCR para genotipagem do gene do receptor I de angiotensina II.....	48-49
3.7-PCR para genotipagem do gene da protrombina.....	49-50
3.8-LIS-SSCP para genotipagem do AGT, FVL e Prot.....	50-51
3.9-Análises estatísticas.....	51
5-Resultados e Discussão.....	52-67
6-Conclusão.....	68
7-Referências Bibliográficas.....	69-73
Anexo I.....	74
Anexo II.....	75

Lista de Tabelas:

- Tabela-1:** Diagnóstico pré-clínico.....6
- Tabela-2:** Frequências gênicas e alélicas dos genes do AGT, ECA, AT1 e do FVL nos grupos de pacientes DHEG e Controle..... 61
- Tabela-3:** Frequências genóticas e número de pacientes e controles encontrados para os genes do FVL, ECA e AT1 associados aos genótipos do AGT..... 62
- Tabela-4:** Médias obtidas para fatores de risco na pré-eclâmpsia associadas aos genótipos específicos de quatro polimorfismos gênicos do Fator V de Leiden, Angiotensinogênio, Enzima Conversora da Angiotensina e Receptor 1 da Angiotensina II..... 63
- Tabela-5:** Estimativas de máxima verossimilhança e teste de hipótese para a nulidade do parâmetro, para os genes AGT, ECA, AT1 e FVL, considerando os efeitos aditivos (β_1) e de dominância (β_2)..... 64
- Tabela-6:** Estimativas de máxima verossimilhança e teste de hipótese para a nulidade do parâmetro, para o gene AGT, considerando apenas o efeito aditivo do mesmo..... 65
- Tabela-7:** Análise de correlações canônicas (CR) para os fatores de risco genéticos e não genéticos quanto à ocorrência da pré-eclâmpsia..... 66
- Tabela-8:** Média dos fatores de risco genéticos e não genéticos envolvidos na predisposição à pré-eclâmpsia nos grupos de pacientes e controle..... 67

Lista de Figuras

Figura-1:	Espectro clínico da DHEG.....	7
Figura-2	Sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	9
Figura-3:	Produto amplificado do gene AGT em gel de agarose 2%... 52	
Figura-4:	Restrição enzimática do produto amplificado do gene do AGT com a enzima <i>Tth</i> III 1.....	53
Figura-5:	LIS-SSCP do fragmento do gene do AGT.....	53
Figura-6:	Genótipos do polimorfismo I/D da ECA.....	54
Figura-7:	Fragmento de 800pb corresponde ao gene do AT1.....	55
Figura-8:	Restrição enzimática do fragmento do gene AT1 com a enzima <i>Dde</i>	55
Figura-9:	Amplificação do fragmento de 223 pb do gene FVL.....	56
Figura-10:	Restrição enzimática do fragmento de 223pb do gene do FVL com a enzima <i>Mnl</i> I.....	57
Figura-11:	LIS-SSCP do fragmento do gene FVL.....	57
Figura-12:	Amplificação e restrição enzimática do fragmento de 345pb do gene da Protrombina	58
Figura-13:	LIS-SSCP do fragmento do gene da protrombina.....	59

Lista de Abreviações

AGT	angiotensinogênio
AT1	receptor I da angiotensina II
C	controle
°C	graus Celsius
ECA	enzima conversora de angiotensina I
DNA	ácido desoxirribonucléico
dATP	5'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	5'desoxicitosina trifosfato
dGTP	5'desoxiguanosina trifosfato
dTTP	5'desoxitimina trifosfato
dNTP	desoxirribonucleotídeo(s) trifosfato
Ed	edema
FVL	fator V de Leiden
Id	idade
M	molar
mA	miliamper
mL	mililitro
mM	milimolar
mg	miligrama
nG	nº de gestações
µL	microlitro
PASd	pressão sangüínea diastólica
PASs.	pressão sangüínea sistólica
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	pré-eclâmpsia
pM	pico mol

PROT	protrombina
SRAA	sistema renina-angiotensina aldosterona
SSCP	conformação polimórfica de fita simples em baixa concentração iônica
U	unidade

Introdução Geral:

Hipertensão e pré-eclâmpsia:

A hipertensão essencial é a principal causa de morbidade e mortalidade cardiovascular humana, com uma taxa de prevalência de 25% a 30% na população adulta caucasiana dos EUA (JOINT NATIONAL COMMITTEE, 1985). Nas grávidas, são descritas cifras variando desde 1,6% a 22,6% (ANDERSCH *et al.*, 1984). Na clínica obstétrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a hipertensão associada à gravidez foi a patologia mais freqüente e representou 32,2% de todos os casos de internação de gestantes entre os anos de 1981 a 1984 (ZUGAIB E KALHALI, 1985) e 27,6% entre 1985 a 1990 (CARRARA *et al.*, 1991).

Classificada como uma doença humana comum, acredita-se que ela seja o resultado da interação de múltiplos determinantes genéticos e ambientais. Estudos de grandes populações, de gêmeos e de irmãos adotivos forneceram evidências de um forte componente genético envolvido na regulação da pressão sangüínea (WARD, 1990), sugerindo que determinantes moleculares contribuem para a patogênese da hipertensão (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992).

A gravidez promove alterações no sistema cardiovascular e renal materno. Tais alterações incluem o aumento do volume sangüíneo, freqüência cardíaca, volume sistólico, débito cardíaco e queda da resistência vascular sistêmica e da pressão arterial (BURWELL *et al.*, 1938; GLAVIANO, 1963; KERR *et al.*, 1964; KERR, 1965 e 1968; ELKAYAN & GLEICHER, 1982) podendo, também, apresentar alterações nos volumes pulmonares e na ventilação.

A paciente grávida, portadora de função sistólica cardíaca normal, acomoda estas modificações sem dificuldades. Contudo, na presença de patologia cardíaca, hipertensão arterial significativa, sua gestação pode ser extremamente perigosa, resultando em descompensação e óbito (STEINBERG & FARINE, 1985; ANDRADE, 1990). O sistema renina-angiotensina-aldosterona, regulador principal do volume dos fluídos

corpóreos, também está aumentado (AUGUST AND SEALEY, 1990). O estrógeno estimula a transcrição hepática do gene do angiotensinogênio (LYNCH & PEACH, 1991), sendo que 10% do angiotensinogênio circulante ocorre como um complexo de alto peso molecular (TEWKSBURY, 1990).

Em contraste, mulheres com pré-eclâmpsia ou doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG), cuja etiologia ainda é desconhecida, têm a resistência vascular aumentada e não desenvolvem a hipervolemia fisiológica da gravidez. A atividade da renina plasmática é menor do que a esperada e a proporção do angiotensinogênio de alto peso molecular pode estar aumentada (TEWKSBURY & DERT, 1982).

A pré-eclâmpsia é, sob diferentes modos, conhecida como hipertensão gestacional proteinúrica (DAVEY e MACGILLIVRAY, 1988). Assim definida, pré-eclâmpsia, provavelmente, identifica um número maior de doenças homogêneas relacionadas. A alta proporção de pacientes assim definidas têm endoteliose glomerular, a única característica histopatológica da condição (FISHER *et al.*, 1981). Embora os próprios cuidados obstétricos tenham feito da eclâmpsia um evento relativamente raro no mundo ocidental, a pré-eclâmpsia ocorre em 2 a 4% de todas as gravidezes nos Estados Unidos e no Reino Unido. Muitos casos ocorrem na primeira gravidez.

HUMPHRIES (1960) apresentou um estudo sistemático da toxemia hipertensiva da gravidez em filhas de mães internadas no John Hopkins Hospital. A toxemia ocorreu em 28% das filhas de mulheres que tiveram toxemia na gravidez

Esta desordem, única da gravidez, é uma síndrome clínica que afeta ambos, mãe e feto. Há indícios de que a pré-eclâmpsia desenvolva-se como conseqüência de alterações do sistema vascular que fornece sangue para a placenta (ROBERTSON *et al.*, 1976). Esta alteração na circulação da placenta, provavelmente, ocorre no início do 2º trimestre, quando as manifestações da doença ainda não são aparentes na gestante; portanto elas precedem e, provavelmente, causam as desordens multissistêmicas maternas (FOX, 1988; PIJNENBORG, 1990; ZHOU *et al.*, 1993).

Como mencionado, a pressão sangüínea na pré-eclâmpsia é caracteristicamente lábil. Respostas pressórias a vários peptídeos

(norepinefrina e angiotensina) são intensificadas (LINDHEIMER *et al.*,1992). A hipertensão da pré-eclâmpsia normaliza-se após o parto, usualmente nos primeiros dias, mas em casos severos esta normalização poderá se estender de 2 a 4 semanas (FERRAZZANI *et al.*, 1994). Os mecanismos precisos da hipertensão na pré-eclâmpsia são obscuros.

Durante a gravidez normal, o sistema renina-angiotensina (SRA) é estimulado, comumente em resposta à vasodilatação e queda de pressão sangüínea (AUGUST *et al.*,1990). Em contraste, em mulheres com pré-eclâmpsia, a atividade da renina plasmática, a concentração de aldosterona plasmática, a excreção de aldosterona na urina e os níveis de angiotensina II são suprimidos, embora, freqüentemente, não aos níveis anteriores à gravidez (AUGUST *et al.*,1990). Existem indícios de que o SRA é estimulado precocemente na gravidez em mulheres que irão desenvolver pré-eclâmpsia e que o desenvolvimento de vasoconstrição e hipertensão inibem a secreção da renina. Como os níveis de renina diminuem, a sensibilidade à angiotensina II aumenta, freqüentemente bem antes dos sinais clínicos da pré-eclâmpsia.(GANT *et al.*,1973). Esta perda da refratariedade normal da angiotensina II está sendo bem utilizada como teste de rastreamento para identificar grávidas, no 2º trimestre de gestação, que tenham risco de desenvolver pré-eclâmpsia. Vários laboratórios têm pesquisado o aumento da densidade dos receptores de angiotensina II nas plaquetas em mulheres com pré-eclâmpsia em relação às medidas em grávidas normotensas; um fenômeno que pode ser uma consequência da "up regulation" dos receptores devido à queda dos níveis de angiotensina II na circulação (BAKER *et al.*,1991; Baker *et al.*,1992; PAWLAK *et al.*, 1992; GRAVES *et al.*, 1992).

As mais comuns e bem conhecidas características clínicas da pré-eclâmpsia são: hipertensão, proteinúria e edema. Outras manifestações incluem desordens da coagulação, particularmente, trombocitopenia e disfunções do fígado.

A pré-eclâmpsia precoce (menos de 20 semanas) tem sido descrita em mulheres com doença trofoblástica e é, raramente, acompanhada de hipertensão crônica e ou doença renal.

Epidemiologia da pré-eclâmpsia:

A pré-eclâmpsia é mais comum em primigestas, a incidência nestas mulheres é de aproximadamente de 2 a 10% em diferentes populações (CHESLEY, 1978; MOUTQIN *et al.*, 1985; SAFTLAS *et al.*, 1990). Fatores de risco adicionais à primeira gestação incluem história familiar positiva, gestação múltipla, presença conhecida de hipertensão crônica, doença renal ou diabetes, doença hidatiforme, extremos de idade reprodutiva e pré-eclâmpsia no 2º ou 3º trimestre em gravidez prévia.

Uma recente investigação de mais de 4000 mulheres primigestas que participaram de uma triagem clínica, também, demonstrou que o aumento do índice de massa corpórea foi um fator de risco para a pré-eclâmpsia (SIBAI *et al.*, 1997).

Embora a pré-eclâmpsia seja usualmente uma doença da 1ª gravidez, o risco de recorrência é alto na 2ª gravidez comparado à mulheres que tenham tido uma gravidez normal. Estudos feitos há mais de 30 anos, na Escócia, identificaram um risco de pré-eclâmpsia recorrente de 3,4% na segunda gravidez de mulheres que tiveram pré-eclâmpsia na primeira gravidez (MACGILLIVRAY I., 1958).

O risco de hipertensão recorrente, sem proteinúria, foi mais alto, aproximadamente 25%. Investigações mais recentes sugerem que, se a pré-eclâmpsia ocorrer precocemente na primeira gravidez (no segundo trimestre) o risco de recorrência pode ser maior do que 60% (SIBAI *et al.*, 1991).

Interessantemente, se há mudança de paternidade o risco de pré-eclâmpsia em multigestas é quase tão alto quanto na primeira gravidez. (TRUPIN *et al.*, 1996). Os genes do pai codificam o desenvolvimento placentário precoce e os antígenos paternos introduzidos iniciam respostas imunes que mantêm o crescimento placentário. A hipertensão induzida pela gravidez pode representar uma reação materna contra locais antigênicos situados na placenta que são imunologicamente incompatíveis com os tecidos paternos (ROBILLARD *et al.*, 1994).

O prognóstico de mulheres com pré-eclâmpsia é um assunto em debate há vários anos. CHESLEY *et al.* (1991) acompanharam mulheres

com diagnóstico de eclâmpsia na primeira gravidez e demonstraram que a prevalência de hipertensão tardia não difere em idade e raça comparada à prevalência do grupo controle.

Diagnóstico da pré-eclâmpsia:

As características clássicas da pré-eclâmpsia são hipertensão, com proteinúria, edema ou ambos. A doença ocorre após 20 semanas, mais freqüentemente em primigestas e o diagnóstico é mais facilmente feito quando as mulheres tenham documentado uma pressão normal no início da gravidez.

Segundo a Comissão de Terminologia do Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (HUGHES,1972) os critérios para o diagnóstico de hipertensão em mulher grávida são:

- 1- elevação de 30 mmHg ou mais nos níveis habituais de pressão arterial sistólica;
- 2- elevação de 15 mmHg ou mais dos níveis de pressão arterial diastólica (Korotkoff)

Se a princípio a pressão sangüínea é desconhecida, leituras de 140/90 mmHg após a vigésima semana de gestação são consideradas suficientemente elevadas para satisfazer o critério da pressão sangüínea para o diagnóstico da pré-eclâmpsia.

A hipertensão associada à pré-eclâmpsia pode ser, largamente, variável de momento a momento e em duas medidas de pressão sangüínea sucessivamente observadas, pode-se obter diferenças na leitura (EKHOLM *et al.*,1997). Essas cifras devem ser confirmadas decorrido um período de, pelo menos, seis horas, com a paciente em repouso.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA PRÉ-ECLÂMPSIA:

De longa data os pesquisadores procuram alterações que possam identificar as gestantes propensas a desenvolver a DHEG. Muitos testes foram desenvolvidos (Tabela-1), entretanto nenhum mostrou ser de fácil realização, pouco dispendioso, não invasivo e com alta especificidade (KALHALE & ZUGAIB, 1995).

Tabela-1: Diagnóstico pré-clínico

Infusão de angiotensina //	Concentração de ferro sérico
Teste pressório de Gant	Antitrombina
Teste de pressão arterial média	Fator VII da coagulação
Dopplerfluxometria	Beta-tromboglobulina
Fibronectinas	Alfa-fetoproteína
Cálcio plaquetário	Peptídeos natriuréticos atriais
Calciúria	Endoxina
Teste isométrico	Receptores plaquetários de AII
Volume plasmático	Excreção urinária de metabólitos da prostaciclina
bHCG	

Diagnóstico clínico-laboratorial:

A DHEG caracteriza-se pela tríade sintomática: edema, hipertensão e proteinúria. O aparecimento dessas manifestações, principalmente em primigestas, ou o agravamento de quadro hipertensivo, após a 20ª semana, sugerem o diagnóstico. Progressivamente, com a evolução e a intensificação do quadro, um largo espectro de situações pode surgir, assim como os

componentes da síndrome podem se expressar de diferentes maneiras, como na figura-1 (Kalhale & Zugaib, 1995).

Espectro clínico da DHEG

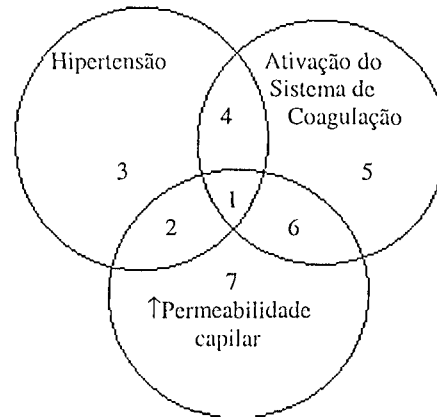


Figura:1- Espectro clínico da DHEG com

1-Síndrome completa em sua forma grave com hipertensão, edema, proteinúria e ativação do sistema da coagulação.

2-Hipertensão, edema e proteinúria, sem evidência de envolvimento hematológico

3-Hipertensão como síndrome predominante

4-Hipertensão, plaquetopenia, coagulopatia, porém, com pouco edema e proteinúria

5-Predominam a plaquetopenia e a fibrinólise

6-Síndrome completa com manifestação hipertensiva não relevante

7-Predominância de edema e proteinúria.

GENÉTICA DA PRÉ-ECLÂMPSIA:

Indícios para uma base familiar da pré-eclâmpsia, que foram estudados por Chesley (CHESLEY *et al.*, 1968; CHESLEY *et al.*, 1986) têm sido, recentemente, revistos por COOPER *et al* (1992). O grupo de Cooper sugere que a pré-eclâmpsia pode ser uma desordem herdada via um gene recessivo com a possibilidade de uma interação genótipo-genótipo entre a mãe e o feto (similar às circunstâncias que levam à doença hemolítica do

recém nascido no contexto do sistema de grupo sanguíneo RH) ou um gene materno dominante com 50% de penetrância.

Indícios adicionais para o envolvimento genético do feto é que a pré-eclâmpsia é mais comum em gestações molares (moles têm dois grupos de cromossomos paternos) e em gravidezes complicadas por trissomia do 13 (TUOHY *et al.*, 1992).

Mais recentemente, um polimorfismo do gene do angiotensinogênio, que está ligado à susceptibilidade à hipertensão essencial, tem sido associado com a pré-eclâmpsia em algumas, mas não em todas as populações (WARD *et al.*, 1993, ARNGRIMSSON *et al.*, 1993).

No presente, as investigações a respeito das bases genéticas da pré-eclâmpsia estão nos estágios iniciais. Recentemente, HARRISON *et al.* (1997) pesquisaram um dos primeiros genomas completos de ligação para os genes de susceptibilidade à pré-eclâmpsia, o que sugere que possa existir um locus candidato no braço longo do cromossomo 4.

O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA:

A renina é uma glicoproteína ácida, com cerca de 42000 daltons de peso molecular, sintetizada pelas células justaglomerulares (células JP) do rim, a partir de um precursor, a prorenina ou grande renina, forma inativa circulante da mesma, a partir de estímulos pressóricos, iônicos, nervosos e hormonais.

São estímulos para a sua secreção: diminuição do volume intravascular e da pressão sanguínea, com menor estiramento da arteríola aferente; depleção de sal, com menor oferta de cloreto de sódio no nível de túbulo distal e mácula densa; alterações de decúbito, hemorragia e situações de estresse, onde haveria uma ativação através de receptores beta-adrenérgicos renais (KALHALE & ZUGAIB, 1995).

Uma vez liberada, a renina, uma glicoproteína ácida sintetizada nas células justaglomerulares dos rins, age sobre o angiotensinogênio liberando o decapeptídeo angiotensina I da extremidade N-terminal da molécula de angiotensinogênio. A angiotensina I é um prohormônio inativo que sob a

ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), uma glicoproteína encontrada principalmente no pulmão, se transformará, através da retirada de 2 aminoácidos de sua extremidade C-terminal, no octapeptídeo angiotensina II que é um potente hormônio vasoconstritor, multifuncional, primariamente envolvido na manutenção do tônus vascular e na reabsorção do sódio pelos rins (INOUE *et al.*, 1995) (Figura-2).

A aldosterona é o mais potente mineralocorticóide produzido pelo ser humano, sendo o principal regulador do líquido extracelular e do metabolismo do potássio, retendo sódio e água e excretando uma quantidade maior de potássio.

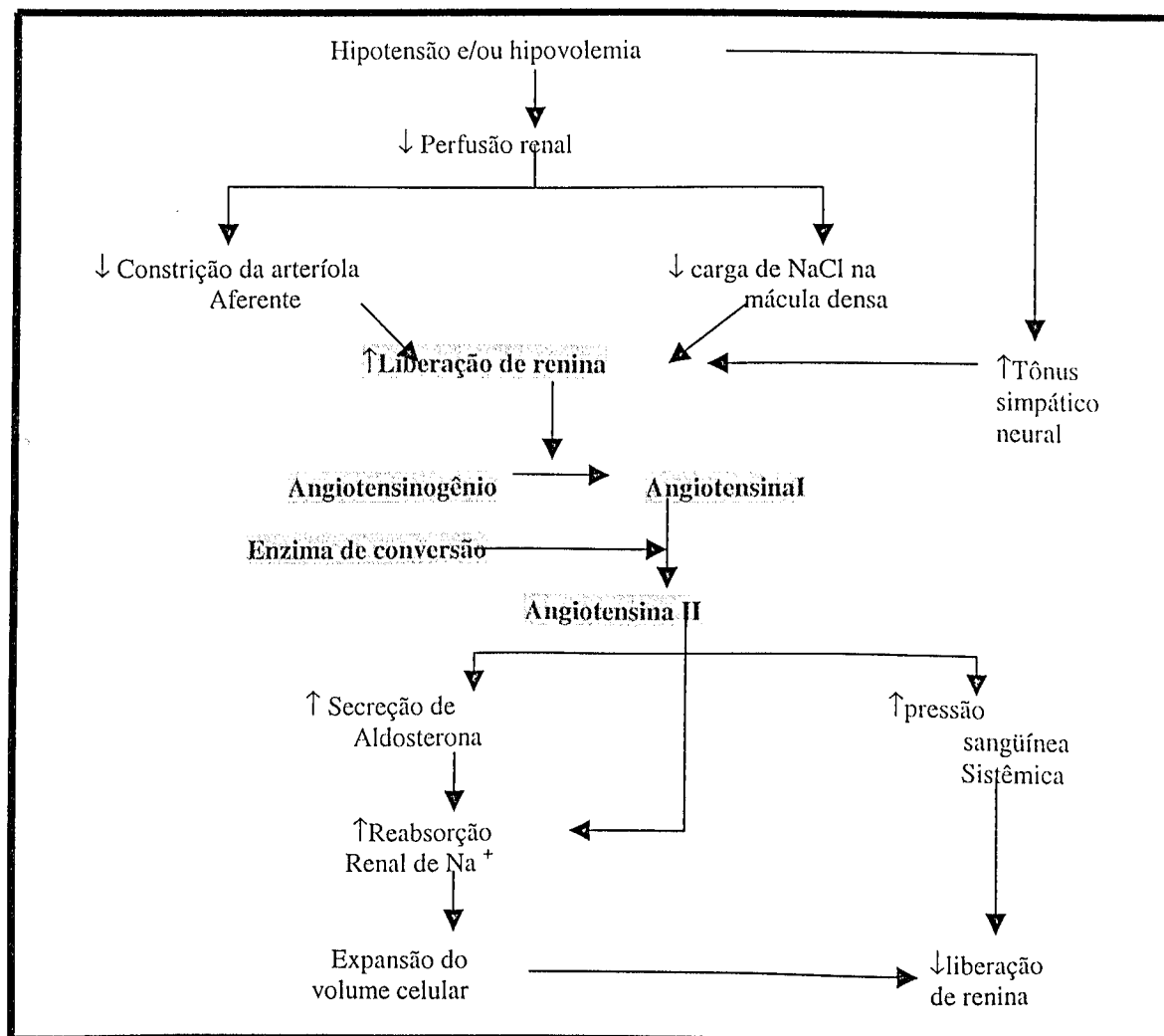


Figura 2: Sistema renina-angiotensina-aldosterona. - Adaptado de Aires *et al.*, 1991.

Na gravidez, há surpreendentes ajustes no SRAA. A primeira dessas mudanças é o surgimento de altas concentrações de prorenina na circulação, assim como o aumento da renina ativa. Tanto a renina, como seu substrato, as angiotensinas e a aldosterona, encontram-se aumentados na gestação. A dificuldade em se entender a secreção de renina durante a gestação é que ocorre uma alta secreção da substância ao mesmo tempo em que existe uma expansão do volume extracelular, um fluxo plasmático renal e uma taxa de filtração glomerular aumentados, com um oferecimento presumivelmente maior de sódio à mácula densa. Estudos têm mostrado que este aumento é mediado por meio de um aumento reconhecido na biossíntese renal e uteroplacentária de PGI₂ (FERRIS *et al.*, 1988; LINDHEIMER E KARTZ, 1985; PEDERSEN *et al.*, 1982 apud KALHALE & ZUGAIB, 1995).

Na pré-eclâmpsia, sabe-se que a atividade do SRAA pode diferir com a gravidade da doença. Na hipertensão de início tardio e sem proteinúria, a atividade da renina plasmática e a angiotensina II estão aumentadas e relata-se uma relação direta entre a angiotensina II e a pressão sangüínea diastólica (AUGUST & SEALEY, 1990). A pré-eclâmpsia de início precoce e com proteinúria, entretanto, está associada com uma supressão do SRAA (CHESLEY, 1978 apud KALHALE & ZUGAIB, 1995).

Variante M235T do angiotensinogênio:

A pré-eclâmpsia exibe agregação familiar, mas geralmente não está relacionada como causa da hipertensão essencial. Uma significativa associação entre a DHEG e a variante T235 do angiotensinogênio tem sido relatada em caucasianos e japoneses (WARD *et al.*, 1993). Um estudo realizado em 1993 por ARNGRIMSSON *et al.*, (apud, INOUE *et al.*, 1995) em duas amostras independentes de pedigrees na Escócia e na Irlanda, respectivamente, demonstrou a influência do papel do angiotensinogênio na ligação genética entre um marcador multialélico do angiotensinogênio e pré-eclâmpsia I. A variante 235 possui treonina no lugar de metionina no resíduo

235 da proteína madura e é denominada de T235. Ela também ocorre com alta frequência na população japonesa, estando associada à hipertensão essencial (HATA *et al.*, 1994) e está presente em, aproximadamente, 19% dos indivíduos da população ocidental (KATSUYA *et al.*, 1995).

Indivíduos portadores do genótipo M235/M235 apresentam médias menores de nível de angiotensinogênio plasmático; heterozigotos M235/T235 têm níveis médios intermediários e os homozigotos T235/T235 possuem as médias maiores do nível de angiotensinogênio plasmático (HEGELE *et al.*, 1994). Como o angiotensinogênio plasmático é elevado nos estados estrogênicos, no qual algumas mulheres desenvolvem hipertensão, há suspeitas de um possível papel do angiotensinogênio na pré-eclâmpsia (WARD *et al.*, 1993).

Essas observações sustentam a interpretação de que o gene do angiotensinogênio, localizado do cromossomo 1q 42-43 (KATSUYA *et al.*, 1995), desempenha uma importante função na regulação da pressão sangüínea e que diferenças moleculares no gene podem contribuir para a patogênese de algumas formas de hipertensão, se essencial ou induzida pela gravidez. O angiotensinogênio, também chamado de substrato da renina, é uma glicoproteína (alfa-2-globulina) sintetizada e armazenada em pequenas quantidades no fígado sob controle positivo de estrógenos, hormônios glicocorticóides e tireoidianos e angiotensina II (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992).

Gene do receptor I de angiotensina II:

A angiotensina II é um importante efector que controla a pressão sangüínea e o volume do sistema cardiovascular. A sua importância é refletida pela eficácia dos inibidores de ECA no tratamento de hipertensão e na insuficiência cardíaca congestiva. A angiotensina II interage com dois subtipos de receptores de superfície celular, farmacologicamente diferentes, tipos I e II. Os receptores do tipo I parecem mediar os principais efeitos cardiovasculares da angiotensina II. Por expressão de clones, MURPHY *et*

al. (1991) isolaram o cDNA que codifica o receptor de tipo I. O modelo hidrofóbico deduzido da proteína sugere que ela forma um motivo na região 7- transmembrana com a superfamília dos receptores ligantes de proteína G. SASAKI *et al.* (1991) isolaram o gene bovino correspondente. TAKAYANAGI *et al.* (1992) clonaram e sequenciaram o cDNA que codifica este receptor em humanos e, por análise de Northern Blot, eles demonstraram sua expressão no fígado humano, pulmão, adrenal, e adenomas adrenocorticais, mas não em feocromocitomas. BERGSMA *et al.* (1992) e MAUZY *et al.* (1992) também clonaram e caracterizaram cDNAs do AGTR1. FURUTA *et al.* (1992) estudaram a seqüência genômica e demonstraram que a região codificadora está contida em um único exon. Por comparação de seqüências de DNA genômico e cDNA, GUO *et al.* (1994) demonstraram que a região do gene AGTR1 consiste de no mínimo 5 exons e estende-se em mais que 55 kb do DNA genômico. O tamanho dos exons varia de 59 a 2014 bp. Quatro dos exons codificam a seqüência da região 5' não traduzida. O início de múltiplos sítios de transcrição foram observados por experimentos com extensão por primer.

Variantes do gene AGTR1, cromossomo 3q21q25, podem afetar a pressão sangüínea em humanos. Com a clonagem do cDNA do receptor AT1 (TAKANAYANAGI, *et al.*, 1992) foi possível identificar um polimorfismo na região 3' não traduzível e correspondente a uma transversão A-C, na posição do nucleotídeo 1166 da seqüência do mRNA. Este polimorfismo mostrou uma freqüência significativa em 206 pacientes caucasianos hipertensos (BONNARDEAUX *et al.*, 1994). WANG *et al.* (1997) estudaram a variante 1166 A-C em pessoas hipertensas caucasianas e encontraram uma freqüência para o alelo C de 0,40 nos hipertensos e 0,29 em normotensos. O papel fisiológico do receptor AT1 sugere que o gene (AGT1R) receptor tipo I da angiotensina II possa interagir com o polimorfismo I/D da ECA, provocando o IAM (INÁCIO, 1999).

O Gene da Enzima Conversora da Angiotensina I

A ECA, um componente chave da cascata enzimática do sistema renina- angiotensina-aldosterona (SRAA) desempenha papel na patogênese da hipertensão (EHLERS *et al.*, 1989, apud, NAKAI *et al.*, 1994). O gene da ECA, com 21 kb e consistindo de 26 exons, foi originalmente clonado por SOUBRIER *et al* (SOUBRIER *et al.*, 1988, apud, NAKAI *et al.*, 1994). A ECA é uma ectoenzima dipeptidil carboxipeptidase de membrana, localizada no revestimento dos vasos sangüíneos de todo o corpo (ERDOS *et al.*, 1987).

CAMBIEN *et al.* (1988) demonstraram que aproximadamente 50% da variabilidade inter individual da concentração plasmática da ECA é determinada pelo efeito de um gene principal. CAMBIEN *et al* (1992) encontraram associação entre doença coronariana cardíaca e o polimorfismo de inserção/ deleção do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA).

A clonagem do gene da ECA revelou um polimorfismo inserção/ deleção de 287 pb no intron 16 (HUBERT *et al.*, 1991 and RIGAT *et al.*, 1990). O gene da ECA localiza-se no cromossomo 17q23 e é caracterizado pela presença (Inserção-I) ou ausência (Deleção - D), no intron 16, de 287 pares de base: resultando em três genótipos (DD e II homocigotos e ID heterocigoto) (RIGAT *et al*,1992). O genótipo DD está associado com o dobro do nível da atividade sérica da ECA em relação ao genótipo II e níveis intermediários nos heterocigotos (CAMBIEN *et. al.*,1994)

RIGAT *et al.* (1990) demonstraram que esse polimorfismo está fortemente associado com o nível de enzima na circulação. Esta enzima tem um papel chave na produção de angiotensina e no catabolismo da bradicinina, dois peptídeos envolvidos na modulação do tônus vascular e na proliferação das células musculares lisas.

TIRET *et al.*, 1992, também detectaram que sujeitos com o polimorfismo de deleção tinham maiores níveis de ECA no soro do que aqueles com o polimorfismo de inserção; concluiu assim que o principal efeito desse polimorfismo era refletido em diferentes níveis de ECA no soro

e que esse gene exercia uma função significativa na patogênese da hipertensão essencial.

Portanto, o sistema renina-angiotensina está fortemente implicado nos mecanismos responsáveis pela regulação da resistência vascular, homeostase do sal e balanço hídrico, aumento da pressão sangüínea e associado à patogênese de doenças cardiovasculares e hipertensivas.

O SISTEMA DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA:

Na gravidez, também, ocorrem algumas alterações da coagulação sangüínea. A gestação normal é considerada como um estado de hipercoagulabilidade (ALEXANDER *et al.*, 1956) existindo elevação do fibrinogênio e da protrombina, com aumento significativo de diversos fatores da coagulação e modificações tanto da via extrínseca como da intrínseca (WEINER, 1987).

Apesar de serem grandes as modificações na gestação normal, raros são os fenômenos patológicos observados nestas pacientes. O mesmo não ocorre na DHEG, na qual observa-se o rompimento do equilíbrio do mecanismo de coagulação. Ocorrem fenômenos tromboembólicos, fato já conhecido desde o século passado (1893) quando SCHMORL observava na necropsia de pacientes eclâmpicas, a presença de trombos disseminados na microcirculação, associados a focos de necrose.

A pré-eclâmpsia pode estar associada com anormalidades hemostáticas, especialmente trombose nas artérias espirais da placenta, embora qualquer vaso possa ser afetado (SHEPPARD *et al.*, 1976, apud, LINDOFF *et al.*, 1997).

Provavelmente, a formação e o crescimento de trombos é causado pela ativação local do sistema da coagulação, combinado com um distúrbio no balanço entre coagulação e reações fibrinolíticas, favorecendo a formação de coágulos. Acredita-se que os defeitos genéticos do sistema de coagulação possam desencadear doenças complexas, como o infarto do

miocárdio, derrames, pré-eclâmpsia, eclâmpsia, e diabetes (ROSENDAAL *et al.*, 1997).

GENE DO FATOR V DE LEIDEN:

Recentemente, a herança da resistência à ação anticoagulante da proteína C ativada (APC) foi encontrada como um fator envolvido na trombofilia (DAHLBÄCK *et al.*, 1993). A resistência à proteína C ativada é uma anormalidade hemostática que freqüentemente causa trombose e trata-se de uma herança, aparentemente autossômica dominante (DAHLBÄCK *et al.*, 1993; 1995a).

A proteína C é ativada pelo complexo trombina-trombomodulina, na sua forma ativada (APC), e cliva os fatores de coagulação Va e VIIIa, limitando a formação de coágulos sangüíneos (ESMON, 1993; SHEN *et al.*, 1994).

Uma mutação no gene fator V, localizado no cromossomo 1q 21-25 e contendo 25 exons com mais de 80 Kb, está sendo identificada como base molecular para muitos casos de resistência à proteína C ativada (BERTINA *et al.*, 1994). O fator V alternativo, conhecido como fator V de Leiden, tem uma mutação de guanina para adenina (G→A) no nucleotídeo 1691 que converte arginina (Arg) 506 para glutamina (Gln). A proteína C ativada cliva o fator V normal no sítio R 506 enquanto o fator V de Leiden, Q506R, é resistente à clivagem (GARCIA-GALA. *et al.*, 1997).

A associação entre a mutação do fator V Q506R e o risco de tromboembolismo venoso está claramente estabelecida (DAHLBÄCK, 1995b). Co-segregação de trombose com a mutação tem sido demonstrada em estudos de grandes famílias, nas quais heterozigotos e homozigotos para a mutação têm um aumento do risco de sofrer trombose de 5 a 10 vezes e de 50 a 80 vezes, respectivamente (ZÖLLER *et al.*, 1994; BEUFÉ *et al.*, 1995; ROSENDALL *et al.*, 1995).

HELLGREN *et al.* (1995) encontraram resistência à proteína C ativada em 59% das mulheres com história de morbidade tromboembólica durante

a gravidez, mas análises da mutação do gene do fator V não foram realizadas.

LINDOFF *et al.* (1997) demonstraram diferenças significantes nas taxas de proteína C ativada entre mulheres com história de pré-eclâmpsia e controles, com gravidez normal. Mulheres com a mutação hereditária do gene do fator V e prévia pré-eclâmpsia apresentaram as menores taxas da APC; e a presença da mutação tendia a um aumento do risco do desenvolvimento de pré-eclâmpsia de aproximadamente 2 a 3 vezes.

O marcado aumento do fator VIII durante a gravidez normal pode reduzir a eficácia da APC e contribuir para a condição de hipercoagulabilidade durante a gravidez. Esta supressão da resposta da APC foi, recentemente, demonstrada por BOKAREWA *et al* (1996) que encontraram um risco significativo para trombose em portadores da mutação do gene do fator V. Este achado de uma reduzida resposta da APC em mulheres com prévia pré-eclâmpsia pode expressar uma influência similar no desenvolvimento de pré-eclâmpsia.

A Variante G20210A da Protrombina:

POORT *et al.*(1996) descreveram um variação genética comum na região não traduzida 3' do gene da protrombina que está associada com elevados níveis de protrombina plasmática e um aumento no risco de trombose venosa , uma transição de G para A na posição 20210 (DEGEN e DAVIE,1987). Eles encontraram essa substituição de uma única base em 18% dos membros de famílias trombofílicas, 6% de pacientes consecutivos não selecionados com trombose venosa e 2% de controles saudáveis. ROSENDAAL *et al.* (1997) encontraram que a mutação estava associada ao aumento de 4 vezes no risco de infarto do miocárdio em mulheres, enquanto entre os homens, o risco aumentava 1,5 vezes (DOGGEN *et al.*, 1998). ROSENDAAL *et al.* (1998) apresentaram dados de 11 centros e 9 países, representando um total de 5527 indivíduos testados. Entre estes, 111 heterozigotos portadores da mutação 20210 A foram encontrados. A

estimativa de prevalência total foi de 2,0%. No sul da Europa, a prevalência foi de 3,0%, aproximadamente duas vezes mais alta do que a prevalência no norte de Europa (1.7%). A variante da protrombina parece ser muito rara em indivíduos descendentes de asiáticos e africanos.

Para discernir se o polimorfismo 20210G-A originou de uma única mutação ou de um evento mutacional recorrente, ZIVELIN *et al.* (1998) determinaram a frequência alélica de 4 dimorfismos contidos em 16 dos 21 kb do gene do fator II em 133 sujeitos caucasianos de origem judaica, austríaca e francesa, sem relação de parentesco, que tinham o fator II 20210 A (10 homozigotos e 123 heterozigotos) e 110 caucasianos controle.

FRANCO *et al.* (1999) encontraram uma frequência de 1% para o alelo 20210 em 400 membros de uma população controle saudável e 2,7% em 263 pacientes com doença aterosclerótica prematura.

O gene da protrombina é um gene candidato à trombose venosa. A protrombina é o precursor da trombina, uma serino protease, que é uma enzima chave nos processos de hemostase e trombose, exibindo atividades procoagulante, anti-coagulante e antifibrinolítica (JACKSON, 1994; BERTINA *et al.*, 1992; DANG *et al.*, 1995). A protrombina é codificada por um longo gene de 21 kb (DEGEN e DAVIE, 1987) localizado no cromossomo 11, posição 11p11-q12. O gene da protrombina é organizado em 14 *exons*, separados por 13 *introns* com a região 5' "upstream" não traduzida e uma região 3' (não traduzida) a qual pode exercer uma função regulatória na expressão do gene (ROYLE *et al.*, 1987).

A variação 20210 G→A do gene da protrombina é um fator de risco moderado para a trombose venosa. As observações de que o alelo 20210 A está associado com elevados níveis de trombina, de que portadores desse alelo têm, significativamente, maiores níveis de protrombina do que não portadores e de que os próprios níveis elevados de protrombina são, também, um fator de risco para a trombose, sugerem que o alelo A age por meio dos elevados níveis de protrombina.

O nível de protrombina pode ser considerado como um efector, sugerindo que outros fatores de risco além do alelo A possam ser responsáveis por altos

níveis de trombina. Como os elevados níveis de trombina estimulam a formação de trombos venosos ainda não está claro (POORT *et al*, 1996).

DE STEFANO *et al* (1999) descobriram que pacientes heterozigotos para o fator V de Leiden (1691 G-A) e para a protrombina 20210 G-A tinham um aumento do risco de trombose recorrente de 2,6 vezes em relação aos portadores do Fator V sozinho. Pacientes heterozigotos para o Fator V de Leiden tinham um risco recorrente para a trombose venosa similar ao dos pacientes que tinham qualquer outra mutação conhecida no Fator II ou no Fator V.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica usada para a amplificação de seqüências específicas de DNA através da extensão simultânea de pequenas moléculas de DNA de fita simples denominadas iniciadores ou *primers*. Este método foi desenvolvido por KARY MULLIS na década de 80, embora o princípio tenha sido descrito em detalhes na década seguinte por KHORANA e colaboradores (INNIS *et al.*, 1990). É um método *in vivo* que pode ser utilizado para identificar, com alta sensibilidade, doenças causadas por vírus e/ou bactérias, doenças genéticas em exames prenatais, sequenciamento, clonagem e outros (WILLIAMS, 1989).

A PCR utiliza-se do mesmo princípio *in vivo* das DNAs polimerases que são encarregadas da síntese da fita complementar de DNA no sentido 5' → 3', porém usam *primers* artificialmente produzidos que acabam por limitar o tamanho do fragmento a ser amplificado. A reação de PCR é constituída por ciclos e cada ciclo envolve 3 passos: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA é aquecida aproximadamente à 90-95 °C causando a sua desnaturação e tornando cada fita acessível aos *primers*. A temperatura é reduzida à, aproximadamente, 35-60°C o que faz as duas fitas se unirem novamente, mas pelo grande excesso de *primers* na mistura, em relação à quantidade de DNA, as fitas se unirão aos *primers*. Novamente a temperatura é elevada atingindo cerca de 72°C que é a temperatura ótima

para atividade da enzima Taq DNA polimerase que coordena a extensão dos *primers* a partir de sua porção terminal 3' em sentidos opostos utilizando 4 desoxirribonucleotídeos (dATP, dGTP, dCTP e dTTP). Vários ciclos são repetidos permitindo a amplificação de uma região particular do DNA (SAIKI *et al.*, 1989).

LIS-SSCP

O LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism) foi inicialmente descrito por ORITA *et al.* (1989). Esta técnica mostra ser simples e efetiva na detecção de pontos de mutação e demonstra vantagens em relação ao procedimento original onde se fazia o uso de formamida. As vantagens do LIS-SSCP se verificam na maior nitidez na visualização das bandas, maior estabilidade da conformação do DNA de fita simples (ssDNA) visto que a baixa concentração iônica impede a hibridação das fitas *sense* e *anti-sense* (MARUYA *et al.*, 1996).

A detecção de variantes na seqüência do DNA é importante para a identificação de doenças causadas por mutações em alguns genes. Uma vez que há uma grande porção de variações genéticas devido à seqüências diferentes de bases, é necessário o uso de técnicas que detectem mutações ou seqüências polimórficas (SHEFFIELD *et al.*, 1992)

Embora o SSCP seja utilizado em alta freqüência, os parâmetros que influenciam a sua eficiência não foram completamente avaliados. Diferentes dados relativos à sua eficiência tem sido observados abrangendo cerca de 35 a 100% (ORITA *et al.*, 1989; SAIKAI *et al.*, 1992; MICHAUD *et al.*, 1992).

Esta técnica é baseada na desnaturação da fita dupla de DNA e cada fita simples assume uma conformação específica, baseada na seqüência. A mobilidade eletroforética depende da seqüência, força iônica, posição da mutação e outros parâmetros de otimização (SHEFFIELD *et al.*, 1993; KIYAMA & FUJITA 1996; HOSHINO *et al.*, 1992).

Referências Bibliográficas:

AIRES, M. : **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, p 517, 1994.

ALEXANDER, B., MEYER, L., KENNY, J., *et al.* Blood coagulation in pregnancy: proconverting and prothrombin, and the hypercoagulable state. **N. Engl. J. Med.** 254: 358-363, 1956.

ANDERSCH, B., AVERSON, A., HANSON, L. Characteristics of hypertension in pregnancy. A retrospective study of 261 consecutive case. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.** 118:33-38 (Suppl.), 1984.

ANDRADE, J. Análise do risco cardiológico na gravidez. **Bol. Grup. Est. Card. Grav.**, v. 5, p. 2-3, 1990.

ARNGRIMSSON R, PURANDARE S, CONNOR M, *et al.* Angiotensinogen: a candidate gene involved in preeclampsia. **Nature Genetics.** 4:114-115, 1993.

AUGUST, P. & SEALEY, J. E. The renin- angiotensin system in normal and hypertensive pregnancy and in ovarian function In: Laragh J. H., Bremmer B. M., eds. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management**. New York: Raven Press, Publishers: 1990, 1761-1778.

AUGUST P, LENZ T, ALES KL, DRUZIN ML, EDERSHEIM TG, HUTSON JM, MULLER FB, Laragh JH, Sealey JE. Longitudinal study of the renin-angiotensin - aldosterone system in hypertensive pregnant women: Deviations related to development of superimposed preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol.** 163:1612-21, 1990.

SISBI/UFU
202348

BAKER PN, BROUGHTON-PIPKIN F, SYMONDS EM. Platelet angiotensin II binding sites in normotensive and hypertensive women. **Br J Obstet Gynaecol** 98:436-440, 1991.

BAKER PN, BROUGHTON-PIPKIN F, SYMONDS EM: Comparative study of platelet angiotensin binding and the angiotensin II sensitivity test as predictors of pregnancy-induced hypertension. **Clin Sci.** 83:89-85, 1992.

BERGSMA, D. J.; ELLIS, C.; KUMAR, C.; NUTHULAGANTI, P.; KERSTEN, H.; ELSHOURBAGY, N.; GRIFFIN, E.; STADEL, J.M.; AIYAR, N. : Cloning and characterization of a human angiotensin II type I receptor. **Biochem. Biophys. Res Commun.** 183:989-995, 1992.

BERTINA, R. M.; VAN TILBURG, N. H.; DE FOUW, N. J.; HAVERKATE, F. :Trombin, a link between coagulation activation and fibrinolysis. **Ann.NY. Acad. Sci** 667:239,1992.

BERTINA R.M., KOELEMAN BPC, KOSTER T., ROSENDAAL FR., DIRVEN RJ, DE RONDE H., VANDER VELDEN PA, REISTSMA PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. **Nature:** 369:64-67, 1994.

BEUFÉ S., BORG J - Y, VASSE M, CHARBONNIER F., MOREAUV, *et al*: Cosegregation of thrombosis with the factor V Q506 in an extended family with resistance to activated protein C. **Br J Haematol** 89:659-662, 1995.

BOKAREWA, M., BREMME, K., BLOMBÄCK, M., *et al*. Arg⁵⁰⁶-Gln mutation in factor V and risk of thrombosis during pregnancy. **Br. J. Haematol.** 92: 473-478, 1996.

.BONNARDEAUX, A.; DAVIES, E.; JEUNEMAITRE, X.; FERY, I.; CHARRU, A.; CLAUSER, E.;TIRET, L.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. : Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. **Hypertension** 24: 63-69, 1994.

BURWELL, C.S., STRAYHORN, W.D., FLICKINGER, D. *et al.* Circulation during pregnancy. **Arch. Intern. Med.**, v. 62, p. 979-1003, 1938.

CAMBIEN, F.; ALHENE-GALAS, F.; HERBETH, B.;ANDRE, J.L.; RAKOTOVAO, R.; GONZALES, M. F.; ALLEGRINI, J.; BLOCH, C.: Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. **Am. J. Hum. Gent.** 43: 774-780, 1988.

CAMBIEN F., COSTEROUSSE O., TIRET L., *et al.* Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. **Circulation** 90:669-76, 1994.

CAMBIEN F., POIRIER O., LECERF L, *et al.* Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction . **Nature** 359:641-3, 1992

CARRARA, W., KAHHALE, S., BITTAR, R.E., MEROLO JUNIOR, J., MITRE, E., ZUGAIB, M. Aspectos epidemiológicos das síndromes hipertensivas na gravidez. **Ver. Ginecol. Obstet.** 2:68-72, 1991.

CHESLEY, L. G. & LINDHELMER, M. D. **Renal hemodynamics and intravascular volume in normal and hypertensive pregnancy** (ed. Rubin P. C.)38-65 (Elsevier, Amsterdam, 1988).

CHESLEY LC, ANNITTO JE, COSGROVE RA. The familial factor in toxemia of pregnancy. **ACOG** 32:303-311, 1968.

CHESLEY LC. Hypertension in pregnancy: Definitions, familial factor and remote prognosis. **Am J Obstet. Kindey Int** 18:234-240, 1991.

CHESLEY LC Hypertensive Disorders in Pregnancy. New York; **Appleton Century Crofts**; 1978

CHESLEY LC, COOPER DW. Genetics of hypertension in pregnancy: possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. **Br J Obstet Gynaecol** 93:898, 1986.

COOPER DW, BRENNECKE SP, WILTON AN. Genetics of preeclampsia. **Hypertension in Pregnancy** 12:1-23, 1992.

DAHLBÄCK B., CARLSSON M., SVENSSON PJ.: Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C. **Proc Natl Acad Sci USA** 90:1004-1008, 1993.

DAHLBÄCK B.: Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. **Blood**:85:607-614, 1995a.

DAHLBÄCK B.: Resistance to Activated Protein C, the Arg to Gln Mutation in the Factor V Gene and Venous Thrombosis. **Tromb Haemost**: 73:739-742, 1995 b.

DANG, Q.D.; VINDIGNI, A, DI CERA, E.: Na allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. **Proc. Natl. Acad Sci. USA** 92:5977, 1995.

DAVEY, D. A. ; MACGILLIVRAY, L. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynec.** 158: 892-898, 1988.

DEGEN, S.J. F., DAVIE, E. W.: Nucleotide sequence of gene for human prothrombin. **Biochemistry** 26:6165, 1987.

DE STEFANO, V.; MARTINELLI, I.; MANNUCCI, P. M.; PACIARONI, K.; CHIUSOLO, P.; CASORELLI, I.; ROSSI, E.;LEONE, G. : The risk of recurrent deep venous thrombosis among heterozygous carriers of both factor V Leiden and the G20210A prothrombin mutation. **New Eng. J. Med.** 341: 801-806, 1999.

DOGGEN, C. J. M.; CATS, V. M.; BERTINA, R. M.; ROSENDAAL, F. R. : Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. **Circulation** 97: 1037-1041, 1998.

EKHOLM EMK, TAHVANAINEN KUO, METSALA T. Heart rate and blood pressure variabilities are increased in pregnancy induced hypertension. **Am J Obstet & Gynecol.** 177: 1208-1212, 1997.

ELKAYAN, U. GLEICHER, N. **Rhythm disorders and pregnancy: cardiac problems in pregnancy.** Alan R. Liss, Inc., 1982. 618p. p. 167-178.

ERDOS, E., SKIDGEL, R. A. The angiotensin I- converting enzyme. **Lab. Invest.** 56: 345-348, 1987.

ESMON CT.: Molecular Events That Control the Protein C Anticoagulant Pathway. **Tromb. Haemost:**70:29, 1993.

FISHER, K. A. ; LUGER, A ; SPARGO, B. H.; LINDHEIMER, M. D. : Hypertension in pregnancy : clinical- pathological correlations and remote prognosis. **Medicine** 60 :267-276, 1981.

FRANCO, R. F.; TRIP, M. D.; TEN CATE, H.; VAN DEN ENDE, A.; PRINS, M. H.; KASTELEIN, J. J. P.; REITSMA, P. H. : The 20210G-A mutation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. **Brit. J. Haemat.** 104: 50-54, 1999.

FOX H. The placenta in pregnancy hypertension. In: Rubin PC, ed. **Handbook of hypertension**, vol 10:hypertension in pregnancy. New York: Elsevier 16-37, 1988.

FERRAZZANI S, CARUSO A, DE CAROLIS S, POMINI F, TESTA AC. The duration of hypertension in puerperium of preeclamptic women relates to fetal growth , renal impairment and week of delivery. **Am J Obstet Gynecol** 171:506-512, 1994.

FURUTA, H.; GUO, D.-F.; INAGAMI, T. : Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 183: 8-13, 1992.

GANT NF, DALEY GL, CHAND S, WHALLEY PJ, MACDONALD PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. **J Clin Invest** 51:2682-2689, 1973

GARCIA-GALA J. M., ALVAREZ V., PINTO C. R., *et al.*: Factor V de Leiden (R 506 Q) and Risk of Venous Thromboembolism: a case-control study based on the Spanish population. **Clin.Genet.** 52:206-210, 1997.

GLAVIANO, W. Evidence for na arteriovenous fistula in the gravid uterus. **Surg. Gynecol. Obstet**, v. 117, p. 301-304, 1963.

- GRAVES SW, MOORE FT, SEELY EW: Increased platelet angiotensin II receptor number in pregnancy-induced hypertension. **Hypertension**. 20:627-632, 1992.
- GUO, D.-F.; FURUTA, H.; MIZUKOSHI, M.; INAGAMI, T. : The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 200: 313-319, 1994.
- HARRISON GA, HUMPHREY KE, JONES N, BADENHOP R, GUO G. ELAKIS G, KAYE JA, TURNER RJ, GREHAN M, WILTON AN, BRENNECKE SP, COOPER DW. A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. **Am J Human Genetics**. 60:1158-1167, 1997.
- HATA, A., NAMIKAWA, C., SASAKI, M., *et al.* Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. **J. Clin. Invest**. 93: 1285-1287, 1994.
- HEGELE, R. A., BRUNT, J. H., CONNELLY, P. W. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure on a genetic isolate. **Circulation** 90: 2207-2212, 1994.
- HELLGREN, M., SVENSSON, P. J., DAHLBACK, B. Resistance to activated protein C as a basis for venous thromboembolism associated with pregnancy and oral contraceptives. **Am. J. Obstet. Gynecol**. 173: 210-213, 1995.
- HOSHINO, S.; KIMURA, A; FUKUDA, DOHI, K; AND SASAZUKI, T.: Polymerase chain reaction- single strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing. **Hum. Immunol** 33 (02):98-107, 1992.
- HUBERT, C., HOUOT, A. M., CORVOL, P., SOUBRIER, F. Structure of the angiotensin I converting enzyme gene. **J. Biol. Chem**. 266: 15377-15383, 1991.

HUGHES, E. C.: **Obstetric gynecologic terminology**. Philadelphia: F.A. Davis Company.p 422-423, 1972.

HUMPHRIES, J. O : Occurrence of hypertensive toxemia of pregnancy in mother-daughter pairs. **Bull. John Hopkins Hosp.** 107: 271-277, 1960.

INNIS, M.A AND GELFAND,D.H.: **PCR-Protocols- a guide to methods and applications**. Academic Press, Ine, USA. 482p. Cap.01. p.03-11.

INÁCIO, J. :Marcadores moleculares associados ao infarto agudo do miocárdio. Tese, **Universidade Federal de Uberlândia**, 1999.

INOUE I., ROHRWASSER A., HELIN C., JEUNEMAITRE X., *et al.* A mutation of angiotensinogen in a patient with preeclampsia leads to altered kinetics of the renin- angiotensin system. **J. Biol. Chem.** 270: 11430-11436, 1995.

JACKSON, C.M.: Physiology and biochemistry of prothrombin, in Bloom al, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD (eds): **Haemostasis and Thrombosis**, Edinburgo, UK, Churchill Living-stone, p 397,1994.

JEUNEMAITRE X., SOUBRIER F., KOTELEVTSYEV Y. V.,*et al.* Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. **Cell.** 71: 169-180, 1992.

JOINT NATIONAL COMMITTEE ON DETECTION, **Evaluation and Treatment of Hypertension**. Final report of the subcommittee on detection and prevalence. **Hypertension** 7: 457-488, 1985.

KALHALE, S.; ZUGAIB, M. :-**Síndromes Hipertensivas na Gravidez**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro,1995, 1^a ed; 342p. Cap06 e 07 p85-125.

KATSUYA, I., KOIKE, E.,YEE, T. W., SHARPE, N., *et al.* Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. **Lancet.** 345: 1600-1603, 1995.

KERR, M.G., SCOTT, D.B., SAMUEL, E. Studies of the inferior vena cava in late pregnancy. **Br. J.**, v.1, p.532-533, 1964.

KERR, M.G. The mechanical effects of the gravid uterus in late pregnancy. **J. Obstet. Gynecol. Br. Commonw.**, v. 72, p. 513-529, 1965

KERR, M.G. Cardiovascular dynamics in pregnancy and labour. **Br. Med. Bull** v. 24, p. 19-24, 1968.

KIYAMA, M. AND FUJITA, T.: High -Troughput asymmetric- PCR SSCP analysis using- controlled temperature conditions. **Biotechniques** 21 (4), 710-716,1996.

LINDHEIMER MD, KATZ AI. Renal physiology and disease in pregnancy. In Seldin DW, Giebisch G eds. **The kidney: physiology and pathophysiology**. 2nd ed. New York: Raven Press; 1992:3371-3431.

LINDOFF, C., INGEMARSSON, I., MARTINSSON, G., *et al.* Preeclampsia is associated with a reduced response to activated protein C. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 176:457-460, 1997.

LYNCH, K. P. & PEACH, M. J. Biochemistry and molecular biology. **Hypertension**. 17: 263-269, 1991;

MACGILLIVRAY I. Some observations on the incidence of pre-eclampsia. **J Obstet & Gynaecol Br Emp** 65:536-539, 1958

MARUYA, E. SAJI, H., AND YOKOYAMA, S.: PCR - LiS. SSCP (Low Ionic Strength Single Stranded Conformation Polymorphism) A Simple Method for High Resolution Allele Typing of HLA, - DRB₁ -DQB₁, and DPB₁ - **Genome Research** (6) 51:57, 1996.

- MAUZY, C. A.; HWANG, O.; EGLOFF, A. M.; WU, L.-H.; CHUNG, F.-Z. : Cloning, expression, and characterization of a gene encoding the human angiotensin II type 1A receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 186: 277-284, 1992.
- MICHAUD, J.; BRODY, L.C.; STEEL, G.; FONTAINE, G.; MARTINS, L.S.; VALTE, D.; AND MITCHELL, G.: Strand- separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine 8-aminotransferase gene. **Genomics** 13: 389-394, 1992.
- MOUTQIN JM, RAINVILLE C, GIROUX L, *et al.* A prospective study of blood pressure in pregnancy: Prediction of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol** 151:191-, 1985.
- .MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W.; GRIENGLING, K. K.; RUNGE, M. S.; BERNSTEIN, K.E.: Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature** 351: 233-236, 1991.
- NAKAI, K., ITOH, C., MIURA, Y., HOTTA, K., *et al.* Deletion polymorphism of the angiotensin I- converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the japonese. **Circulation.** 90: 2199-2202, 1994.
- ORITA, M., IWAHANA, H., KANAZAWA, H., SEKIYA,T.: Detection of polymorphism of human DNA by gel eletrophoresis as single strand conformation polymorphism. **Proc. Narl. Acad. Sci. USA.**86:2766-2770,1989.
- PAWLAK MA, MACDONALD GJ Altered number of platelet angiotensin II receptors in relation to plasma agonist concentrations in normal and hypertensive pregnancy. **J Hypertens.**10:813-819, 1992.

PIJNENBORG R. Trophoblast invasion and placentation in the human: morphological aspects. **Trophoblast Res** 4:33-47, 1990.

POORT, S. R.; ROSENDALL, F. R.; REITSMA, P. H., BERTINA, R. M.: A common genetic variation in 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood** 88 :3698-703, 1996.

RIGAT, B., HUBERT, C., ALHENE-GELA, F., CAMBIEN, F., CORVOL, P., SOUBRIER, F. An insertion/ deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme level. **J. Clin. Invest.** 86: 1343-1346, 1990.

RIGAT B., HUBERT C., CORVOL P., SOUBRIER F. -PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin i converting enzyme gene (DCPI). **Nucleic Acids Res** 20:1433, 1992.

ROBERTSON WB, BROSENS I, DIXON G. Maternal uterine vascular lesions in the hypertensive complications of pregnancy. In: Lindheimer MD, Katz AI, Zuspan FP, eds. **Hypertension in pregnancy**. New York: John Wiley;115-129, 1976.

ROBILLARD, P.Y.; HULSEY, T. C., *et al.* : Associação da hipertensão induzida pela gravidez com o tempo de coabitação sexual antes da concepção. **Lancet** 344: 973-975, 1994.

ROSENDAAL F.R., Risk Factors for Venous Thrombosis: Prevalence, Risk and Interaction. **Semin Hematol** 34:171-87, 1997.

ROSENDAAL, F. R.; DOGGEN, C. J. M.; ZIVELIN, A.; ARRUDA, V. R.; AIACH, M.; SISCOVICK, D. S.; HILLARP, A.; WATZKE, H. H.; BERNARDI, F.; CUMMING, A. M.; PRESTON, F. E.; REITSMA, P. H. : Geographic distribution of the 20210 G to a prothrombin variant. **Thromb. Haemost.** 79: 706-708, 1998.

ROSENDAAL FR., KOSTER T, VANDENBROUCKE JP., REISTMA PH.: High Risk of Thrombosis in Patients Homozygous for Factor V Leiden (Activated Protein C Resistance). **Blood**. 85:1504-1508, 1995.

ROYLE, N.J.; IRWIN, D. M.; KOSCHINSKY, M.L; MACGILLIVRAY, R.T.A; HAMERTON, J.L.: Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively. **Somat Cell Mol Genet** 13:285, 1987.

SAFTLAS AF, OLSON DR, FRANKS AL, *et al.* Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States 1979-1986. **Am J Obstet Gynecol** 163:460-, 1990.

SAIKI, R.K.; AND GELFAND, D. H.: **Introduzing AmpliTaq DNA polymerase.** Amplifications 1:4-6, 1989.

SASAKI, K.; YAMANO, Y.; BARDHAN, S.; IWAI, N.; MURRAY, J. J.; HASEGAWA, M.; MATSUDA, Y.; INAGAMI, T. : Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. **Nature** 351: 230-233, 1991.

SCHMORL, G. **Pathologisch anatomische untersuchungen über puerperal eklampsia.** Apub: Weiner, C. P. Leipzig: FCW Vogel, 1988.

SHEFFIED, V.C.; BECK, J.S.; LIDRAL, A.; NICHOLS, B. ; COUSINEAU, A AND STONE, E.M.: Detection of polymorphism within gene sequences by CG-clamp denaturing gradient gel electrophoresis. **Am. J. Hum. Genet.** 50:567-575, 1993.

SHEN L., DAHLBÄCK B.: Factor V and Protein S as Synergistic Cofactors to Activated Protein C in Degradation of Factor VIIIa. **J. Biol Chem** 269:18735, 1994.

SIBAI BM, EWELL M, LEVINE RJ, KLEBANOFF MA, ESTERLITZ J, CATALANO PM, GOLDENBERG RL, JOFFE G. Risk factors associated with preeclampsia in healthy nulliparous women. **Am J Obstet and Gynecol.** 177: 1003-1010, 1997.

SIBAI BM, MERCER B, SARINOGLU C. Severe preeclampsia in the second trimester: Recurrence risk and long-term prognosis. **Am J Obstet Gynecol.** 165:1408-1412, 1991.

STEINBERG, W.M., FARINE, D. Maternal mortality in Ontario from 1990 to 1980. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.66, p. 510, 1985.

TAKAYANAGI, R.; OHNAKA, K.; SAKAI, Y.; NAKAO, R.; YANASE, T.; HAJI, M.; INAGAMI, T.; FURUTA, H.; GOU, D.-F.; NAKAMUTA, M.; NAWATA, H. : Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 183: 910-916, 1992.

TEWKSBURY, D. A. & DERT, R. A. High molecular weight angiotensinogen levels in hypertensive pregnancy women. **Hypertension.** 4: 729-734, 1982.

TEWKSBURY, D. A. Angiotensinogen: biochemistry and molecular biology. In: Laragh J. H., Bremmer B. M., eds. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management.** New York: Raven Press, Publishers: 1990, 1197-1218.

TIRET, L., RIGAT, B., VISVIKIS, S., *et al.* Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. **Am. J. Hum. Genet.** 51: 197-205, 1992.

TUOHY JF, JAMES DK. Pre-eclampsia and trisomy 13. **Br J Obstet Gynecol.** 99:891-894, 1992

TRUPIN LS, SIMON LP, ESKENAZI B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. **Epidemiology** 7(3): 240-4, 1996.

ZÖLLER B., SVENSSON P. J., HE X., DAHLBÄCK B.: Identification of the Same Gene Mutation in 47 out of 50 Thrombosis Prone Families with Inherited Resistance to Activated protein C. **J. Clin. Invest.** 94:2521-2524, 1994.

ZHOU Y, DAMSKY CH, CHIU K, ROBERTS JM, FISHER SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. **J Clin Invest** 91:950-960, 1993.

ZIVELIN, A.; ROSENBERG, N.; FAIER, S.; KORNBROT, N.; PERETZ, H.; MANNHALTER, C.; HORELLOU, M. H.; SELIGSOHN, U. : A single genetic origin for the common prothrombotic G20210A polymorphism in the prothrombin gene. **Blood** 92: 1119-1124, 1998.

ZUGAIB, M., KAHHALE, S. Conceito, classificação e incidência das síndromes hipertensivas na gestação. **Gin. Obst. Bras.** 8(4) 23-244, 1985.

WANG, W. Y. S.; ZEE, R. Y. L.; MORRIS, B. J. : Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. **Clin. Genet.** 51: 31-34, 1997.

WARD, R. H. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. In: Laragh J. H., Bremner B. M., eds. **Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management.** New York: Raven Press, Publishers: 1990, 81-100.

WARD, K., HATA, A., JEUNEMAITRE, X., HELIN, C., *et al.* A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. **Nature Genetics**. 4: 59-61, 1993.

WEINER, C. P. Thrombotic microangiopathy in pregnancy and the postpartum period. **Semin. Hematol.** 24: 119-129, 1987.

WILLIAMS, J. F.: Optimization strategies for the polymerase chain reaction. **Biotechniques** 7:762-769,1989.

Capítulo I

*Marcadores Moleculares Associados à
Pré-Eclâmpsia.*

Abstract:**SILVA, Elisângela Rosa. Molecular Markers Associated to Preeclampsia.**

Preeclampsia, or pregnancy-specific hypertensive disease, is a pathology which, despite obstetrical care, occurs during pregnancy causing discomfort for both mother and fetus. Preeclampsia is a syndrome unique to pregnancy. Hypertension, edema and proteinuria are some of the characteristics of its manifestation. Even though many advancements have been done in the last years, studies still couldn't establish an etiology for the disease. It's believed to be a multiple-cause disease and genetic factors are believed to be involved on it's manifestation. During a normal pregnancy several physiological modifications occur. RAAS, which is responsible for muscular tonus, hydric balance and salt homeostasis maintenance, suffers changes that, in a preeclampsia pregnancy, become harmful to the pregnant woman's health. Another extensively affected system is the blood clotting system, which is said to be in hypercoagulable state. The present study analyses the angiotensinogen variant M235T, the angiotensin I converting enzyme I/D polymorphism, the angiotensin II receptor I variant A1166C, which are RAAS components, and genetic variants of Factor V of Leiden, R06Q, and protrombin A20210G, which are part of the blood coagulation chain. Peripheral blood samples for DNA extraction and genotyping were collected under a term of agreement from 50 preeclamptic pregnant women and 47 normal pregnant women. Genotypical and allelic frequencies for each gene were calculated and no statistically significant differences were found between the studied groups. Angiotensinogen was the only gene to show statistically significant canonical correlation with preeclampsia manifestation ($R= 0.21$ $p<0.035$) and there was a small increase on this correlation when the Factor V of Leiden gene was included in the analysis ($R= 0.26$ $p<0.035$). The estimated effect on the odds ratio for the angiotensinogen gene was 2.16, i.e., heterozigous M235T women have 2.16 times greater risk to develop preeclampsia than M/M, and T/T genotype predisposes women to 4.32 times greater risk to develop preeclampsia when compared to M/M homozygotes. The analysis of non-genetic risk factors (age, number of pregnancies, presence of edema, systemic systolic and diastolic blood

pressure) related to occurrence of preeclampsia was statistically significant ($R=0.83$ $p<0.00001$). Therefore, non-genetic factors influenced preeclampsia manifestation in about 80% of the cases studied, and among genetic factors, angiotensinogen was the only one that contributed in 20% of cases. Even though the results of this study have suggested a stronger influence by non-genetic factors, genetic evaluation of subjects with a family predisposition for preeclampsia, or suspect clinical situation is very important for early diagnosis and disease prevention, avoiding morbidity and mortality for both pregnant woman and fetus.

Resumo:**SILVA, Elisângela Rosa. Marcadores Moleculares Associados à Pré-Eclâmpsia.**

A pré-eclâmpsia ou doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) é uma patologia que ainda hoje, apesar dos cuidados obstétricos, é responsável por uma alta taxa de morbi-mortalidade materno-fetal no mundo todo. Clinicamente se caracteriza pela presença de hipertensão, edema e proteinúria. Embora vários avanços tenham sido feitos ao longo dos anos, os estudos não conseguiram ainda estabelecer uma etiologia para a doença. Acredita-se que ela seja uma doença com causas múltiplas e que fatores genéticos estejam envolvidos na sua manifestação. Durante a gravidez normal ocorrem várias modificações fisiológicas. O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) que é responsável pela manutenção do tônus muscular, balanço hídrico e homeostase encontra-se alterado durante a gravidez normal; na DHEG este sistema é responsável pela elevação da pressão arterial e pelo edema. Outro sistema amplamente afetado, é o da coagulação sangüínea, que é dito em estado de hipercoagulabilidade. No presente estudo foram analisados a variante M235T do angiotensinogênio, o polimorfismo de I/D da enzima conversora da angiotensina I, a variante A1166C do receptor I de angiotensina II, que são componentes do SRAA, e as variantes genéticas do Fator V de Leiden, R506Q, e da protrombina, A20210G, que fazem parte da cascata da coagulação sangüínea. Amostras de sangue periférico para extração e genotipagem de DNA foram coletadas, mediante termo de consentimento, de 50 mulheres grávidas com pré-eclâmpsia e de 47 grávidas normais. As frequências genotípicas e alélicas de cada gene foram calculadas e não houve diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados. O gene do angiotensinogênio foi o único a apresentar correlação estatisticamente significativa com a manifestação da pré-eclâmpsia ($R= 0,21$ $p<0,035$) e houve pequeno acréscimo na correlação quando o gene do Fator V de Leiden foi incluído na análise ($R= 0,26$ $p<0,035$). O efeito estimado na "odds ratio" para o gene do angiotensinogênio foi de 2,16, ou seja indivíduos heterozigotos M235T têm um de risco de 2,16 vezes maior de desenvolver pré-eclâmpsia do

que indivíduos M/M e os portadores do genótipo T/T têm um risco, 4,32 vezes maior em relação aos indivíduos M/M. A análise dos fatores de risco não genéticos (idade, número de gestações, presença de edema, pressão arterial sistólica e diastólica) associados à ocorrência da pré-eclâmpsia foi estatisticamente significativa ($R= 0,83$ $p<0,00001$). Portanto os fatores não genéticos influenciaram a manifestação da pré-eclâmpsia em aproximadamente 80% dos casos estudados e, dentre os fatores genéticos, o angiotensinogênio foi o único a contribuir, sendo responsável por uma parcela de 20% dos casos. Embora os resultados do estudo tenham apontado para uma maior contribuição dos fatores não genéticos, a avaliação genética de indivíduos com predisposição familiar para a pré-eclâmpsia ou com quadro clínico suspeito é de grande importância no diagnóstico precoce e prevenção da doença evitando os quadros de morbidade e mortalidade para a gestante e o feto.

1-Introdução

A gravidez é acompanhada por uma série de mudanças fisiológicas. Durante este estágio a mulher apresenta modificações fisiológicas normais relacionadas ao desenvolvimento da gravidez, contudo, pode também apresentar modificações prejudiciais à saúde da mãe e do feto.

A pré-eclâmpsia é uma das patologias mais comuns durante a gravidez, sendo caracterizada pela elevação da pressão arterial, presença de edema e proteinúria. As causas dessa doença não são totalmente conhecidas, embora vários estudos tenham sido feitos. Acredita-se que a pré-eclâmpsia tenha múltiplas causas e alguns estudos indicam para uma possível causa genética.

Os genes que codificam os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) são ditos genes candidatos envolvidos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão essencial, infarto do miocárdio e derrame. Alguns estudos encontraram indícios de que esses genes estejam relacionados à hipertensão induzida pela gravidez (BROUGHTON, 1999).

O gene do angiotensinogênio, um hormônio inativo do SRAA, possui aproximadamente 15 polimorfismos, destes apenas dois têm contribuído de forma significativa para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares e pré-eclâmpsia (JEUNEMAITRE *et al.*, 1992; INOUE *et al.*, 1995). A variante T174M tem sido mais relacionada ao infarto do miocárdio, enquanto a variante M235T esta relacionada à hipertensão e pré-eclâmpsia (WARD *et al.*, 1993; ARNGRIMSSON *et al.*, 1993 FROSSARD *et al.*, 1998;). Essa variante caracteriza-se por uma substituição do aminoácido metionina por treonina, na posição 235 da proteína. Essa mudança de aminoácidos resulta

em uma potencialização dos níveis de formação do hormônio angiotensinogênio, fazendo com que haja, ao final do metabolismo, uma maior produção de angiotensina II que é um potente vasoconstritor.

A enzima conversora de angiotensina (ECA) tem um importante papel no SRAA. Ela cliva a angiotensina I, uma proteína inativa, convertendo-a no hormônio vaso constritor ativo angiotensina II. O gene da ECA possui um polimorfismo de deleção/ inserção de 287 pb no *intron* 16 que tem sido alvo de vários estudos. É sabido pela literatura que indivíduos portadores do polimorfismo de inserção(I/I) produzem em média níveis mais baixos de enzima do que indivíduos portadores do polimorfismo de deleção (D/D) que possuem níveis médios elevados da ECA e que os indivíduos heterozigotos para o polimorfismo (I/D) têm médias intermediárias (RIGAT *et al.*,1990). Alguns pesquisadores afirmam que esse polimorfismo é um marcador molecular para a ocorrência de doenças coronarianas e hipertensão em geral, porém há controvérsias em alguns estudos mais recentes (GARDEMANN, 1995; MITCH, 1995; SINGER , 1996; TEO, 1995).

Outro componente do SRAA é o gene do receptor I de angiotensina II. Este receptor está presente no endotélio, mediando a ação da angiotensina II. A variante 1166 deste gene, caracterizada pela transversão de A → C está sendo relacionada à hipertensão e ao aumento de infarto do miocárdio quando esta ocorre simultânea ao alelo D da ECA (INÁCIO,1999).

A pré-eclâmpsia relaciona-se também a uma ativação da cascata de coagulação sangüínea, a qual muitas vezes leva a um desequilíbrio entre os fatores procoagulantes e anticoagulantes resultando em trombose da artéria espiral da placenta ou de outras regiões. Vários estudos comprovam o aumento da atividade de alguns componentes da coagulação (ALEXANDER *et al.*,1956; WEINER,1987). Alterações no número e função das plaquetas e anormalidades hemostáticas são características da pré-eclâmpsia (WEINER,1988; REDMAN *et al.*,1978; STUBBS *et al.*,1986; BALLEGEER *et al.*,1992; NORRIS *et al.*,1993; KONIJNENBERG *et al.*,1997).

A resistência à proteína C ativada (APC), causada por uma mutação no gene do fator V da coagulação, fator V de Leiden, na qual ocorre a troca de

um G→A na posição 1691 foi associada à ocorrência de trombose venosa e pré-eclâmpsia em vários estudos (LINDOFF *et al.*,1997).

A variante G20210A da protrombina (PROT), embora seja uma mutação rara, também relaciona-se à pré-eclâmpsia. A troca de guanina por adenina na posição 20210 da proteína leva a uma produção maior de protrombina plasmática, sendo um fator de risco para doenças tromboembolíticas (GRANDONE *et al.*,1998).

A associação ou não das variantes do AGT, da ECA, do AT1, do FVL e da PROT com a pré-eclâmpsia é de suma importância na tentativa de se descobrir a etiologia dessa doença, pois uma vez descoberta a associação das mesmas com a patologia, tratamentos preventivos poderão amenizar o sofrimento da gestante e do feto. O estudo dos polimorfismos destes genes como preditores da pré-eclâmpsia foi o objetivo do presente trabalho.

2-Objetivos:

Objetivo primário:

Determinar o efeito dos polimorfismos gênicos da protrombina, Fator V de Leiden, enzima conversora de angiotensina, receptor I da angiotensina II e angiotensinogênio isoladamente e associados na ocorrência de pré-eclâmpsia durante a gravidez.

Objetivo secundário:

Avaliar a presença de fatores de risco não genéticos: número de gestações, idade, pressão arterial (mmHg), máxima e mínima, raça e edema; associados aos polimorfismos gênicos e à ocorrência de pré-eclâmpsia.

3-Pacientes e Métodos:

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Genética Molecular, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e no BioGenetics Tecnologia Molecular Ltda, em Uberlândia-MG.

3.1-Material Biológico:

Amostras de sangue periférico de pacientes grávidas foram obtidas na enfermaria de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC UFU). A coleta foi feita em tubo vacutainer de 5 ml com EDTA, , mediante um termo de consentimento (anexo I) assinado pelas pacientes e autorização da Comissão de Ética da UFU.

As pacientes foram classificadas em dois grupos:

grupo I:-50 mulheres grávidas portadoras de DHEG internadas na maternidade do HC UFU;

grupo II:-48 mulheres grávidas saudáveis internadas na maternidade do HC UFU para a realização do parto.

Todas as pacientes do grupo I foram submetidas à avaliação clínica, laboratorial, eletrocardiográfica, ecocardiográfica .

3.2-Extração de DNA:

As extrações de DNA foram feitas segundo o método de isolamento de DNA adaptado de SAMBROOK *et al.*,(1989). O sangue, armazenado a 4°C, foi centrifugado para separação da camada de leucócitos. Uma alíquota de 500 µL da camada de leucócitos foi transferida para eppendorf de 1,5 ml e acrescentou-se 1,0 ml de Tampão de Lise Hemácia (TLH) [NH₄Cl 155mM,

KHCO₃ 10mM e EDTA 1mM] em cada amostra, misturando por inversão durante 30 segundos.

Esta mistura foi centrifugada a 2.500 rpm durante 5 minutos para peletizar os núcleos. Descartou-se o sobrenadante, repetindo-se o passo por 2 a 3 vezes, até que o pelete adquirisse uma coloração creme claro. Foram adicionados 150 µL do Tampão de Lise do Núcleo (TLN) [Tris - HCl 10mM (pH 8,0), EDTA 2mM, NaCl 400mM] e ressuspendeu-se o pelete. Adicionou-se, então, 5 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% gelado e 2,5 µL de proteinase K (20 mg/ml) à solução e as amostras foram incubadas por 6 horas à 60° C. Depois, 100 µL de NaCl saturado foram adicionados às amostras que foram colocadas em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante e adicionou-se 800 µL de etanol absoluto não congelado, misturando-se por inversão até que ocorresse a precipitação. Girou-se o tubo em seu eixo no sentido horizontal, para prender o DNA à parede do tubo, descartando-se o sobrenadante. O pellet foi lavado em 1,0 ml de etanol 70%. Descartou-se o álcool e os peletes foram ressuspendidos em volume variável de TE [TRIS - HCl 10mM, EDTA 1 mM (pH. 7,4)] de acordo com o tamanho dos mesmos. A seguir foi feito o cálculo da concentração de DNA por espectrofotômetro à 260 nm.

3.3-PCR para genotipagem do gene do angiotensinogênio:

O fragmento do gene do angiotensinogênio com 165 pb, contido no *exon* 2, códon 235 foi amplificado por meio da PCR, segundo RUSS *et al.*(1993) com os seguintes *primers*:

1- 5'-CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T-3'

2- 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3'

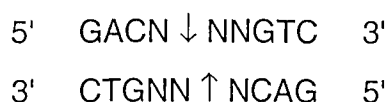
As reações foram feitas nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico, 10 pmoles de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA polimerase e tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume final de 30µL. A PCR foi feita em um termociclador MJ. Research,

Inc. utilizando-se o seguinte programa: 90° C por 3 min, 10 ciclos de 94° C por 1 min, 68° C 1min, 72° C 1 min; seguidos por 30 ciclos de 90° C 30 s, 68° C 1 min, 72° C 30 s e uma extensão final de 72° C por 10min.

O produto amplificado de 165 pb foi visualizado em gel de agarose 2% corado com 3 µL de brometo de etídeo (10 mg/ml).

Dez microlitros do produto de PCR foram digeridos com a enzima *Tth* 111 I (New England Biolabs) segundo as especificações do fabricante. As reações foram incubadas por 4h a 37°C.

Essa enzima de restrição reconhece o seguinte sítio de restrição:



A variante M235T apresenta ou não sítio de restrição para a enzima; na presença de C (citosina) na posição 704, códon 235, o produto amplificado é clivado, resultando em dois fragmentos de 141 pb e 24 pb, que correspondem ao alelo T235 e na presença de T (timina) na mesma posição o fragmento não sofre clivagem, resultando em um fragmento de 165 pb que corresponde ao alelo M235. Indivíduos homozigotos para o alelo T235 (T235T) apresentam dois fragmentos de 141 pb e 24 bp, os heterozigotos (M235T) têm três fragmentos de 165 bp, 141 bp e 24 bp e os homozigotos para o alelo M235 (M235M) apresentam apenas um fragmento de 165 bp. O produto da restrição foi visualizado em gel de agarose 2,5% corado por brometo de etídeo, após eletroforese a 100 volts por 1 hora.

3.4-PCR para genotipagem do gene da ECA:

O fragmento correspondente ao *intron* 16 do gene da ECA foi amplificado, conforme RIGAT *et al.* (1992) *apud* NAKAI *et al.*(1994) com os *primers* abaixo:

5'- CTG CAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT- 3'

5'- GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T- 3' .

Cada reação consistiu 100 ng de DNA genômico, 25 pmol de primer, 1,5 mmol/L de MgCl₂, 0,5mmol/L de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase e

tampão da Taq DNA polimerase 1X em um volume de reação de 30 μ L. A PCR utilizou o programa: 30 ciclos a 93 $^{\circ}$ C por 1,5 min, 58 $^{\circ}$ C por 2 min e 72 $^{\circ}$ C por 2 min.

O polimorfismo do *intron* 16 é caracterizado pela deleção/inserção de um fragmento de 287 pb no gene da ECA. Os produtos visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio, caracterizarão os genótipos em questão. Um indivíduo homocigoto para a deleção (D/D) possui uma banda de 203 pb, o heterocigoto (D/I) duas bandas de 490 pb e 203 pb e o homocigoto para a inserção (I/I) apresenta um fragmento de 490 pb.

3.5- PCR para genotipagem do gene fator V:

Um fragmento do gene fator V com 223bp, contido no *exon* 10, códon 506, foi amplificado segundo GARCIA-GALA *et al.*, (1997) por meio da PCR com os *primers*:

1- ACC CAC AGA AAA TGA TGC CCA G e

2- TGC CCC ATT ATT TAG CCA GGA G

A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico, 7,5 pmoles de cada *primer*, 200 μ M de dNTP, 1,5mM MgCl₂, tampão da Taq DNA polimerase (1X) e 1U de Taq-DNA polimerase (Promega) em um volume final de reação de 30 μ l. A PCR foi feita em um termociclador MJ. Research, Inc. utilizando-se o seguinte programa: 95 $^{\circ}$ C durante 5 min, desnaturação inicial, seguidos por 30 ciclos a: 95 $^{\circ}$ C por 30s, durante 5 min, desnaturação inicial, seguidos por 30 ciclos a: 95 $^{\circ}$ C por 30s, durante 5 min, desnaturação inicial, seguidos por 30 ciclos a: 56 $^{\circ}$ C por 60s, anelamento, e 75 $^{\circ}$ C por 30s, extensão. Ao final destes 30 ciclos, acrescentou-se uma temperatura de extensão de 75 $^{\circ}$ C por 5 minutos.

O fragmento, de 223bp, foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e documentado por meio do aparelho de VDS (VideoDocumentation System-PharmaciaBiotech).

Dez microlitros de cada produto da PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Mnl* I (New England Biolabs) segundo as especificações do fabricante. As reações foram incubadas por 4h a 37 $^{\circ}$ C.

A enzima *MnI* reconhece o seguinte sítio:

5'... CCTC (N)₇.....↓.. 3'

3'... GGAG (N)₆...↑....5'

Dois sítios de restrição da enzima *MnI* estão presentes no alelo normal amplificado, criando fragmentos de 37, 82 e 104 pares de bases. No Fator V de Leiden, a mutação leva à perda de um sítio de restrição produzindo dois fragmentos de 82 e 141 pares de bases. Um indivíduo homocigoto para o alelo normal (A₂A₂) possui os fragmentos de 37, 82 e 104 pb; um heterocigoto (A₁A₂) apresenta fragmentos de 37, 82, 104 e 141 pb; enquanto um homocigoto para o alelo mutante (A₁A₁) contém fragmentos de 82 e 141 pb (Jeff *et al.*, 1997). O produto da restrição foi visualizado após eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio.

3.6-PCR para Genotipagem do Gene do Receptor AT1:

Um fragmento do gene do receptor 1 da angiotensina II (AT1) contendo 856 pb, localizado na região 3' não traduzida, foi amplificado segundo TIRET *et. al.* (1994) pelo par de *primers*

'5 -AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT- 3'

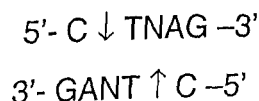
5'- GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG- 3'

Esta região abriga a variante 1166, caracterizada pela transversão A→C no nucleotídeo que ocupa essa posição.

Cada reação de PCR foi feita com: 100ng de DNA genômico, tampão da Taq-DNApolimerase (1x), 10 pmoles de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 2,5mM de MgCl₂ e 1,5U da enzima Taq-DNApolimerase. O programa utilizado para amplificação do fragmento consistiu de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C , seguida por 34 ciclos compostos por desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 58° C por um minuto

e extensão a 72° C por 35 segundos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

Dez microlitros do produto amplificado foram digeridos com três unidades da enzima de restrição *Dde I* durante 5 horas a 37° C de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies). Esta enzima reconhece o seguinte sítio de restrição:



No fragmento em estudo do gene AT1 ocorre o aparecimento de um sítio de restrição no alelo mutante, pois a substituição de um A por C cria outro sítio de reconhecimento da enzima *Dde I*. Assim, o alelo A do gene do AT1 possui um sítio de restrição para a enzima, gerando dois fragmentos de 600 e 256 pb e o alelo C, mutante, possui dois sítios produzindo três fragmentos de 600, 146 e 110bp cada.

O produto de restrição foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio após eletroforese. Indivíduos homozigotos para o alelo A apresentam duas bandas de 600 e 256 pb, os homozigotos para o alelo C apresentam três bandas de 600, 146 e 110 pb e os heterozigotos A/C possuem quatro bandas de 600, 256, 146 e 110 pb.

3.7 PCR para genotipagem do gene Protrombina

Um fragmento de 345 pb, pertencente ao *exon* 14 e região 3' não traduzida do gene da protrombina, foi amplificado segundo POORT *et al.*, (1996). usando os seguintes *primers*:

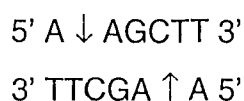
5'TCT AGA AAC AGT TGC CTG GC 3' e o *primer* mutagênico,

5'ATA GCA CTG GGA GCA TTG AA*G C 3'

A reação foi realizada nas seguintes condições: 100 ng de DNA genômico, 7 pMoles de cada *primer*, tampão da Taq-DNApolimerase (1X), 2,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP e 1 U da enzima Taq-DNApolimerase.

O programa utilizado para amplificação desse fragmento foi: desnaturação inicial por 5 min a 95° C; seguida por 34 ciclos correspondentes às fases de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 52° C por 1 minuto e extensão 72° C por um minuto. Ao final foram acrescentados mais 5 min de extensão à temperatura de 72° C. O produto amplificado de 345 pb foi visualizado, após eletroforese, em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Dez microlitros do produto amplificado foram digeridos com três unidades da enzima de restrição *Hind* III a 37° C por 8 horas. Essa enzima reconhece o seguinte sítio de restrição:



A variante 20210 G→A do gene da protrombina, na presença do alelo G não é clivada pela enzima *Hind* III, mantendo um fragmento de 345 bp. No alelo A a enzima reconhece um sítio enzimático e cliva o fragmento, gerando dois novos fragmentos de 322 e 23 pb. Assim, após a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, os fragmentos foram visualizados obtendo os seguintes padrões de bandas: indivíduos homocigotos para o alelo G apresentam um único fragmento de 345 pb indivíduos heterocigotos A/G apresentam fragmentos de 345, 322 e 23 pb e homocigotos para o alelo A apresentam os fragmentos de 322 e 23 pb.

3-8 LIS-SSCP para genotipagem dos genes do AGT, FVL e PROT.

O LISS-SSCP foi utilizado como técnica alternativa para a genotipagem dos indivíduos, pois trata-se de um método de baixo custo e de alta eficiência na detecção de polimorfismos e novas mutações.

Após a amplificação de cada gene, 2µL de produto amplificado foram misturados a 20µL de tampão de LIS (sacarose 10%, azul de bromofenol 0,01%, xilenocianol 0,01%). As amostras foram incubadas a 97°C por 5 minutos e posteriormente, 10µL das mesmas foram aplicados em gel de

poliacrilamina 12% (acrilamida/ bisacrilamida = 49:1). A eletroforese teve duração aproximada de 3 a 6 horas, dependendo do gene, sendo aplicada nesta uma corrente constante de 15mA e temperatura de 4°C. Em seguida, o gel foi corado com nitrato de prata (Pharmacia), possibilitando a visualização dos resultados.

3-9 Análise estatística:

A análise das freqüências gênicas e genóticas dos genes do AGT, ECA, AT1 e FVL foi feita pelo teste t, para verificar se havia ou não diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pacientes DHEG e controles.

O teste t foi aplicado às médias dos fatores de risco (nº de gestações, idade, pressão sistêmica sistólica e diastólica e edema) associados aos genótipos de cada grupo para verificar se havia diferenças significativas entre as médias obtidas em cada grupo.

A análise de correlações canônicas foi feita para analisar a associação dos fatores genéticos e não genéticos, isoladamente e em conjunto, à predisposição de ocorrência da DHEG.

Os efeitos aditivos e de dominância dos genes podem ser estimados por meio do modelo de regressão linear múltipla: adotando o modelo de MATHER & JINKS (1984) Para análise multivariada de dados binários, DOBSON (1990), afirma que o modelo logístico, constitui-se em uma poderosa técnica, similar à regressão linear múltipla para dados contínuos. Deste modo, os efeitos dos genes sobre a pré-eclâmpsia foram estimados utilizando o modelo de regressão logística (Proc Logistic do SAS) para o cálculo dos "odds ratio", utilizando os programas Statistica versão 5.0 (1994/95) e SAS versão 6.08 (1993).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram genotipadas 50 pacientes portadoras de DHEG e 47 pacientes grávidas normais para os genes do AGT, ECA, AT1, FVL e PROT. A amplificação do gene do AGT produziu um fragmento de 165 pb que foi visualizado em gel de agarose 2% (Figura-3). A Figura-4 mostra a restrição enzimática do fragmento do AGT, foram encontrados três genótipos: M/M, correspondente ao fragmento de 165 pb, M/T, apresentando fragmentos de 165 , 141 e 24 pb e T/T com fragmentos de 141 e 24 pb; o fragmento de 24 pb é muito pequeno, não sendo possível sua visualização em gel de agarose. A genotipagem deste gene também foi feita por meio da técnica de LIS-SSCP (Figura-5) a qual demonstrou repetibilidade e especificidade, sendo uma alternativa segura e barata para detecção de mutações.

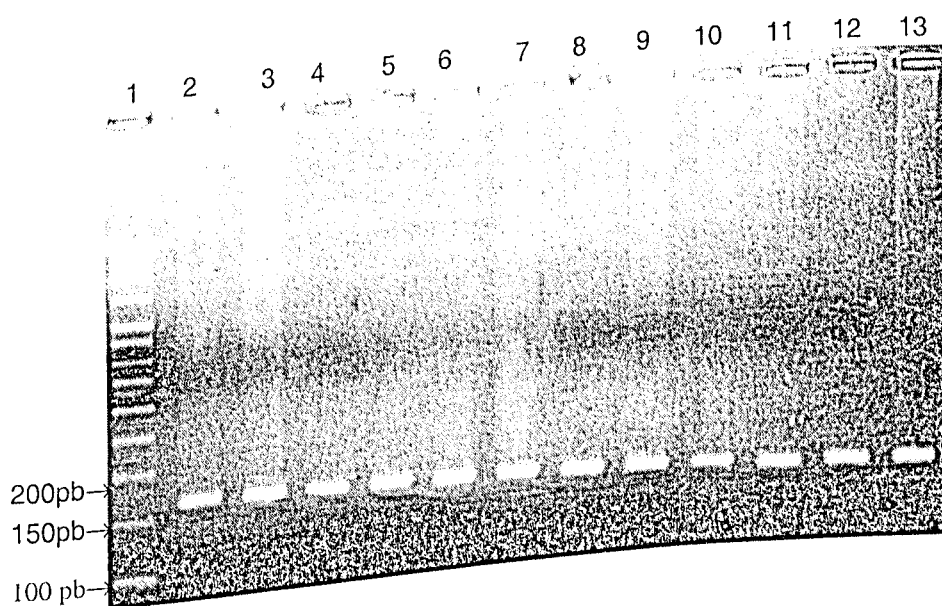


Figura-3: Produto amplificado do gene AGT em gel de agarose 2%.
 Coluna1-marcador de peso molecular de 50pb
 Colunas 2 a 13-fragmento do gene do AGT com 165 pb

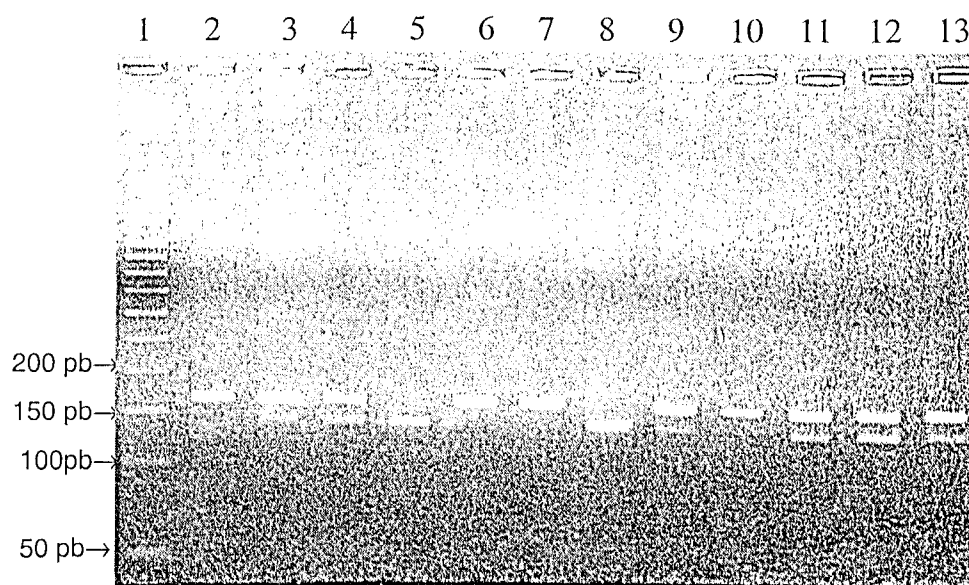


figura -4: Restrição enzimática do produto amplificado do gene do AGT com a enzima *Tth* III 1

Coluna : 1- marcador molecular de 50 pb

Colunas: 2,6,7,10- fragmento de 165 pb, indivíduos M/M

Colunas:3,4,9, 11,12,13- fragmentos de 165,141 e 24 pb, indivíduos M/T

Colunas: 5 e 8- fragmentos de 141 e 24 pb, indivíduos T/T.

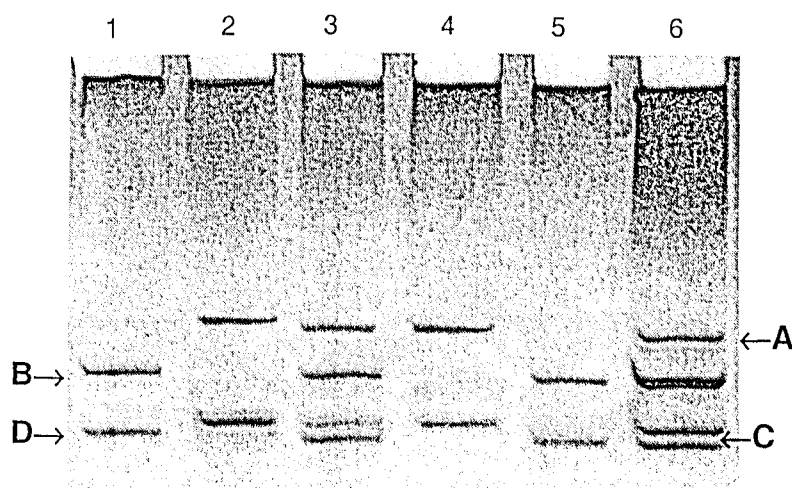


Figura-5: LIS-SSCP do fragmento do gene do AGT.

Colunas 1 e 5 – indivíduos M/M, caracterizado pelas bandas B e D

Colunas 2 e 4 – indivíduos T/T, caracterizados pelas bandas A e C

Colunas 3 e 6 – indivíduos M/T, caracterizados pelas bandas A, B, C e D

A genotipagem do gene da ECA resultou em três padrões de bandas de acordo com cada genótipo. Os indivíduos D/D apresentaram um fragmento de 203 pb, os I/D possuem 2 fragmentos de 490 e 203 pb e os indivíduos I/I um fragmento de 490 pb. Os genótipos foram visualizados em gel de agarose 2% (Figura-6).

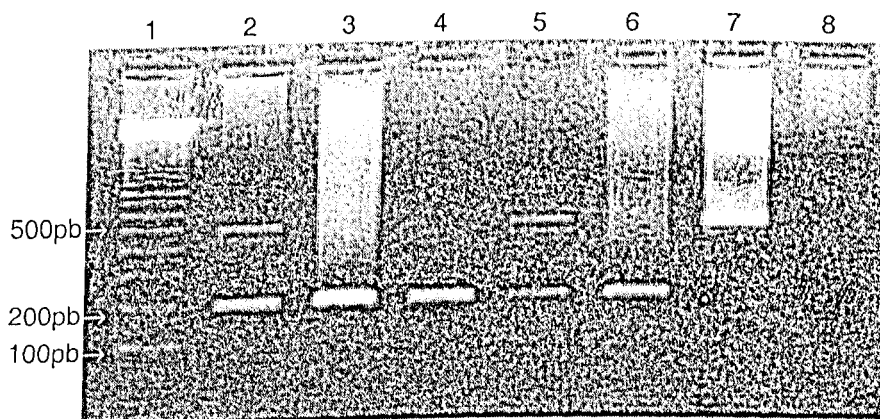


Figura: 6- Genótipos do polimorfismo I/D da ECA em gel de agarose 2%.
 Coluna 1- marcador de peso molecular de 100 pb
 Colunas 2 e 5 – bandas de 203 e 490pb que caracterizam o genótipo I/D
 Colunas 3, 4 e 6- bandas de 203pb características do genótipo D/D
 Coluna 7 – banda de 490 pb caracterizando o genótipo I/I.
 Coluna 8- controle de reação (branco)

A amplificação, via PCR, do gene do AT1 resultou em um fragmento de 856 pb (Figura-7). A restrição enzimática com a enzima *Dde* I resultou nos seguintes genótipos: A/A com fragmentos de 600 e 256 pb, A/C que possui fragmentos de 600, 256, 146 e 110 pb e C/C com fragmentos e 600, 146 e 110 pb (figura-8).

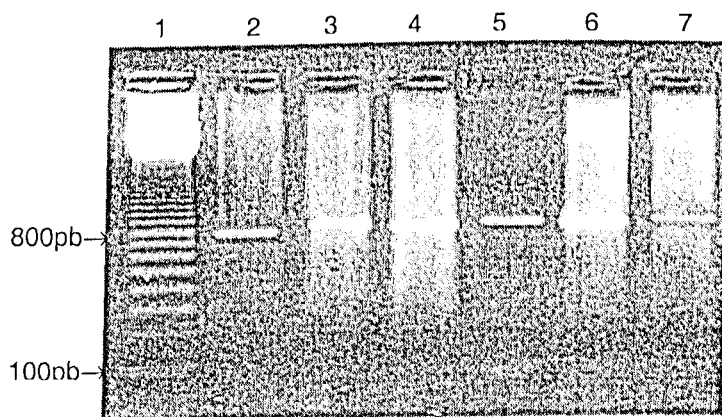


Figura 7- Fragmento de 856 pb corresponde ao gene do AT1.

Coluna 1- Marcador de peso molecular de 100pb.

Colunas 2 a 7- Banda de 856 pb, amplificada do gene do AT1.

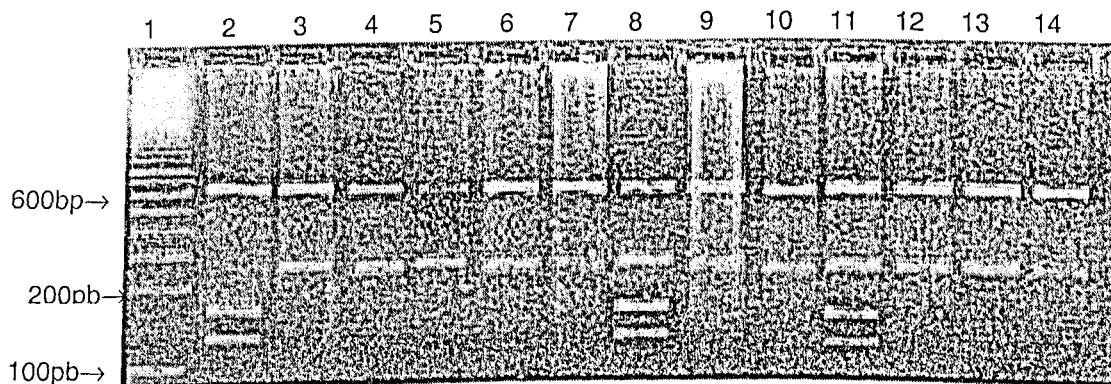


Figura:8- Restrição enzimática do fragmento do gene AT1 com a enzima *Dde I*

Coluna 1- marcador de peso molecular de 100pb.

Coluna 2- Fragmentos de 600, 146 e 110pb, representando o genótipo C/C.

Colunas 3,4,5,6,7,9,10 12,13 e 14- fragmentos de 600 e 256 pb representando o genótipo de indivíduos A/A .

Colunas 8 e 11 – fragmentos de 600, 256, 146 e 110 pb representando o genótipo A/C.

O fragmento do gene do FVL com 223 pb foi amplificado e visualizado em gel de agarose 2% (figura-9). A restrição enzimática resultou nos padrões de bandas esperados para os genótipos A2/A2, que apresentou fragmentos de 104, 82 e 37 pb e A2/A1 com fragmentos de 141, 104, 82 e 37 pb (figura-10). Nenhum indivíduo A1/A1 foi encontrado na amostragem. Este gene foi submetido à genotipagem também por meio da técnica de LIS-SSCP (figura-11)

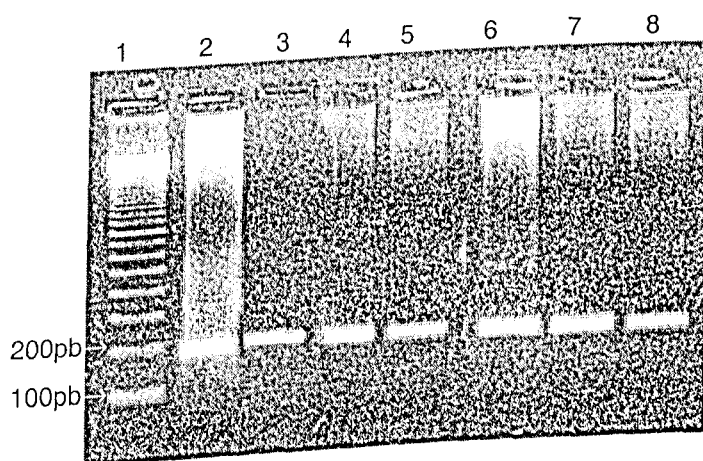


Figura: 9- Amplificação do fragmento de 223 pb do gene FVL.

Coluna 1- marcador de peso molecular de 100pb

Colunas 2 a 8- Fragmento de 223 pb do gene FVL.

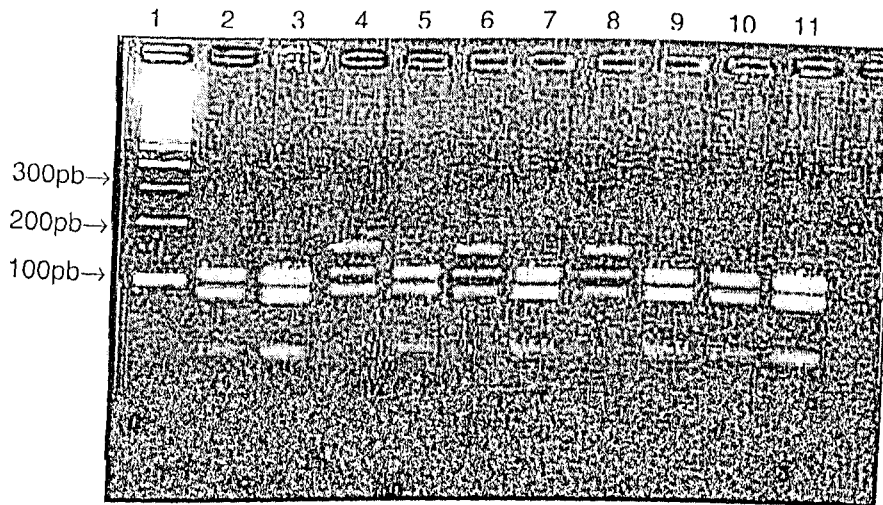


Figura: 10- Restrição enzimática do fragmento de 223pb do gene do FVL com a enzima *Mnl*I.

Coluna 1- marcador de peso molecular de 100pb.

Colunas 2,3,5,7, 9,10 e 11- bandas de 104, 82 e 37 pb representando os genótipos A2/A2 do gene do FVL.

Colunas 4, 6 e 8- bandas de 141,104, 82 e 37 pb representando os genótipos A2/A1.

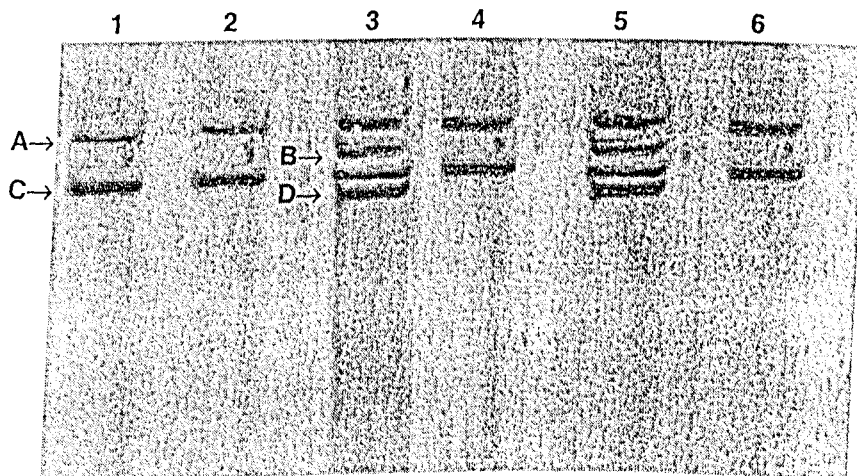


Figura: 11- LIS-SSCP do fragmento do gene FVL.

Colunas 1,2,4 e 6- indivíduos A2/A2 representados pelas bandas A e C.

Colunas 3 e 5- indivíduos A2/A1 representados pelas bandas A, B, C e D.

O gene da protrombina foi amplificado e genotipado por restrição enzimática com a enzima *Hind* III. A amplificação resultou em um fragmento de 345pb. Esperava-se encontrar os seguintes genótipos: G/G, G/A e A/A correspondentes à região 20210 deste gene, na qual ocorre uma substituição de G → A, porém por se tratar de uma variação rara só encontramos o genótipo G/G, que após restrição produziu um fragmento de 345 pb, uma vez que não possui sítio de restrição. A genotipagem deste gene foi feita também pela técnica de LIS-SSCP, mas nenhuma variação foi detectada neste fragmento. (figuras 12 e 13). Assim a freqüência gênica e alélica desse gene foi de 1, ou seja 100%.

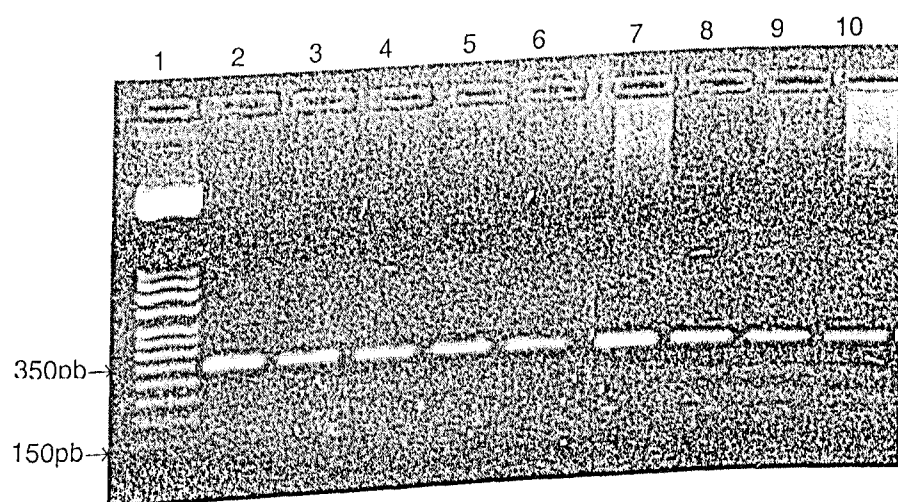


Figura: 12- Amplificação e restrição enzimática do fragmento de 345pb do gene da Protrombina.

Coluna 1- marcador de peso molecular de 50pb

Colunas 2 a 5 – fragmento amplificado com 345pb

Colunas 6 a 10- restrição enzimática com *Hind* III, banda de 345pb representando o genótipo normal G/G

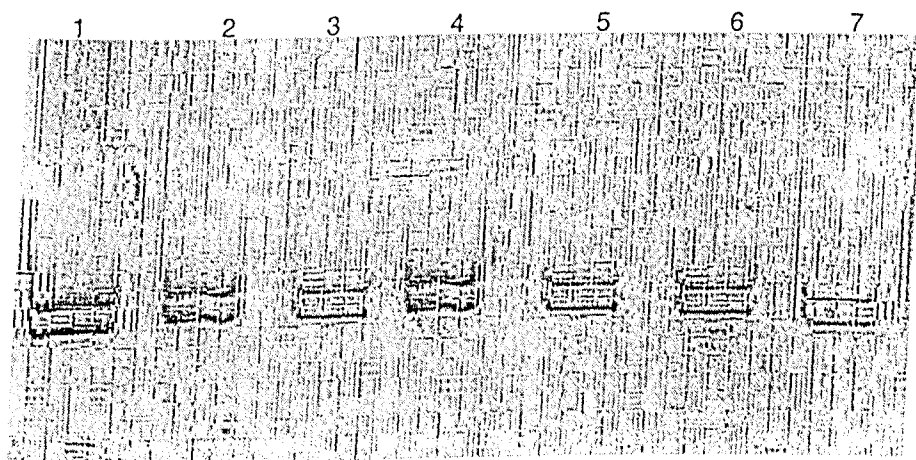


Figura: 13- LIS-SSCP do fragmento do gene da protrombina.
Colunas de 1 a 7- Padrão para o genótipo G/G.

As freqüências genóticas e gênicas de cada um dos genes em estudo foram calculadas (Tabela-2), porém não houve diferenças estatisticamente significativas quando se fez a comparação, por meio do teste t, do grupo de pacientes DHEG com as pacientes controle.

As freqüências de ocorrência do gene do AGT são muito variáveis, LIFTON *et al.* (1993) encontrou uma freqüência para os genótipos M/M, M/T e T/T de 2%, 28% e 70% em negros (afro-americanos) e em caucasianos as freqüências encontradas foram de 42%, 46% e 12% respectivamente. HEGELE *et al.* (1994) encontrou as seguintes freqüências na população européia: M/M, 33%; M/T, 52% e T/T, 15%. Portanto é necessário que se faça um estudo direcionado para se estabelecer as freqüências do AGT na população brasileira.

As freqüências encontradas para os genótipos da ECA, tanto no grupo de paciente DHGE quanto no grupo controle, estão muito próximas das estimadas para a população brasileira [I/I (0,2), I/D (0,4) e D/D (0,4)]. As freqüências para os alelos I e D também se aproximam das freqüências estimadas para a população brasileira em 0,4 e 0,6 respectivamente (INÁCIO, 1999).

A variante A1166C do AT1 apresentou uma freqüência inferior às encontradas por BONNARDEAUX *et al.* (1994) e WANG *et al.* (1997); eles

analisaram a presença do alelo C em caucasianos portadores de hipertensão e normotensos. As freqüências encontradas por esses autores foram de 0,36 *versus* 0,28 e de 0,40 *versus* 0,29 em hipertensos e normotensos respectivamente. Estudos da freqüência desse alelo associado à pré-eclâmpsia, especificamente, não foram encontrados na literatura.

A freqüência encontrada para o alelo A1 do FVL no grupo DHEG foi a mesma encontrada por O'SHAUGHNESSY *et al.*(1999) num estudo feito com 283 mulheres com pré-eclâmpsia, 5%, e a freqüência encontrada para o grupo controle foi, praticamente, a mesma da encontrada por FRANCO *et al.*(1995) para a população branca, 2,6%.

A variante G20210A da protrombina é de ocorrência rara e não foi detectada na população em estudo. FRANCO *et al* (1999) encontraram uma freqüência de 1% para o alelo A 20210 em 400 membros de uma população saudável.

Os dois grupos, pacientes DHEG e controle, foram subdivididos quanto ao genótipo do AGT, formando os subgrupos M/M, M/T e T/T com o objetivo de verificar se haviam interações específicas de genótipos desfavoráveis dos diversos genes analisados. Para cada um os novos grupos foram calculadas as freqüências associadas dos genótipos do FVL, ECA e AT1 (Tabela-3). Um dado interessante foi a observação de que a maioria dos indivíduos do grupo T/T estão associados aos genótipos I/D e D/D da ECA. Conforme descrito anteriormente, o genótipo T/T está relacionado à presença de concentrações mais elevadas de angiotensinogênio plasmático e a presença do alelo D está associada a níveis maiores da ECA. Assim há indícios de que os alelos T e D estão agindo sinergicamente no SRAA, um inibindo a manifestação do outro, ou seja, a alta concentração da ECA tem seu efeito mascarado pela presença de uma grande oferta de substrato. Deste modo, o que realmente estaria controlando o SRAA seriam apenas as quantidades iniciais de AGT e finais de angiotensina II produzida. Outra observação importante é que a mutação para o fator V de Leiden nos heterozigotos só é encontrada nos genótipos considerados normais para o angiotensinogênio (M/M e M/T). O mesmo pode ser inferido para a presença dos genótipos I/D e D/D da ECA dentro do genótipo M/M do AGT. Estas observações podem

mascarar o verdadeiro efeito dos genes, pois as frequências encontram-se desbalanceadas.

Tabela-2: Frequências genotípicas e gênicas dos genes do AGT, ECA, AT1 e do FVL nos grupos de pacientes DHEG e Controle.

Genes	Genótipo	Pacientes (DHEG)			Controles		
		nº	frq. Genotípica	frq. gênica	nº	frq. genotípica	frq. alélica
AGT	M/M	8	16%	48%	13	27,66%	60,64%
	M/T	32	64%		31	65,96%	
	T/T	10	20%	52%	3	6,38%	39,36%
Total		50	100%	100%	47	100,00%	100,00%
ECA	I/I	7	14%	38%	6	12,77%	34,04%
	I/D	24	48%		20	42,55%	
	D/D	19	38%	62%	21	44,68%	65,96%
Total		50	100%	100%	47	100,00%	100,00%
AT1	A/A	32	64%	79%	36	76,60%	86,18%
	A/C	15	30%		9	19,15%	
	C/C	3	6%	21%	2	4,25%	13,83%
Total		50		100%	47	100,00%	100,00%
FVL	A1/A1	0	0%	5%	0	0,00%	2,13%
	A1/A2	5	10%		2	4,25%	
	A2/A2	45	90%	95%	45	95,75%	97,87%
Total		50	100%	100%	47	100,00%	100,00%

Tabela-3: Freqüências genóticas e número de pacientes e controles encontrados para os genes do FVL, ECA e AT1 associados aos genótipos do AGT.

GENES	GENÓTIPOS	ANGIOTENSINOGENIO					
		M/M		M/T		T/T	
		Paciente	Controle	Paciente	Controle	Paciente	Controle
FVL	A1/A1	0,00 (8)	0,00 (13)	0,00 (32)	0,00 (31)	0,00 (10)	0,00 (3)
	A1/A2	0,375 (3)	0,00	0,06 (2)	0,06 (2)	0,00	0,00
	A2/A2	0,625 (5)	1,0 (13)	0,94(30)	0,94 (29)	1,0 (10)	1,0(3)
ECA	I/I	0,00	0,00	0,188 (6)	0,13 (4)	0,1 (1)	0,67 (2)
	I/D	0,625 (5)	0,54(7)	0,375 (12)	0,35 (11)	0,7 (7)	0,33 (1)
	D/D	0,375 (3)	0,46 (6)	0,437 (14)	0,5 (16)	0,2 (2)	0,00
AT1	A/A	0,625 (5)	0,92(12)	0,59 (19)	0,68 (21)	0,8 (8)	0,67 (2)
	A/C	0,375 (3)	0,08 (1)	0,34 (11)	0,26 (8)	0,1(1)	0,33 (1)
	C/C	0,00	0,00	0,06 (2)	0,06 (2)	0,1(1)	0,00

Além dos fatores genéticos foram estudados fatores de risco não genéticos. A Tabela-4 mostra a média de ocorrência dos fatores de risco na pré-eclâmpsia associadas aos genótipos do AGT, ECA, AT1 e FVL dentro de cada fator isoladamente. As médias de ocorrência dos fatores de risco foram analisadas pelo teste t e apenas as pressões arteriais sistólica e diastólica foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela -4. Médias obtidas para fatores de risco na pré-eclâmpsia associadas aos Genótipos específicos de quatro polimorfismos gênicos do Fator V de Leiden (FVL), Angiotensinogênio (AGT), Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) e Receptor 1 da Angiotensina II (AT1).

<u>Genes</u>	Número de Gestações (nº)					
	Homozigotos Normais		Heterozigotos		Homozigotos Mutantes	
	*PE	*C	*PE	*C	*PE	*C
FVL	2,311	2,2727	2,22	2	-	-
AGT	2,625	2,111	2,33	2,36	1,7	1,74
ECA	2,571	2,8	2,42	2,42	2,16	2,136
AT1	2,156	2,144	2,733	2,44	1,66	3,5
	*Pressão Arterial Sistêmica Sistólica (mmHg)					
FVL	164	110,6	157	-105	-	-
AGT	161,25	113,75	161,56	118,75	163,5	125
ECA	154,28	118	165,62	112,63	160,8	118
AT1	164,37	113,7	159,66	110	170	120
	*Pressão Arterial Sistêmica Diastólica (mmHg)					
FVL	107,3	68,66	105	65	-	-
AGT	106,25	81,4	107,65	81,61	107	77,5
ECA	106,42	95	104,79	64	105	78
AT1	105,31	70	109	70	120	70
	Idade média (anos)					
FVL	27,55	24,02	27,2	24	-	-
AGT	26,75	22	28,44	27,45	25,2	25,5
ECA	28,57	21,66	27,625	23,4	27	25,28
AT1	27	23,94	29	26,22	25,666	27,5
	Edema (% de pacientes afetadas)					
FVL	91%	54,54%	60%	100%	-	-
AGT	87,50%	50%	93,75%	93,70%	70%	50%
ECA	85,71%	33,33%	91,66%	55%	84,21%	61,90%
AT1	90,63%	58,33%	86,66%	44,40%	66,66%	50%

*PE- Pacientes com pré-eclâmpsia, *C- Controle

Nas Tabelas 5 e 6 encontram-se as estimativas de máxima verossimilhança, bem como os resultados dos testes de hipótese para a nulidade dos parâmetros, obtidos pelo Proc Logistic do SAS, considerando o modelo de regressão logística.

Observa-se na Tabela 5, que apenas o efeito aditivo do gene AGT foi significativo ($p < 0,0340$), desse modo um novo modelo, contendo apenas esse efeito, foi ajustado, para o qual as estimativas de máxima verossimilhança obtidas encontram-se apresentadas na Tabela 6. A estimativa do efeito aditivo do gene AGT ("odds ratio") na pré-eclâmpsia é igual a 2,161, podendo-se inferir que, uma mulher heterozigota M/T possui 2,16 mais chances de apresentar pré-eclâmpsia do que as homozigotas normais M/M. E que, as homozigotas para o alelo mutante T/T possuem 4,32 vezes mais chances de apresentar pré-eclâmpsia, quando comparadas com as homozigotas normais.

Tabela 5- Estimativas de máxima verossimilhança e teste de hipótese para a nulidade do parâmetro, para os genes AGT, ECA, AT1 e FVL, considerando os efeitos aditivos (β_1) e de dominância (β_2)

Genes	Parâmetro	Chi-quadrado De Wald	P-valor	Odds Ratio
AGT	β_1	4,4932	0,0340	2,327
	β_2	0,4824	0,4873	0,721
ECA	β_1	0,0231	0,8792	0,951
	β_2	0,3762	0,5397	1,314
AT1	β_1	0,3068	0,5796	1,299
	β_2	0,3360	0,5622	1,443
FVL	β_1	1,1278	0,2882	2,500
	β_2	-	-	-

Tabela 6 Estimativas de máxima verossimilhança e teste de hipótese para a nulidade do parâmetro, para o gene AGT, considerando apenas o efeito aditivo do mesmo.

Gene	Parâmetro	Chi-quadrado De Wald	P-valor	Odds Ratio
AGT	β_1	4,2940	0,0382	2,161

A análise dos genótipos do angiotensinogênio (AGT), da enzima conversora de angiotensina I (ECA), do receptor I de angiotensina II (AT1) e do fator V de Leiden (FVL) associados à pré-eclâmpsia e aos fatores de risco não genéticos (idade, nº de gestações e pressão arterial sistêmica) foi feita por meio de correlações canônicas (Tabela-7).

Ao correlacionar a condição de pré-eclâmpsia isoladamente, com cada um dos genótipos em estudo, observamos que existe uma correlação significativa somente com o gene do AGT ($R=0,21 - p < 0,035$) e quando incluímos o gene do FVL ocorre um discreto aumento da correlação ($R=0,26 - p < 0,035$). Os demais genes não alteram o valor da associação.

Embora fosse esperado encontrar uma associação positiva da pré-eclâmpsia com os demais genes do SRAA, isto não ocorreu na população em estudo. Observou-se que o AGT, o precursor desta via, parece regular os passos subseqüentes do metabolismo, exercendo uma função principal no processo que leva à formação da angiotensina II. Na presença da variante 235T os níveis médios de angiotensinogênio produzido são maiores, e a renina parece clivar todo esse AGT. Conseqüentemente, há uma maior formação de angiotensina I e a ECA irá agir degradando todo este substrato, independente do polimorfismo I/D.

O grupo de fatores não genéticos, em conjunto, possui uma alta correlação com a condição de pré-eclâmpsia ($R=0,8348 - p < 0,0001$). Quando comparados isoladamente cada um contribui com sua parcela significativamente, exceto a raça e o número de gestações (Tabela-7).

Para cada grupo foi calculada a média de ocorrência dos fatores genéticos e não genéticos (Tabela-8). No grupo de pacientes foram obtidas médias maiores e estatisticamente significativas ($p < 0,05$), ou seja, tanto os fatores genéticos quanto

os não genéticos estão influenciando na manifestação da pré-eclâmpsia, dentro do grupo de pacientes.

Tabela-7: Análise de correlações canônicas (CR) para os fatores de risco genéticos e não genéticos quanto à ocorrência da pré-eclâmpsia.

	Chi-Quadrado	P- valor	CR
PE x AGT	4,4304	0,03531	0,21513
PE x FV	1,2231	0,26718	0,11437
PE x AGT+FV	6,6809	0,03543	0,26328
PE x ECA	0,28533	0,5932	0,05519
PE x AT1	1,2346	0,26651	0,11453
PE x AGT+FV+ECA+AT1	7,28887	0,12416	0,27598
PE x nG	0,231	0,630	0,0497
PE x Id	6,0471	0,01393	0,25
PE x Ed	24,70294	0,0000007	0,481852
PE x PASs	94,92	0,00000...1	0,7985
PE x PASd	86,84	0,00000...1	0,777
PE x raça	1,2649	0,260	0,1159
PE nG+Id+PASs+PASd + raça	108,65	0,00000...1	0,83486

Valores significativos quando $p < 0,05$.

*PE- pré-eclâmpsia, nG- número de gestações, Id- idade, Ed- edema; PASs e PASd- pressão arterial sistêmica sistólica e diastólica.

SISBI/UFU
202348

Tabela-8 Média dos fatores de risco genéticos e não genéticos envolvidos na predisposição à pré-eclâmpsia nos grupos de pacientes e controle.

	Fatores genéticos*	Fatores não genéticos*
Pacientes	2,16 a	2,4 a
Controles	1,86 b	0,89 b

* Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente diferentes no nível de 5%, segundo o teste t student.

A associação positiva com os fatores de risco não genéticos, exceto raça e número de gestações, demonstra que eles são responsáveis por uma parcela significativa no desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Embora o fator genético contribua, a presença de condições favoráveis para o desencadear de uma doença, como má alimentação, falta de exercícios físicos, maus hábitos de higiene, falta de assistência médica, estabilidade emocional e financeira, etc; é que provocará a manifestação do fator genético desfavorável e, mesmo na sua ausência, esse ambiente promove outras alterações fisiológicas que culminam na manifestação da patologia.

5-Conclusões:

No grupo em estudo observamos que os fatores genéticos analisados são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos de manifestação da pré-eclâmpsia, os 80% restantes são resultantes de fatores não genéticos. Portanto, mulheres com gravidez em idade tardia ou precoce, hipertensas e com presença de edema, mesmo sem nenhuma predisposição genética, têm grandes chances de desenvolver pré-eclâmpsia.

Dentre os polimorfismos estudados a variante M235T do AGT foi única que apresentou uma correlação estatisticamente significativa com a manifestação da pré-eclâmpsia ($R= 0,21$ $p< 0,035$), com um pequeno efeito aditivo do Fator V de Leiden ($R=0,26$ $p< 0,035$). O gene do AGT possui um efeito aditivo. Mulheres portadoras do alelo 235T (heterozigotas) têm um risco 2,16 vezes maior de desenvolver pré-eclâmpsia quando comparadas a mulheres homozigotas para o alelo M235. Mulheres homozigotas para o alelo mutante T possuem um risco de 4,3 vezes maior.

Estes resultados têm uma importância significativa para o diagnóstico precoce e para a prevenção da pré-eclâmpsia. O perfil obtido é suficiente para sugerir uma terapêutica preventiva às mulheres grávidas que apresentem predisposição genética, ao desenvolvimento da pré-eclâmpsia, evitando assim a morbi-mortalidade materno-fetal.

6-Referências Bibliográficas:

ALEXANDER, B., MEYER, L., KENNY, J., *et al.* Blood coagulation in pregnancy: proconverting and prothrombin, and the hypercoagulable state. **N. Engl. J. Med.** 254: 358-363,1956.

ARNGRIMSSON R, PURANDARE S, CONNOR M, *et al.* Angiotensinogen: a candidate gene involved in preeclampsia. **Nature Genetics.** 4:114-115, 1993.

BALLEGEER VC, SPITZ B, DE BAENE LA, VAN ASSCHE AF, HIDAJAT M, CRIEL AM: Platelet activation and vascular damage in gestational hypertension. **Am J Obstet Gynecol** 166:629-633,1992.

.BONNARDEAUX, A.; DAVIES, E.; JEUNEMAITRE, X.; FERY, I.; CHARRU, A.; CLAUSER, E.;TIRET, L.; CAMBIEN, F.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. : Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. **Hypertension** 24: 63-69, 1994.

BROUGHT PIPKIN F.: What is the place of genetics in the pathogenesis of pre-eclampsia? **Biol Neonate** 76 (6):325-30,1999.

DOBSON, A, J. **An Introduction to Generalized Linear Models.** London: Chapman and Hall, 1990, 174p.

FRANCO, R. F.; TRIP, M. D.; TEN CATE, H.; VAN DEN ENDE, A.; PRINS, M. H.; KASTELEIN, J. J. P.; REITSMA,P. H. : The 20210G-A mutation in the 3-prime-untranslated region of the prothrombin gene and the risk for arterial thrombotic disease. **Brit. J. Haemat.** 104: 50-54, 1999.

FRANCO, R. F.; ELION, J.;SANTOS,S.E.B.; ARAÚJO, A. G.; TAVELLA,M.H.;ZAGO, A M.:Heterogeneous ethnic distribution of the Factor V Leiden mutation. **Genet. Mol. Biol.**22(2):143-145, 1999.

FROSSARD, P.M.; HILL, S. H. ;ELSHAHAT, Y.I.; OBINECHE, E. N.; BOKHARI, A M.; LESTRINGANT, G. G.; JOHN, A ; ABDULLE, A M.: Association of angiotensinogen gene mutation with hypertension and myocardial infarction in a gulf population. **Clin. Genet.** 54:285-293,1998.

GARCIA-GALA J. M., ALVAREZ V., PINTO C. R., *et al.*: Factor V de Leiden (R 506 Q) and Risk of Venous Thromboembolism: a case-controlle study based on the Spanish population. **Clin.Genet.** 52:206-210, 1997.

GARDEMAN A, WEIB T, SCHWARTZ, *et al.* - Gene polymorphism but not catalytic activity of angiotensin I-converting enzyme is associated with coronary artery disease and myocardial infarction in low-risk patients. **Circulation** 92(10): 2796-99, 1995.

GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; D'ANDREA, G.;CAPPUCINI, G.; BRANCACCIO, V.; DI MINNO, G.: Genetic susceptibility to pregnancy-related venous thromboembolism: Roles of Factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations. **Am. J.Obstet. Gynecol** 178 (5):1324-1328, 1998.

HEGELE, R. A., BRUNT, J. H., CONNELLY, P. W. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variantion in blood pressure on a genetic isolate. **Circulation** 90: 2207-2212, 1994.

INÁCIO, J. :Marcadores moleculares associados ao infarto agudo do miocárdio. Tese, **Universidade Federal de Uberlândia**, 1999.

INOUE I., ROHRWASSER A., HELIN C., JEUNEMAITRE X., *et al.* A mutation of angiotensinogen in a patient with preeclampsia leads to altered kinetics of the renin- angiotensin system. **J. Biol. Chem.** 270: 11430-11436, 1995.

JEFF, P.G; AKEMI, J.Y.; WAYNE, W.G.: Prevalence of the Factor V - Leiden Mutation in Four Distinct American Ethnic Populations. **Am. J. Med Genet.** 73:334-336, 1997.

JEUNEMAITRE X., SOUBRIER F., KOTELEVTSSEV Y. V., *et al.* Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. **Cell.** 71: 169-180, 1992.

KONIJNENBERG A, STOKKERS EW, VAN DER POST JA, SCHAAP MC, BOER K, BLEKER OP, STURK A. Extensive platelet activation in preeclampsia compared with normal pregnancy: enhanced expression of cell adhesion molecules. **Am J Obstet & Gynecol.** 176:461-469. 1997

LIFTON, R. P.; WARNOCK, D. ; ACTON, R.T.; HARMAN, L.; LALOUEL, J.M. : High prevalence of hypertension-associated angiotensinogen variant T235 in African Americans. **Clin. Res.** 260A, 1993.

LINDOFF, C., INGEMARSSON, I., MARTINSSON, G., *et al.* Preeclampsia is associated with a reduced response to activated protein C. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 176:457-460, 1997.

MATHER, K. JINKS, J.L. **Introdução à Genética Biométrica.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1984, 242p.

MITCH W.E - Is the inherited ACE genotype a trump or a joker? **J Clin Invest** 96: 2100-1, 1995

NAKAI, K., ITOH, C., MIURA, Y., HOTTA, K., *et al.* Deletion polymorphism of the angiotensin I- converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. **Circulation.** 90: 2199-2202, 1994.

NORRIS LA, GLEESON N, SHEPPARD BL, BONNAR J: Whole blood palletelet aggregation in moderate and severe pre-eclampsia. **British J Obstet Gynaecol.** 100:684-688, 1993.

O`SHAUGHNESSY, K. M.; FU,B.;F.; FERRARO,F.;LEWIS,I., DOWNING,S.; MORRIS,N.H.: Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in East Anglian preeclampsia cohort. **Hypertension.**33:1338-1341, 1999.

POORT, S. R.; ROSENDALL, F. R.; REITSMA, P. H., BERTINA, R. M.: A common genetic variation in 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. **Blood** 88 :3698-703, 1996.

REDMAN CWG, BONNAR J, BEILIN L. Early platelet consumption in pre-eclampsia. **Br Med J.** 1:467-469, 1978.

RIGAT, B., HUBERT, C., ALHENE-GELA, F., CAMBIEN, F., CORVOL, P., SOUBRIER, F. An insertion/ deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accouting for half the variance of serum enzyme level. **J. Clin. Invest.** 86: 1343-1346, 1990.

RIGAT B., HUBERT C., CORVOL P., SOUBRIER F. -PCR detection of the insertion/delection polymorphism of the human angiotensin i converting enzyme gene (DCPI). **Nucleic Acids Res** 20:1433, 1992.

RUSS, A. P.; MAERZ, W.; RUZICKA, V.; STEIN, U.; Gross,W.: Rapid detection of the hypertension-associated met235-to-thr allele of the human angiotensinogen gene. **Human. Molec. Genet.** 2:609-610, 1993.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANITIS, T - **Molecular cloning.** 2nd ed.. Cold Spring, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, E.U.A., 1989. 3 vols.

SINGER D, MISSOURIS C, JEFFERY S - Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. What to do about all the confusion? **Circulation** 94: 236-9, 1996.

STUBBS TM, LAZARCHICK J, VAN DORSTEN P, COX J, LOADHOLT B: Evidence of accelerated platelet production and consumption in nonthrombocytopenic pre-eclampsia. **Am J Obstet Gynecol** 155:263,1986.

TEO KK - Angiotensin-converting enzyme genotypes and disease. **B M J** 311: 763-4, 1995.

TIRET, L., RIGAT, B., VISVIKIS, S., *et al.* Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. **Am. J. Hum. Genet.** 51: 197-205, 1992.

WANG, W. Y. S.; ZEE, R. Y. L.; MORRIS, B. J. : Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. **Clin. Genet.** 51: 31-34, 1997.

WEINER, C. P. Thrombotic microangiopathy in pregnancy and the postpartum period. **Semin. Hematol.** 24: 119-129, 1987.

WEINER CP: Clotting alterations associated with the pre-eclampsia/eclampsia syndrome. In: **Handbook of Hypertension** Vol 10: Hypertension in Pregnancy, edited by PC Rubin, 1988. Elsevier, Amsterdam.

Anexo I**Termo de consentimento**

O Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) está realizando um estudo genético relacionado às possíveis causas que possam atuar como fator de risco, levando ao quadro de pré-eclâmpsia ou doença hipertensiva exclusiva da gravidez (DHEG). Este estudo esta sob a coordenação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e co-orientação do Prof. Dr. Renato Enrique Sologuren Achá , juntamente com a aluna de mestrado em Genética e Bioquímica (UFU) Elisângela Rosa da Silva.

O projeto consiste no estudo da variante M235T do gene do angiotensinogênio, do polimorfismo de deleção/ inserção do gene da enzima conversora de angiotensina (ECA), que fazem parte do sistema renina- angiotensina responsável pelo equilíbrio homeostático e regulação da pressão arterial, e também do gene do fator V de Leiden, o qual apresenta uma mutação no códon 506, resultando em maior propensão à trombose.

Para detectar as possíveis mutações existentes nesses genes, serão necessárias análises de DNA a partir de sangue periférico de mulheres grávidas portadoras de DHEG leve e severa e de grávidas normais, para que se possa comparar os genótipos das mesmas e verificar se a presença dessas mutações correlacionam-se ao desenvolvimento da patologia.

Na realização do diagnóstico molecular, serão necessárias coletas de 15 ml de sangue periférico de cada paciente. Para tal, utilizar-se-á seringas descartáveis, evitando qualquer risco de contaminação por doenças infecciosas ou virótica que sejam transmitidas pelo sangue. O material biológico, sangue periférico, será enviado para o Laboratório de Genética Molecular da UFU, onde serão realizados os testes moleculares. Mediante consentimento do paciente, os resultados serão apresentados sob anonimato em futuras publicações científicas e também estarão à disposição de cada paciente que os deseje conhecer no citado laboratório.

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja prejuízo próprio.

Pelos termos apresentados por esse documento,

Eu _____

Concordo em colaborar com a pesquisa, declarando estar ciente dos riscos benefícios e direitos.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha

Uberlândia,

de

de 2000

Anexo II

Tabela com os fatores de risco genéticos no FVL e SRAA.

Pacientes	FVL	AGT	ECA	ATI
A-1	0	1	1	0
M-2	0	1	1	1
C-3	0	2	1	2
D-4	0	1	0	1
T-5	0	1	2	0
G-6	0	1	1	1
C-7	0	2	2	0
V-8	0	2	1	1
H-9	0	1	2	0
L-10	0	1	0	1
N-11	0	2	0	0
A-12	1	1	1	0
S-13	0	2	1	0
J-14	0	2	1	0
E-15	0	2	1	0
M-16	0	1	1	0
K-17	0	2	2	0
A-18	0	1	2	0
R-19	0	1	1	0
A-20	0	1	1	0
R-21	0	1	2	0
C-22	0	1	1	0
M-23	0	1	2	0
D-24	0	1	1	2
S-25	1	1	2	1
D-26	0	1	2	0
T-27	0	0	1	1
A-28	0	1	2	1
S-29	1	0	2	1
E-30	0	1	0	2
E-31	0	1	0	0
I-32	0	1	2	0
H-33	0	1	2	1
M-34	0	1	1	0
R-35	0	1	2	1
M-36	0	1	2	1
M-37	0	1	0	0
R-38	0	1	2	1
R-39	0	1	2	0
V-40	1	0	2	0
L-41	0	0	1	0
C-42	0	0	1	0
L-43	0	0	2	0
E-44	0	2	1	0
S-45	0	2	1	0
A-46	0	1	1	0
M-47	0	1	1	1
D-48i	1	0	1	1
L-49	0	0	1	0
M-50	0	1	1	0

Controles	FVL	AGT	ECA	ATI
M-51	0	1	1	2
S-52	0	1	2	0
D-53	0	0	1	0
T-54	0	1	2	0
O-55	1	1	0	0
R-56	0	1	1	0
D-57	0	1	1	1
A-58	0	1	1	0
N-59	0	0	2	0
T-60	0	1	2	0
C-61	0	0	1	0
M-62	0	2	1	0
M-63	0	1	2	0
K-64	0	1	2	0
A-65	0	1	2	0
C-66	0	1	1	0
N-67	0	1	2	1
G-68	0	1	0	1
A-69	0	2	0	0
T-70	0	1	2	2
L-71	0	0	1	0
E-72	0	1	1	1
M-73	0	0	2	0
S-74	0	1	0	0
A-75	0	1	1	0
C-76	0	1	1	0
A-77	0	1	2	1
E-78	0	1	2	1
E-79	0	1	2	0
L-80	1	1	2	0
R-81	0	1	1	1
A-82	0	0	1	0
A-83	0	0	1	0
K-84	0	1	2	0
M-85	0	0	1	0
LT-86	0	0	1	0
M-87	0	1	2	0
E-88	0	1	2	1
L-89	0	2	0	1
L-90	0	1	1	0
FI-91	0	0	1	0
J-92	0	0	2	0
D-93	0	1	1	0
S-94	0	1	0	0
E-95	0	0	2	0
M-96	0	0	2	0
L-97	0	1	2	0

Os números 0, 1 e 2 correspondem aos genótipos de cada gene. Todos os genótipos homocigotos normais estão representados pelo nº 0, os heterocigotos pelo nº 1 e os homocigotos mutantes pelo nº 2.