

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Estudo dos polimorfismos do gene da adiponectina
em mulheres com hipertensão gestacional e pré-
eclâmpsia

Jackeline de Souza Rangel Machado

Ribeirão Preto-SP
2012

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Estudo dos polimorfismos do gene da adiponectina
em mulheres com hipertensão gestacional e pré-
eclâmpsia.

Jackeline de Souza Rangel Machado

Pró-forma da Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e
Obstetrícia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
como pré-requisito para a obtenção do título de
Mestre em Reprodução Humana

Área de Concentração: Ginecologia e
Obstetrícia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Carvalho
Cavalli

Ribeirão Preto
2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Machado, Jackeline de Souza Rangel

Estudo dos polimorfismos do gene ADIPOQ da adiponectina em mulheres com hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia. Ribeirão Preto, 2012.

86p. il.; 30cm

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

Orientador: Cavalli, Ricardo C.

1. Adiponectina. 2. Polimorfismos. 3. Pré-eclâmpsia.
4. Hipertensão arterial gestacional.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jackeline de Souza Rangel Machado

Polimorfismos do gene da adiponectina: associação com o desenvolvimento de hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Reprodução Humana
Área de concentração: Ginecologia e
Obstetrícia**

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a meus pais que sempre lutaram para que seus filhos adquirissem uma das maiores riquezas do mundo “o conhecimento” e mantiveram nossa família sempre unida. A meus irmãos por me apoiarem, a minha avó Dulce, que embora não esteja mais aqui sempre estará me protegendo, e em especial Ana Carolina e a Lorena por compartilharem seu conhecimento, por sua amizade, apoio e compreensão durante essa jornada, tornando possível a conclusão desse trabalho.

Agradecimentos

Apreendi que nada na vida se conquista sem esforço e determinação, certamente a conclusão deste trabalho exigiu muito dos dois, mas acima de tudo só foi possível graças ao apoio, incentivo e solidariedade de muitos, e a eles gostaria de demonstrar toda minha gratidão.

“Acima de tudo, na vida, temos necessidade de alguém que nos obrigue a realizar aquilo de que somos capazes. É este o papel da amizade.”

Ralph Waldo Emerson

Agradeço a minha família por estar sempre ao meu lado me amando, apoiando e me fortalecendo, tudo que sou hoje devo a vocês.

A meus amigos que me ajudaram a manter a sanidade e alegria.

As minhas amigas Lorena e Ana Carolina que sempre foram um exemplo a ser seguido, por sua determinação, competência, inteligência, profissionalismo, por sempre estar ao meu lado, me ensinando, incentivando, por me ajudar todos os dias com meu trabalho e principalmente e por sua fé em mim.

A Ana Carolina Bueno, pela paciência, atenção e por compartilhar seu conhecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli, que confiou em minha capacidade desde o início, por me dar a oportunidade de crescer como profissional e como pessoa.

A todos do Laboratório de Farmacologia principalmente ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos santos.

A todos do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia por serem sempre muito competentes e atenciosos, principalmente a Suelen.

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

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito, não somos o que deveríamos ser e não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos."

Martin Luther King

Resumo

Resumo

Machado, J. S. R. **Estudo dos polimorfismos do gene da adiponectina em mulheres com hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Introdução: a adiponectina está envolvida na homeostase energética, através da regulação do metabolismo glicídico e lipídico. Adicionalmente, apresenta propriedades anti-inflamatórias e antiateroscleróticas. Polimorfismos no gene da adiponectina (ADIPOQ) podem modular as concentrações de adiponectina. A influência desses polimorfismos no desenvolvimento da hipertensão gestacional (HAG) e da pré-eclâmpsia (PE) é desconhecida.

Objetivo: o objetivo deste trabalho foi analisar a influência dos polimorfismos no gene ADIPOQ sobre o desenvolvimento da hipertensão gestacional e da pré-eclâmpsia.

Pacientes e métodos: Foram estudadas 401 gestantes sendo 161 grávidas saudáveis (GS), 113 com HAG e 127 com PE. Os polimorfismos do gene *ADIPOQ* -11391G>A (rs17300539), -11377C>G (rs266729), 45T>G (rs2241766) e 276G>T (rs1501299) foram genotipados através de discriminação alélica por reação de PCR em tempo real. Os haplótipos foram inferidos através do programa PHASE 2.1.

Resultados: não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados. Na análise dos haplótipos, observamos pequenas diferenças nas frequências haplotípicas entre os grupos estudados, no entanto, nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

Conclusão: Não encontramos nenhuma associação entre as variantes genotípicas e alélicas dos polimorfismos no gene *ADIPOQ* com o desenvolvimento de hipertensão arterial gestacional e pré-eclâmpsia.

Palavras-chave: Hipertensão Gestacional; Pré-eclâmpsia; Adiponectina; Polimorfismo.

Abstract

Abstract

Machado, J. S. R. **Study of polymorphisms of the adiponectin gene in women with gestational hypertension and preeclampsia.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Introduction: adiponectin is involved in energy homeostasis by regulating glucose and lipid metabolism. Additionally, it presents anti-inflammatory and anti-atherosclerotic functions. Polymorphisms in adiponectin gene (ADIPOQ) can modulate the concentrations of adiponectin. The influence of these polymorphisms on the development of gestational hypertension (GH) and preeclampsia (PE) is unknown.

Aim: The aim of this work was to examine the influence of polymorphisms in the gene ADIPOQ on the development of gestational hypertension and preeclampsia.

Patients and Methods: we studied 401 pregnant women: 161 healthy pregnant (HP), 113 pregnant with gestational hypertension (GH) and 127 pregnant with preeclampsia (PE). Polymorphisms ADIPOQ -11391G>A (rs17300539), -11377C>G (rs266729), 45T>G (rs2241766) and 276G>T (rs1501299) were genotyped by allelic discrimination by PCR in real time. Haplotypes were inferred using the PHASE 2.1 program.

Results: there were no statistically significant differences in allele and genotype frequencies of the polymorphisms studied. In the analysis of haplotypes, we observed small differences in haplotype frequencies between groups, however, none of these differences was statistically significant ($P > 0.05$).

Conclusion: we found no association between the genotypic and allelic variants of the ADIPOQ gene polymorphisms with the development of gestational hypertension and preeclampsia.

Keywords: Gestational hypertension, preeclampsia; Adiponectin; Polymorphism.

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS.

% - porcentagem

ANOVA – análise de variância

OR- Odds ratio

DPM- Desvio padrão da media

DHG- Doenças hipertensivas gestacionais

GS- Gestantes saudáveis

HAG- Hipertensão arterial gestacional

PE- Pré-eclâmpsia

CT – controle

DC – debito cardíaco

DCV – doenças cardiovasculares

DNA – acido desoxirribonucleico

EDTA – acido etileno diamino tetra acético

eNOS – sintase endotelial do oxido nítrico

FC – frequência cardíaca

HAP – haplótipo

HCl – acido clorídrico

HT - hipertensão

IMC – índice de massa corpórea

mmHg – milímetros de mercúrio

NaOH – hidróxido de sódio

NO – oxido nítrico

EROS- espécies reativas do oxigênio

NOx – espécies relacionadas ao oxido nítrico

NF-κB- fator nuclear *Kappa B*

NS – não significativo

NT – normotenso

HA– hipertensão arterial

HAS-hipertensao arterial sistêmica

PA – pressão arterial

PAD – pressão sanguínea diastólica

PAS – pressão sanguínea sistólica

PCR – reação em cadeia da polimerase

rpm – rotações por minuto

RVP – resistência vascular periférica

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

TE – tris-acido etileno diamino tetra acético

HLA-G- antígeno de histocompatibilidade

TNF- alfa- fator de necrose tumoral

IL-6- interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

SM - Síndrome Metabólica

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da fisiopatologia da pré-eclâmpsia....	27
Figura 2 - Ações anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas da adiponectina.....	30
Figura 3 - Eventos de sinalização intracelular que medeiam as ações da adiponectina nas células endoteliais.....	33
Figura 4 - Representação esquemática do gene ADIPOQ.....	35

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Identificação e localização dos polimorfismos do gene <i>ADIPOQ</i> estudados e códigos dos respectivos ensaios para a discriminação alélica por PCR em tempo real.....	45
Tabela 2 - Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados.....	49
Tabela 3 - Equilíbrio de Hardy- Weinberg.....	51
Tabela 4 - Frequências genótípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia.....	52
Tabela 5 - Frequência de haplótipos estimados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia.....	53
Tabela 6 - Características clínicas e laboratoriais das gestantes brancas.....	55
Tabela 7 - Frequências genótípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia das gestantes brancas.....	56
Tabela 8 - Características clínicas e laboratoriais das gestantes com IMC>30.....	57
Tabela 9 - Frequências genótípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia das gestantes com IMC>30.....	58
Tabela 10 - Características clínicas e laboratoriais das gestantes com IMC<30	60
Tabela 11 - Frequências genótípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia das gestantes com IMC<30.....	61

Sumário

Sumário

1. Introdução.....	24
1.1 - Alterações fisiológicas da gestação.....	24
1.2 - Relevância das doenças hipertensivas gestacionais.....	25
1.3 - Fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	26
1.4 - Adiponectina.....	31
1.5 - Polimorfismos no gene ADIPOQ.....	33
2. Justificativa.....	35
3. Hipótese.....	37
4. Objetivos.....	39
5. Pacientes e métodos.....	41
5.1 - Seleção das participantes.....	41
5.1.2 - Critérios de inclusão.....	41
5.1.3 - Critérios de exclusão.....	42
5.2 Métodos.....	42
5.2.1 - Coleta e processamento das amostras	42
5.2.2 - Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais.....	42
5.2.3 - Extração do DNA genômico.....	36
5.2.4 - Genotipagens.....	44
5.2.5 - Variáveis genotípicas.....	45
5.2.6 - Análise estatística.....	46
5.3 Considerações Éticas	46
6. Resultados.....	48
6.1 - Gestantes brancas.....	54
6.2 – Gestantes com IMC>30.....	57
6.3 – Gestantes com IMC<30.....	60
7. Discussão.....	64
8. Conclusão.....	71
9. Referencias bibliográficas.....	73
Anexo	
Anexo – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	84
Anexo – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	85

Introdução

1.0 Introdução

1.1 Alterações fisiológicas da gestação

Durante a gestação normal são observadas diversas adaptações cardiovasculares na gestante que permitem o suprimento constante de nutrientes e metabólitos ao feto, sem comprometer as necessidades maternas. Estas alterações são resultantes de interações complexas entre hormônios, substâncias vasoativas e vários outros fatores (Pridjian, G. and J. B. Puschett 2002) . A gravidez é acompanhada por aumento de todos os fluidos corporais, inclusive do volume sanguíneo (VS) na magnitude de 40-50% (Hyttén, F. E. and D. B. Paintin 1963; Rovinsky, J. J. and H. Jaffin. 1965). A frequência cardíaca (FC) também apresenta elevações de 22-26% (Clapp, J. F. and E. Capeless. 1997) . Como o débito cardíaco (DC) é resultado do produto da FC x VS, o mesmo também está aumentado em aproximadamente 30-50% (Robson, S. C. et al. 1989), fato esse de extrema importância que permite fluxo constante e flexível conforme as necessidades do feto, além de suprir as necessidades maternas. A partir destas alterações hemodinâmicas, poderíamos esperar um aumento da pressão sanguínea durante a gravidez. No entanto o contrário é observado, ou seja, uma gravidez normal é caracterizada por diminuições da pressão sanguínea sistólica e diastólica até a 16^o e 20^o semana de gestação (MacGillivray, I. et al. 1969; Page, E. W. and R. Christianson. 1976). Esta redução nos níveis pressóricos deve-se a diminuição significativa da resistência vascular periférica secundariamente à vasodilatação, redução da resposta aos vasoconstritores e angiogênese (Chesley, L. C. et al. 1965; Gant, N. F. et al. 1974).

Entretanto, em algumas mulheres a gravidez não é acompanhada por estas alterações hemodinâmicas que permitem a acomodação do volume circulante e conseqüente decréscimo da pressão sanguínea. Nestas mulheres, após a 20ª semana de gestação, é possível a detecção de hipertensão caracterizada por pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica ≥ 90 mmHg em duas tomadas de pressão, com intervalo de 4h, em repouso. Nos casos onde a hipertensão é acompanhada por proteinúria (maior que 0,3 g/L em urina 24 horas), temos o diagnóstico de pré-eclâmpsia (PE). A hipertensão arterial gestacional (HAG) é diagnosticada quando ao quadro de hipertensão não se associa proteinúria significativa. É importante ressaltar que mulheres com HAG e PE não apresentam manifestações hipertensivas antes da gestação (Pridjian, G. and J. B. Puschett 2002) .

1.2 Relevância das doenças hipertensivas gestacionais

O aumento da pressão sanguínea em gestantes tem efeitos deletérios sobre diversos sistemas, principalmente vascular, hepático, renal e cerebral. Todas as complicações observadas nestes sistemas podem explicar a alta morbimortalidade materna e perinatal em mulheres com PE e HAG, fazendo destas patologias as principais causas de morte materna no Brasil e no mundo (Saftlas, A. F. et al. 1990; Laurenti, R. et al. 2004). A incidência mundial de PE de 2-10% das gestações (World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. 1988; Gaio, D.S. et al. 2001). É interessante ressaltar que existem alguns fatores de risco que aumentam a probabilidade de uma gestante apresentar PE, tais como hipertensão e diabetes pré-existentes, obesidade e etnia.

1.3 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

Embora a fisiopatologia da pré-eclâmpsia não tenha sido totalmente elucidada, fatores como predisposição genética e desordens imunológicas que resultam em isquemia placentária e lesão endotelial, além de falha da placentação, são amplamente aceitos, sendo a isquemia placentária considerada um fator primordial para o desenvolvimento da doença (Brosens I.A et al. 1972). Porém, acredita-se que a PE seja uma doença multifatorial, exigindo que os estudos sejam cada vez mais abrangentes.

Como citado anteriormente, a redução na perfusão placentária tem sido aventada como um fator primordial para desenvolvimento da PE (figura 1). No início do segundo trimestre da gestação normal (18-20 semanas), instala-se um processo referido como “pseudovasculogênese”, caracterizado pela migração das células do citotrofoblasto em direção as arteríolas uterinas espiraladas, onde sofrem diferenciação em células com fenótipo endotelial. Nesse processo, ocorre remodelação gradual da camada endotelial destes vasos e destruição do tecido elástico-muscular das artérias e arteríolas, tornando-as mais dilatadas (Lyll, Bulmer et al. 1999; Redman and Sargent 2005). Esta migração/diferenciação das células do citotrofoblasto é consequente às alterações nos perfis de expressão de certas citocinas, moléculas de adesão, constituintes da matrix extracelular, metaloproteinases e dos antígenos de histocompatibilidade (HLA-G) (Roberts, Taylor et al. 1991). Todas essas ações citotrofoblásticas que culminam com o aumento do calibre das arteríolas espiraladas asseguram suprimento sanguíneo adequado ao crescimento fetal (Lyll, Bulmer et al. 1999).

Parece que na PE ocorre ausência ou diminuição da invasão trofoblástica, levando a modificação incompleta das artérias espiraladas maternas e, conseqüentemente, à redução da perfusão sanguínea placentária (Roberts, Taylor et al. 1991; Redman and Sargent 2005) e suas conseqüências malélicas.

A demanda placentária necessária para corrigir o suprimento sanguíneo inadequado ao feto é muito maior, comprometendo a irrigação dos órgãos maternos. Nesse estágio, a síndrome torna-se sistêmica e afeta múltiplos órgãos, com presença de edema generalizado (Roberts, Taylor et al. 1991).

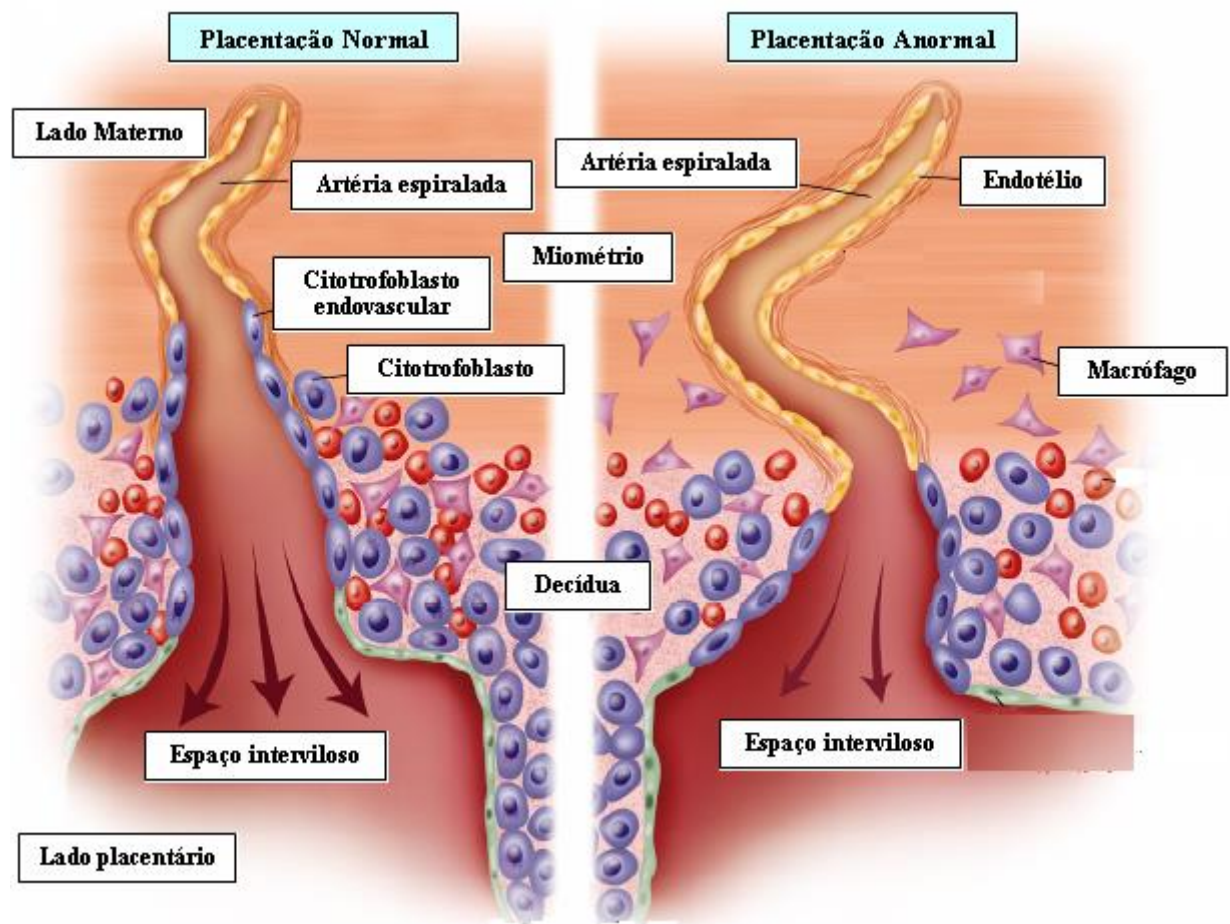


Figura 1. Representação esquemática da fisiopatologia da pré-eclâmpsia (Redman and Sargent 2005). Adaptada de Redman, et al., 2005.

Na PE há evidências de um desequilíbrio entre agentes vasodilatadores e vasoconstritores, resultando em redução da perfusão placentária e hipóxia que, de certa forma, estariam relacionadas à liberação de fatores na circulação materna ocasionando disfunção endotelial sistêmica (Noris, Perico et al. 2005; Sandrim, Palei et al. 2008). Alguns fatores presentes na PE como resistência à insulina, alterações na função imune e disfunção endotelial podem estar relacionados à adiponectina (Carvalho et al, 2006)

Na atualidade, sabe-se que a adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina (Tilg, H. and Moschen. A.R. 2006). Estudos têm demonstrado que os níveis séricos de adiponectina são menores em pacientes com resistência a insulina e Diabetes mellitus tipo 2 quando esses são comparados à indivíduos saudáveis (Hotta K. et al. 2000; Matsuzawa Y. et al. 2004; Weyer C. et al. 2001; Menzaghi, C. et al. 2004). Por sua vez, a resistência à insulina pode dar início a uma série de eventos, dentre eles a síndrome metabólica (SM) e a disfunção endotelial, achados frequentes na PE. Além disso, estudos já comprovaram a relação entre resistência à insulina e desenvolvimento subsequente de hipertensão na gestação (Solomon, C.G. et al. 1994).

Uma das consequências da SM é alteração na resposta vasoconstritora, explicada pelo fato de que altos níveis circulantes de insulina causam retenção de sódio e outros efeitos vasculares, tais como proliferação e expansão de matriz celular e da musculatura lisa dos vasos (Stehouwer C.D.A. et al. 1997). Na presença de hiperinsulinemia, fatores neuro-humorais tais como angiotensina II (Ang II), endotelina (ET) e vasopressina (VP) também

estimulam a proliferação de células do músculo liso vascular e do endotélio. A insulina também modifica o transporte iônico através da membrana celular, aumentando os níveis de cálcio citosólico dos tecidos renal e vascular. Além disso, o efeito desse hormônio sobre diversos fatores de crescimento contribui para o desenvolvimento da lesão vascular ao potencializar o processo aterosclerótico. Em pessoas geneticamente predispostas à hipertensão arterial e/ou nefropatia, todos esses fatores contribuem para acentuar a lesão da vasculatura e dos órgãos-alvo (Carvalho, M H C. et al. 2006).

Com relação à alteração na função imune, alterações das células T e dos macrófagos durante a PE podem desencadear a produção de citocinas como o TNF-alfa e a IL-1 (não abreviar a 1ª vez), que são os principais mediadores proinflamatórios. Níveis elevados do TNF-alfa podem causar disfunção endotelial direta e indiretamente, o que já foi demonstrado em estudos relacionados à PE (Pober, J.S. and Cotran, R.S. 1990; Chen, G. et al. 1996). Os níveis de TNF-alfa podem ser modificados por diferentes concentrações de adiponectina, uma vez que a mesma inibe a expressão desta citocina proinflamatória (Tilg, H. and Moschen. A.R. 2006).

A disfunção endotelial presente na PE resulta em menor disponibilidade de óxido nítrico (NO) e/ou no desequilíbrio de fatores de relaxamento e contração derivados do endotélio, como a endotelina-1, a angiotensina e oxidantes (Pré-eclâmpsia: etiologia e prática clínica, 2009). O NO desempenha um papel fundamental na regulação do tônus vascular e além de seu efeito vasodilatador, o NO também protege contra a lesão vascular, inflamação e trombose através da inibição da adesão de leucócitos e plaquetas ao endotélio. A adiponectina por sua vez atua como protetora contra o desenvolvimento da

disfunção endotelial por promover a geração de NO através da ativação da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS). Além disso, essa a adiponectina inibe a geração de superóxido e aumenta a atividade da (eNOS) nas células endoteliais (Zhu W. et al. 2008) (figura 2). Assim, a redução dos níveis de adiponectina pode ser associada à disfunção endotelial (Ouchi N. et al. 2003). Corroborando essa idéia, a hipoadiponectinemia parece estar associada com comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio (Szmitko P.E. et al. 2007).

Reforçando esses dados, estudos mostram que grávidas com PE apresentam níveis alterados de adiponectina (Ramsay, J. et al. 2003; Avci, I. et al. 2010).

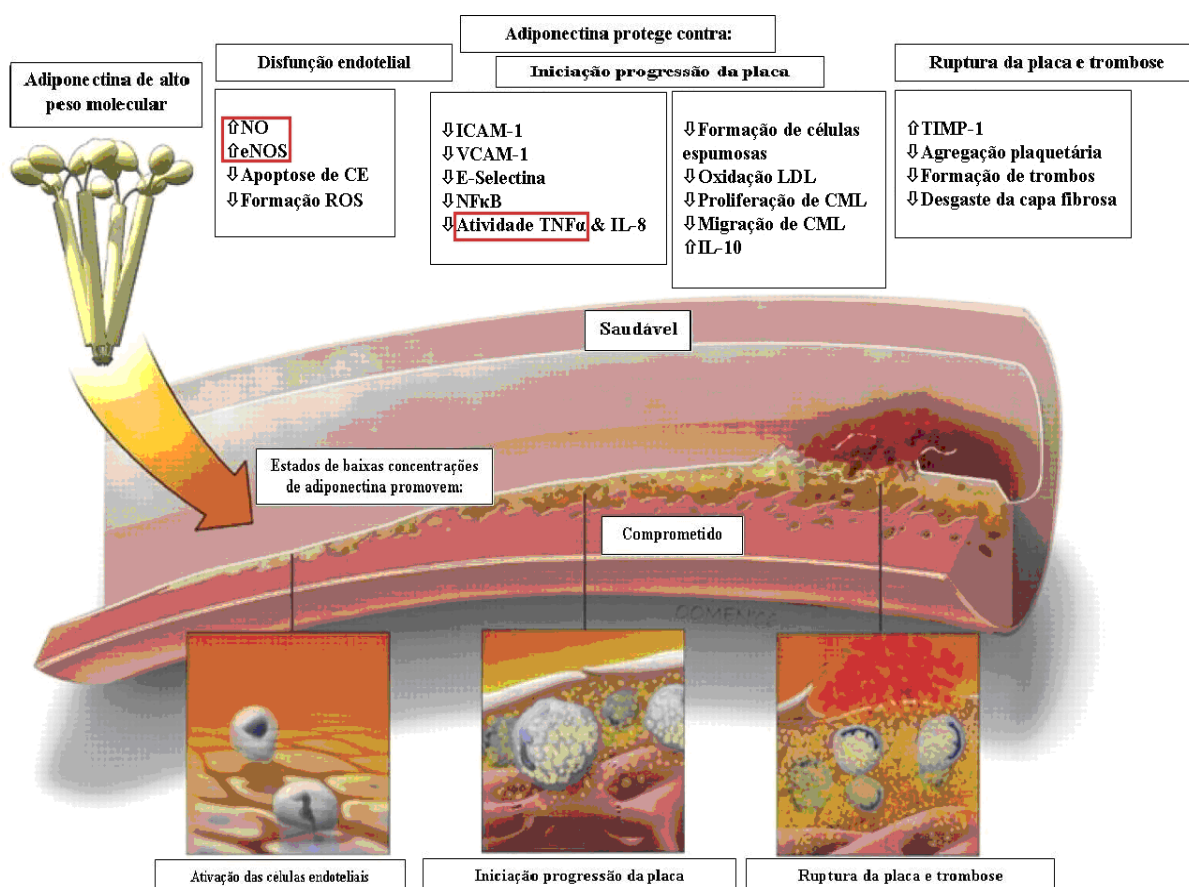


Figura 2. Ações anti-inflamatórias e antiateroscleróticas da adiponectina. A adiponectina, através das suas ações anti-inflamatórias ações sobre o endotélio vascular, é um regulador molecular da aterosclerose. Adiponectina parece proteger

contra todas as fases da formação de placas ateroscleróticas, mantendo o endotélio funcional e saudável, além de proteger contra trombose. NO, óxido nítrico; eNOS, sintase endotelial do óxido nítrico, EC, células endoteliais; ROS, espécies reativas de oxigênio; TNF, fator de necrose tumoral; IL, interleucina; CML, célula muscular lisa; HMW, adiponectina de alto peso molecular; TIMP-1, inibidor tissular de etaloproteinase-1 (Szmitko P.E. et al. 2007). Adaptada de Szmitko P.E. et al. 2007.

1.4 Adiponectina

A adiponectina é um dos hormônios protéicos secretados pelos adipócitos e está envolvida na homeostase energética, através da regulação do metabolismo glicídico e lipídico. Adicionalmente, ela apresenta propriedades anti-inflamatórias e antiateroscleróticas (Fonseca, A., Miriam, H. et al. 2006).

A caracterização do gene da adiponectina foi realizada simultaneamente por grupos independentes. Isto explica a diversidade existente na nomenclatura deste gene: *ACRP30* (*adipocyte complement-related protein of 30kDa*), *ADIPOQ*, *APM1* (*adipose most abundant gene transcript*) e *GBP28* (*gelatin-binding protein, 28 kDa*) (Kershaw E.E. and Flier, J.S. 2004).

O gene humano da adiponectina (gene *ADIPOQ*) está localizado no cromossomo 3q27, apresentando um tamanho molecular de cerca de 16 kilobases (kb), sendo composto por 3 exons e 2 introns (Kadowaki T. et al, 2006). O gene *ADIPOQ* apresenta homologia importante com os genes do colágeno VIII e X e com a proteína C1q do complemento. A adiponectina apresenta peso molecular de 28kDa. É composta por 244 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinalizador, uma porção amino-terminal (N-terminal) e uma porção carbóxi-terminal (C-terminal). A porção N-terminal é composta por uma seqüência curta de repetições G-X-Y, semelhante ao colágeno. Esta molécula não possui porção transmembrana hidrofóbica. No plasma, três

formas circulantes da adiponectina podem ser encontradas: a forma globular ou trimérica de baixo peso molecular (LMW), a forma hexamérica de peso molecular médio (MMW) e a forma de peso molecular elevado (HMW), considerada forma íntegra da adiponectina (Kadowaki, T., Yamauchi, N.T. et al. 2006). Ela corresponde a aproximadamente 0,01% das proteínas plasmáticas totais, variando entre 5 a 30µg/mL (Jazet, I.M. et al. 2003; Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., et al. 1999).

A ação da adiponectina é mediada por dois receptores específicos: o receptor de adiponectina tipo 1 (*ADIPOR1*) e tipo 2 (*ADIPOR2*). As ações antidiabéticas da adiponectina são mediadas por esses receptores e a expressão reduzida dos mesmos está associada a um aumento da resistência insulínica. O gene do *ADIPOR1* é expresso em vários tecidos, principalmente no músculo esquelético e apresenta maior interação com a adiponectina globular e menor interação com a adiponectina íntegra. O gene do *ADIPOR2* é expresso de forma abundante no tecido hepático e apresenta afinidade intermediária tanto para a forma globular quanto para a forma íntegra da proteína (Kershaw E.E. and Flier, J.S. 2004). Estes receptores são proteínas de membrana, sendo a porção N-terminal intracelular e a porção C-terminal extracelular (Kadowaki, T., Yamauchi, N.T. et al. 2006). No endotélio, a adiponectina estimula a fosforilação da eNOS em Ser1177 e também aumenta a interação entre eNOS e HSP90 (*heath-shock protein 90*), formando um complexo necessário para a ativação máxima da eNOS. APPL1 é uma proteína adaptadora endosomal que está envolvida na transdução de sinal de múltiplos estímulos extracelulares. A superexpressão da forma constitutivamente ativa

da AMPK é suficiente para estimular a ativação da eNOS e a produção de NO (Zhu W. et al. 2008) (Figura 3).

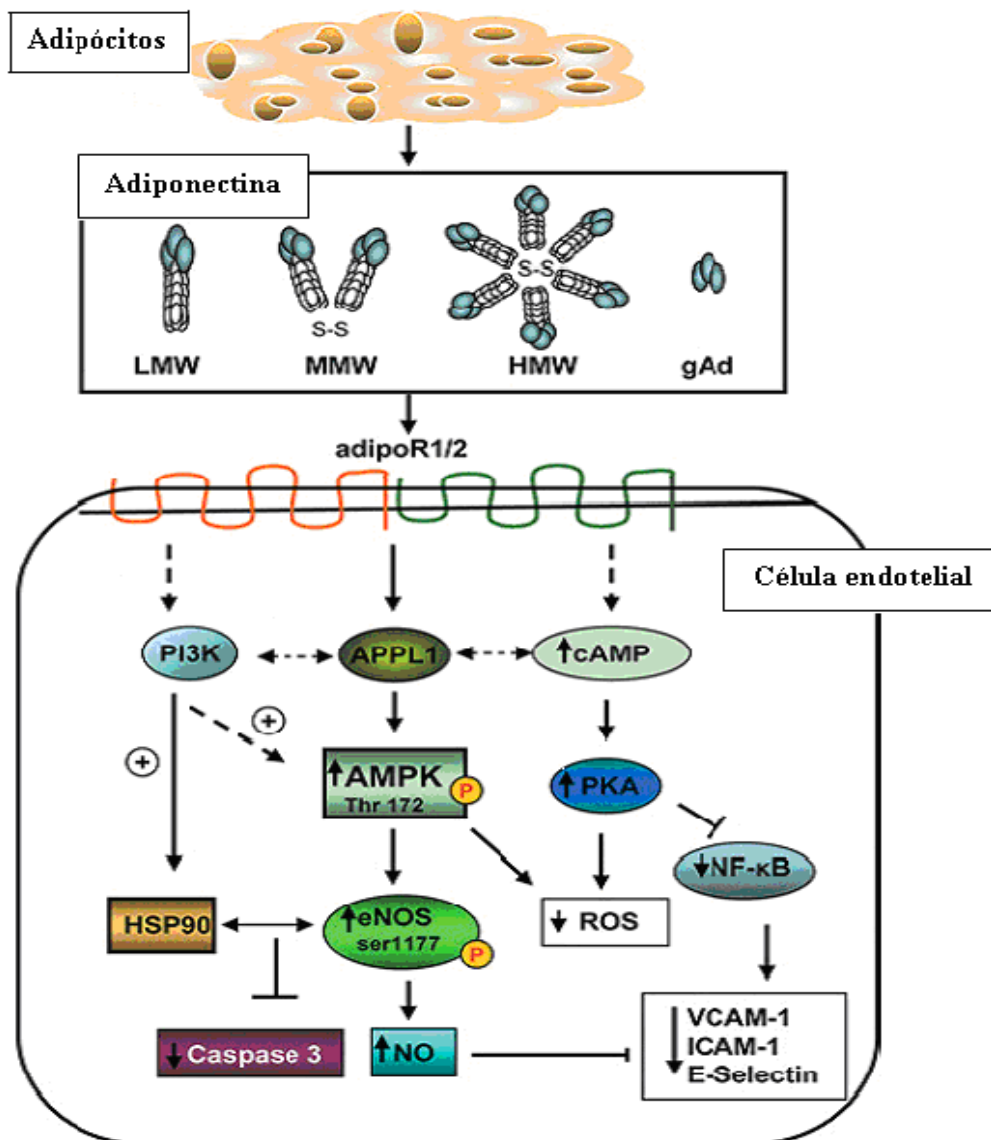


Figura 3. Eventos de sinalização intracelular que medeiam as ações da adiponectina nas células endoteliais (Zhu W., et al. 2008). Adaptada de Zhu W. et al. 2008.

1.5 Polimorfismos no gene ADIPOQ

Estudos genéticos têm fornecido evidências sobre o papel da adiponectina na síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2 e obesidade.

Recentemente, vários estudos têm confirmado a associação de polimorfismos do gene da adiponectina (ADIPOQ) do tipo *Single Nucleotide Polymorphisms* - Polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs) com resistência periférica à insulina, hipertensão, síndrome metabólica e risco cardiovascular (Melistas, L. et al. 2009; Filippi, E. et al. 2004; Leu, H.B. et al.2011; Jang, Y. et al 2005). Concentrações reduzidas de adiponectina resultam da interação entre esses polimorfismos SNPs e fatores ambientais (Kadowaki, T. and Yamauchi, T. 2005).

A literatura mostra estudos sobre a relação entre variantes dos polimorfismos +45T>G e +276G>T, localizados respectivamente no exon 2 e intron 2 (figura 4) e o desenvolvimento da PE. Saarela, T. et al., em 2006, demonstrou que o genótipo TT quando comparado aos genótipos GG e GT no SNP +276G>T foi associado à proteção contra PE (P = 0,012). Nesse estudo, as distribuições genótípicas e alélicas do SNP +45T>G não foram estatisticamente diferentes entre os grupos estudados. Na análise dos haplótipos estimados, os haplótipos T-G e G-G foram significativamente mais frequentes no grupo de PE (P = 0,042) quando comparados com o haplótipo T-T, reforçando a associação de haplótipos do SNP +45T>G e SNP +276G>T com a susceptibilidade à PE (Saarela, T. et al. 2006).

Embora existam indicações de que os polimorfismos -11391G>A e -11377C>G, localizados na região promotora (figura 4), possam regular as concentrações plasmáticas de adiponectina, não há relatos de estudos que associem esses dois últimos polimorfismos com o desenvolvimento de HAG ou PE.

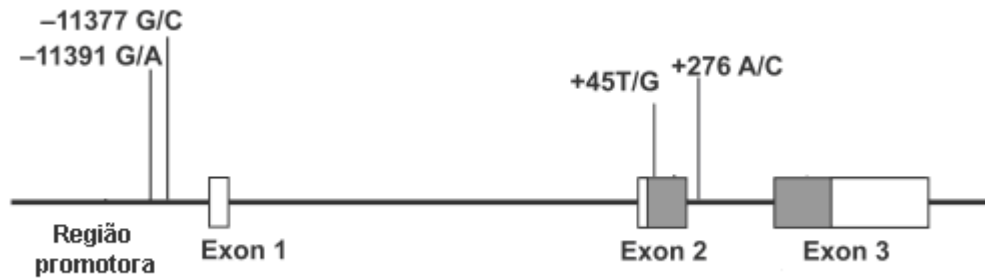


Figura 4. Representação esquemática do gene ADIPOQ. Os exons aparecem representados como retângulos e os introns como linhas horizontais.

2.0 Justificativa

De maneira geral, pode-se inferir que polimorfismos do gene ADIPOQ modulam a expressão e/ou função da adiponectina, favorecendo assim o desenvolvimento de doenças. No entanto, não encontramos nenhum estudo analisando simultaneamente a associação dos polimorfismos +45T>G e +276G>T, localizados respectivamente no exon 2 e intron 2 e -11391G>A e -11377C>G, localizados na região promotora, com o desenvolvimento de HAG e PE, fato este que justifica a importância do presente trabalho.

Hipótese

3.0 Hipótese

Neste estudo, formulamos a hipótese de que pode haver associação entre os polimorfismos do gene ADIPOQ e o risco de desenvolvimento de HAG ou PE.

Objetivos

4.0 Objetivos

Verificar a associação entre os polimorfismos 11391G>A (rs17300539), -11377C>G (rs266729), 45T>G (rs2241766) e 276G>T (rs1501299) localizados no gene ADIPOQ e a ocorrência de HAG ou PE;

Investigar se haplótipos do gene da adiponectina que incluam os quatro polimorfismos acima mencionados estão associados com PE ou HAG.

Pacientes e métodos

5.0 Pacientes e métodos

5.1 Seleção das participantes

Para realização deste estudo foram selecionadas 113 grávidas com HAG e 127 grávidas com PE, em seguimento no Ambulatório de Gestação de Alto Risco do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), além de 161 gestantes saudáveis do Ambulatório de Pré-natal de Baixo Risco do Centro de Referência da Saúde da Mulher (MATER), pelo método de amostragem por conveniência. Todas as voluntárias que aceitaram participar desse estudo, após explicação detalhada do projeto, assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (em anexo).

Os diagnósticos de HAG ou PE foram realizados com base nas orientações da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (Vasconcelos MJA 2002). Foram classificadas como portadoras de HAG as gestantes com idade gestacional superior a 20 semanas, pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou diastólica ≥ 90 mmHg, em duas tomadas de pressão, com intervalo de 4h, em repouso e com valores de proteinúria inferiores a 300 mg /24 horas. As gestantes com esses mesmos níveis pressóricos, com mais de 20 semanas e com proteinúria superior a 300 mg /24 horas receberam o diagnóstico de PE.

5.1.2 Critérios de inclusão

Foram incluídas neste estudo gestantes com idade gestacional igual ou superior a 20 semanas e com diagnóstico de hipertensão arterial gestacional (HAG) e pré-eclâmpsia (PE).

5.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas pacientes que apresentaram as seguintes patologias: cardiopatias, diabetes e hipertensão arterial crônica (HAC).

5.2 Métodos

5.2.1 Coleta e processamento das amostras de sangue

O procedimento de coleta foi realizado em uma sala com temperatura ambiente, onde as gestantes permaneceram sentadas permitindo a regulação da altura do braço necessária para a coleta. As pacientes foram informadas sobre o procedimento a ser realizado. Inicialmente foram realizados todos os procedimentos antissepsia do local da punção necessários para prevenir a contaminação direta do paciente e da amostra, antes de cada coleta o responsável realizada a higienização adequada das mãos e calçava as luvas descartáveis.

A metodologia utilizada para a coleta foi a que utiliza o sistema a vácuo, no entanto, em algumas pacientes com acessos venosos difíceis utilizou-se escalpe. As agulhas e os tubos utilizados na coleta foram descartados em local adequado.

Foram coletados 10 mL de sangue venoso periférico de cada paciente incluída no estudo, empregando-se procedimentos de rotina. As amostras foram coletadas utilizando-se EDTA como agente anticoagulante. Após a homogeneização do sangue, alíquotas destinadas a genotipagem foram armazenadas em três tubos devidamente rotulados e armazenados a -20°C .

5.2.2 Equipamentos utilizados

- Centrifuga (CELM LS – 3 plus)
- Real time - PCR (*Real Time 7500 System* (Applied Biosystems))
- Banho Maria (Nova Ética)
- Espectrofotômetro para quantificação da concentração de DNA genômico extraído (Thermo Scientific, USA)

5.2.3 Extração do DNA genômico (Sambrook J, R. D. M. C. 2001).

Para a extração do DNA de cada amostra, em três tubos eppendorfs adicionamos 300µL de sangue total e 900µL de tampão de lise de hemácias. Após homogeneização por 10min, os tubos foram centrifugados por 20s a máxima velocidade (temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram reunidos em um único tubo. Adicionamos tampão de lise celular gelado, e os tubos foram homogeneizados invertendo-os de 30 a 50 vezes (precipitação SDS). Adicionamos 3µL de proteinase K (20mg/mL) à esse tubo que foi incubado em banho-maria a 55°C de 3 a 16h, sendo resfriado a temperatura ambiente posteriormente. Então, 200µL de solução de acetato de potássio foram adicionados, misturando em vortex por 20s. Incubamos em gelo por 5min, e em seguida centrifugamos a velocidade máxima por 3min a 4°C. Em um novo tubo colocamos o sobrenadante juntamente com 600µL de álcool isopropílico (Isopropanol). Este foi homogeneizado e centrifugado a máxima velocidade por 1min a 4°C, sendo o sobrenadante descartado por decantação. Foram adicionados 600µL de Etanol 70% ao pellet de DNA, para lavá-lo, e depois centrifugamos a máxima velocidade por 1min.

Removemos o sobrenadante por aspiração e com papel de filtro. O *pellet* de DNA foi seco a temperatura ambiente por 15min, e em seguida foi

redissolvido em 50µL de TE (pH 7,6) e incubado em banho-maria a 65°C por 1h, ou 16h a temperatura ambiente, para hidratá-lo. Posteriormente, realizamos a quantificação do DNA genômico em espectrofotômetro (Thermo Scientific, USA).

5.2.4 Genotipagens

Os polimorfismos do gene *ADIPOQ*, na região promotora (-11391G>A, -11377C>G) e no exon 2 e intron 2 (+45T>G e +276G>T, respectivamente) foram genotipados a partir do DNA genômico pelo método de discriminação alélica por PCR em tempo real. As genotipagens foram realizadas no aparelho *Real Time 7500 System* (Applied Biosystems).

As seqüências de *primers* e *probes* foram determinadas com o auxílio do *Applied Biosystems Design Service* e do software *File Builder 3.0*. Os ligantes fluorogênicos utilizados foram FAM e VIC. Para a realização da genotipagem foram utilizados 3,125 µL de *TaqMan 2x Universal Master Mix*® (Applied Biosystems, CA), 0,156 µL de *primer-probe* (470 nM e 100 µM, respectivamente), 3,0 µL de DNA e 0,46 µL de água purificada livre de DNase/RNase, resultando em um volume total de 6,74 µL por reação. Uma placa de 96 poços por amostra foi usada para genotipar o polimorfismo em cada indivíduo. DNA com genótipo conhecido foi utilizado como controle positivo e água como controle negativo em cada experimento.

A nomenclatura oficial dos polimorfismos estudados, sua localização genômica e a identificação do ensaio específico, fornecido pelo fabricante (Applied Biosystems), encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Identificação e localização dos polimorfismos do gene *ADIPOQ* estudados e códigos dos respectivos ensaios para a discriminação alélica por PCR em tempo real.

Polimorfismo (n° de bases em relação ao ATG)	Identificação (Referense SNP)	Localização no gene	Identificação do ensaio (Applied Biosystems™)
-11391G>A	rs17300539	Região promotora	c_33187774_10
-11377C>G	rs266729	Região promotora	c_2412786_10
45T>G	rs2241766	Exon 2	c_26426077_10
276G>T	rs1501299	Intron 2	c_7497299_10

5.2.5 Variáveis genotípicas

Os indivíduos foram divididos em três grupos para cada polimorfismo estudado, segundo a presença ou não da forma nativa do alelo. As categorias genotípicas foram as seguintes: homocigoto para a forma nativa (-11391GG, -11377CC, +45TT e +276GG), heterocigoto (- 11391 GA, -11377CG, +45TG e +276GT) e homocigoto para a forma variante (-11391AA, -11377GG, +45GG e +276TT).

5.2.6 Análise estatística

As características clínicas e bioquímicas foram comparadas entre os grupos estudados utilizando-se o teste *t* de *Student* não-pareado, ANOVA de uma via, e qui-quadrado para variáveis nominais. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi feita a correção de Bonferroni para as freqüências genotípicas e alélicas, sendo considerados estatisticamente significativos valores de $P < 0,01$ ($P = 0,05/5$ análises).

As distribuições dos genótipos para cada polimorfismo foram avaliadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. O Programa PHASE v2.1 foi utilizado

para a determinação dos haplótipos resultantes da combinação dos quatro polimorfismos (-11391G>A, -11377C>G, 45T>G e 276G>T) e estimativa da frequência destes. Diferenças nas frequências genóticas, alélicas e haplotípicas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.3 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP em 20/07/2009 sob o número 5182/2009 (em anexo).

Resultados

6. Resultados

Na tabela 2 estão sumarizadas as características das 401 gestantes selecionadas para este estudo. Não foram detectadas diferenças significativas entre as gestantes saudáveis (GS), as com HAG e as com PE em relação à etnia, tabagismo, frequência cardíaca, concentração de hemoglobina e hematócrito. Entretanto, houve diferenças significativas quanto à idade, índice de massa corporal (IMC), pressão sanguínea sistólica, pressão sanguínea diastólica, glicemia, creatinina, proteinúria, peso fetal, idade gestacional da coleta e idade gestacional do parto.

Com relação à idade, as gestantes com HAG e as gestantes com PE apresentaram idade mais elevada quando comparadas às grávidas saudáveis. O IMC médio do grupo controle foi menor que os das gestantes com HAG e PE. Como esperado, as gestantes com HAG e PE apresentaram níveis pressóricos sistólicos e diastólicos maiores quando comparados aos das gestantes saudáveis. Entretanto, esses valores foram inferiores a 140/90 mmHg, uma vez que a maioria dessas pacientes estava utilizando terapia farmacológica hipotensora (metildopa).

As gestantes com HAG e PE apresentaram valores médios de glicemia de jejum maiores quando comparadas com as GS. As concentrações médias de creatinina foram menores nas gestantes com HAG em relação as GS e com PE. Observamos que a proteinúria, foi superior em mulheres com PE comparadas com aquelas com diagnóstico de HAG. O peso de nascimento médio foi menor nas gestantes com PE, assim como a idade gestacional da coleta e a idade gestacional do parto, quando comparadas com as GS e aquelas com HAG.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados.

Parâmetros	GS (n=161)	HAG (n=113)	P	PE (n=127)	P
Idade (anos)	24,75±0,4	26,90± 0,6*	0,0059	26,98±0,6*	0,0100
Etnicidade (% brancas)	67,80	77,20	NS	74,20	NS
Fumante (%)	11,80	13,60	NS	6,40	NS
IMC (Kg/m ²)	23,30±0,3	28,76±0,6*	P<0,0001	27,11±0,5*	P<0,0001
PAS (mmHg)	111,60±0,8	133,10±1,6*	P<0,0001	140,30±1,9* [#]	P<0,0001
PAD (mmHg)	72,10±0,7	84,33±1,1*	P<0,0001	88,42±1,1* [#]	P<0,0001
FC (batimentos/min)	82,65±0,7	81,63±0,7	NS	82,89±0,8	NS
Glicemia (mg/dL)	74,65±1,1	87,20±2,6*	0,0001	87,43±2,2*	P<0,0001
Hb (g/dL)	11,82±0,1	11,76±0,1	NS	12,12±0,1	NS
Hct (%)	35,42±0,5	35,32±0,3	NS	36,63±0,4	NS
Creatinina (µmol/l)	0,69±0,1	0,61±0,1	NS	0,69±0,2 [#]	0,0001
Proteinúria (mg/24h)	ND	161,80±9,7		1234±185,4 [#]	P<0,0001
Peso fetal (g)	3317±46,4	3212±49,3	NS	2584±87,3* [#]	P<0,0001
IG coleta (semanas)	36,64±0,3	36,24±0,4	NS	34,35±0,4* [#]	0,0001
IG parto (semanas)	39,75±1,4	38,95±1,6	NS	36,16±4,3* [#]	P<0,0001

IMC, índice de massa corporal (kg/m²); PSS, pressão sanguínea sistólica (mmHg); PSD, pressão sanguínea diastólica (mmHg); FC, frequência cardíaca (batimentos/minuto); Hb, hemoglobina (g/dL); Hct, hematócrito (%); IG coleta, idade gestacional da coleta (semanas); IG parto, idade gestacional do parto (semanas); ND, não determinado. Valores expressos como médias ± DPM.

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

#p<0,05 comparado ao grupo Hipertensão arterial gestacional

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

Erros na genotipagem podem levar a erros severos na análise do estudo de associação, introduzindo viés e perda de precisão e, além disso, o poder de detectar associações é diminuído. Dessa maneira, observamos que apenas as

distribuições genóticas do SNP-11377 no grupo PE não se encontram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg, já as distribuições dos genótipos dos outros três polimorfismos estudados no nosso trabalho se mostraram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

Tabela 3. Equilíbrio de Hardy- Weinberg

G-11391A		GS	HAG	PE
observado	GG	146	94	110
	GA	15	19	15
	AA	0	0	2
	p	0,95	0,92	0,92
	q	0,05	0,08	0,08
esperado	GG	146	95	107
	GA	14	17	19
	AA	0	1	1
	χ^2	0,35	0,06	0,03
	P	0,85	0,57	0,65
C-11377G		GS	HAG	PE
observado	CC	93	61	81
	CG	57	36	27
	GG	11	16	19
	p	0,76	0,70	0,74
	q	0,25	0,30	0,26
esperado	CC	92	55	70
	CG	60	48	48
	GG	10	10	8
	χ^2	0,02	0,01	0,02
	P	0,93	0,18	0,0038
T+45G		GS	HAG	PE
observado	TT	131	81	97
	TG	29	29	26
	GG	1	3	4
	p	0,90	0,84	0,87
	q	0,10	0,16	0,13
esperado	TT	131	81	95
	TG	28	30	29
	GG	1	3	2
	χ^2	0,59	0,03	0,04
	P	0,99	0,99	0,65
G+276T		GS	HAG	PE
observado	GG	68	59	66
	GT	74	46	47
	TT	19	8	14
	p	0,66	0,73	0,71
	q	0,34	0,27	0,30
esperado	GG	66	59	63
	GT	69	45	53
	TT	18	9	11
	χ^2	0,01	0,03	0,00
	P	0,98	0,96	0,67

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados quando comparadas as GS e gestantes com HAG ou PE (tabela 4).

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia.

Polimorfismo	Genótipo	GS (n = 161)	HAG (n = 113)	OR (95% CI)	P	PE (n = 127)	OR (95% CI)	P
AdipoQ G -11391 A	GG	146 (90,68%)	94 (83,19%)	1,00 (referencia)		110 (86,61%)	1,00 (referencia)	
	GA	15 (9,32%)	19 (16,81%)	1,97 (0,95 - 4,06)	NS	15 (11,81%)	1,33 (0,62 - 2,83)	NS
	AA	0 (0%)	0			2 (1,57%)	6,63 (0,32 - 139,60)	NS
						$\chi^2 = 3,09$		NS
Alelos								
G		307 (95,3%)	207 (91,6%)			235 (92,5%)		
A		15 (4,7%)	19 (8,4%)	1,88 (0,93 - 3,78)	NS	19 (7,5%)	1,65 (0,82 - 3,33)	NS
AdipoQ C -11377 G	CC	93 (57,76%)	61 (53,98%)	1,00 (reference)		81 (63,78%)	1,00 (reference)	
	CG	57 (35,40%)	36 (31,86%)	0,96 (0,57 - 1,63)	NS	27 (21,26%)	0,54 (0,32 - 0,94)	NS
	GG	11 (6,83%)	16 (14,16%)	2,22 (0,96 - 5,10)	NS	19 (14,96%)	1,98 (0,89 - 4,41)	NS
				$\chi^2 = 4,03$		$\chi^2 = 9,79$		NS
Alelos								
C		243 (75,5%)	158 (69,9%)			189 (74,4%)		
G		79 (24,5%)	68 (30,1)	1,32 (0,90 - 1,94)	NS	65 (25,6%)	1,06 (0,72 - 1,55)	NS
AdipoQ T +45 G	TT	131 (81,37%)	81 (71,68%)	1,00 (reference)		97 (76,38%)	1,00 (reference)	
	TG	29 (18,01%)	29 (25,66%)	1,62 (0,90 - 2,90)	NS	26 (20,47%)	1,21 (0,67 - 2,19)	NS
	GG	1 (0,62%)	3 (2,65%)	4,85 (0,49 - 47,46)	NS	4 (3,15%)	6,02 (0,66 - 54,82)	NS
				$\chi^2 = 4,52$		$\chi^2 = 3,06$		NS
Alelos								
T		291 (90,4%)	191 (84,5%)			220 (86,6%)		
G		31 (9,6%)	35 (15,5%)	1,72 (1,03 - 2,88)	NS	34 (13,4%)	1,45 (0,86 - 2,43)	NS
AdipoQ G +276 T	GG	68 (42,24%)	59 (52,21%)	1,00 (reference)		66 (51,97%)	1,00 (reference)	
	GT	74 (45,96%)	46 (40,71%)	0,72 (0,43 - 1,19)	NS	47 (37,01%)	0,65 (0,39 - 1,07)	NS
	TT	19 (11,80%)	8 (2,65%)	0,48 (0,19 - 1,19)	NS	14 (11,02%)	0,76 (0,35 - 1,64)	NS
				$\chi^2 = 3,35$		$\chi^2 = 2,84$		NS
Alelos								
G		210 (65,2%)	164 (72,6%)			179 (70,5%)		
T		112 (34,8%)	62 (27,4%)	0,56 (0,49 - 1,03)	NS	75 (29,5%)	0,78 (0,55 - 1,12)	NS

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

* $p < 0,05$ GS vs HAG (teste do qui-quadrado, χ^2).

$p < 0,05$ GS vs PE (teste do qui-quadrado, χ^2).

Correção de Bonferroni $p < 0,01$

O passo seguinte deste trabalho foi avaliar se havia diferenças nas distribuições dos haplótipos envolvendo variantes genéticas dos quatro polimorfismos analisados (-11391G>A, -11377C>G, +45T>G e +276G>T).

Apesar de a análise haplotípica ser a melhor ferramenta para a identificação de genes candidatos que possam predispor a doenças cardiovasculares, visto que a análise combinada de marcadores genéticos em uma região de interesse (haplótipo) pode ser mais informativa do que o estudo dos polimorfismos isoladamente (Crawford Dc, N. D. 2005), observamos que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências haplotípicas dos grupos de voluntárias estudados (tabela 5).

Tabela 5. Frequência de haplótipos estimados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e com pré-eclâmpsia.

	Haplótipos	GS (n=161)	HAG (n=113)	OR (95% CI)	P	PE (n=127)	OR (95% CI)	P
H1	GCTG	0,39	0,37	1,08(0,61-1,9)	NS	0,37	1,08 (0,61-1,9)	NS
H2	GCTT	0,25	0,16	1,75 (0,86-3,5)	NS	0,23	1,11 (0,58-2,1)	NS
H3	GCGG	0,06	0,08	0,73 (0,24-2,1)	NS	0,08	0,73 (0,24-2,1)	NS
H4	GCGT	0,00	0,02	0,19 (0,01-4,1)	NS	0,00	0	NS
H5	GGTG	0,15	0,20	0,70 (0,33-1,4)	NS	0,19	0,75 (0,35-1,5)	NS
H6	GGTT	0,07	0,06	1,17 (0,38-3,6)	NS	0,04	1,80 (0,5-6,3)	NS
H7	GGGG	0,02	0,02	1,00 (0,10-7,2)	NS	0,03	0,65 (0,1-4,0)	NS
H8	GGGT	0,00	0,01	0,33 (0,01-8,2)	NS	0,00	0	NS
H9	ACTG	0,02	0,02	1,00 (0,10-7,2)	NS	0,02	1,00 (0,10-7,2)	NS
H10	ACTT	0,02	0,02	1,00 (0,10-7,2)	NS	0,03	0,65 (0,10-4,0)	NS
H11	ACGG	0,01	0,02	0,49 (0,04-5,5)	NS	0,02	0,49 (0,04-5,5)	NS
H12	ACGT	0,00	0,00	0	NS	0,00	0	NS
H13	AGTG	0,00	0,01	0,33 (0,01-8,2)	NS	0,00	0	NS
H14	AGTT	0,00	0,00	0	NS	0,00	0	NS
H15	AGGG	0,00	0,00	0	NS	0,00	0	NS

GS, gestantes saudáveis; HAG, gestantes com hipertensão arterial gestacional; PE, gestantes com pré-eclâmpsia; OR, odds ratio; CI, intervalo de confiança.
* $p < 0,0033$ (0,05/15 ou 0,05/número de haplótipos).

Foram analisadas separadamente as freqüências genotípicas e alélicas das pacientes brancas, pacientes com o $IMC > 30$ e com $IMC < 30$.

6.1 Gestantes Brancas

Na tabela 6 estão sumarizadas as características clínicas e laboratoriais das 300 gestantes de etnia branca selecionadas para este estudo. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos GS, HAG e PE em relação a idade, tabagismo e freqüência cardíaca. No entanto, observou-se que os grupos diferiram em relação ao IMC, pressão sanguínea sistólica, pressão sanguínea diastólica, glicemia, concentrações de hemoglobina, concentrações de hematócrito, creatinina, proteinúria, peso fetal, idade gestacional da coleta e idade gestacional do parto.

Com relação ao IMC, quando comparadas com as GS as gestantes com HAG e com PE apresentaram um IMC superior. Na comparação dos níveis pressóricos, as gestantes com HAG e PE apresentaram maior pressão arterial sistólica e diastólica em relação as GS, observou-se ainda que as gestantes com PE apresentaram níveis pressóricos sistólicos e diastólicos maiores quando comparadas com as HAG.

As gestantes com HAG e PE apresentaram valores médios de glicemia de jejum maiores quando comparadas com as GS. As concentrações de hemoglobina foram maiores nas gestantes com PE em relação as GS e com HAG, o mesmo foi observado nas concentrações de hematócrito. As

concentrações médias de creatinina foram menores nas gestantes com HAG em relação as GS e com PE mas observou-se diferença singnificativamente estatística apenas na comparação entre HAG e PE. Quando comparamos a proteinúria, observou-se que essa foi superior em mulheres com PE em relação as com diagnóstico de HAG. O peso de nascimento médio foi menor nas gestantes com PE quando comparadas com as gestantes saudáveis e as com HAG. As gestantes com PE apresentaram idade gestacional de coleta menor quando comparadas com as GS e aquelas com HAG o mesmo foi observado em relação a idade gestacional do parto.

Tabela 6. Características clínicas e laboratoriais das gestantes brancas.

Parâmetros	GS (n=119)	HAG (n=88)	P	PE (n=93)	P
Idade (anos)	24,98±0,5	26,25± 07	NS	26,58±0,7	NS
Fumante (%)	8,40	6,80	NS	13,90	NS
IMC (Kg/m ²)	23,48±0,4	29,30±0,7*	P<0,0001	27,48±0,6*	P<0,0001
PAS (mmHg)	111,90±0,9	133,9±1,8*	P<0,0001	141,4±1,8*#	P<0,0001
PAD (mmHg)	72,15±0,7	85,15±1,3*	P<0,0001	89,42±1,1*#	P<0,0001
FC (batimentos/min)	83,58±0,9	82,11±0,8	NS	83,03±0,9	NS
Glicemia (mg/dL)	75,42±1,3	87,12±2,5*	0,0001	89,66±3,1*	P<0,0001
Hb (g/dL)	11,80±0,1	11,83±0,1	NS	12,24±0,1*#	0,0162
Hct (%)	35,63±0,5	35,42±0,3	NS	36,97±0,4*#	0,0186
Creatinina (µmol/l)	0,70±0,04	0,61±0,01	NS	0,68±0,01#	0,0007
Proteinúria (mg/24h)	ND	149,6±10,9		1306±226,1#	P<0,0001
Peso fetal (g)	3374±51,3	3230±58,1	NS	2624±98,8*#	P<0,0001
IG coleta (semanas)	36,73±0,3	36,39±0,4	NS	34,34±0,5*#	0,0013
IG parto (semanas)	39,68±0,1	38,99±0,2*	0,0073	36,25±0,5*#	P<0,0001

IMC, índice de massa corporal (kg/m²); PSS, pressão sanguínea sistólica (mmHg); PSD, pressão sanguínea diastólica (mmHg); FC, frequência cardíaca (batimentos/minuto); Hb, hemoglobina (g/dL); Hct, hematócrito (%); IG coleta, idade gestacional da coleta (semanas); IG parto, idade gestacional do parto (semanas); ND, não determinado. Valores expressos como médias ± DPM.

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

#p<0,05 comparado ao grupo Hipertensão arterial gestacional

Na análise das freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos - 11391G>A, -11377C>G, +45T>G e +276G>T não foram encontradas

diferenças estatisticamente significativa quando comparados os grupos GS, HAG e PE (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências genotípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia de etnia branca.

Polimorfismo	Genótipo	GS (n = 119)	HAG (n = 88)	OR (95% CI)	P	PE (n = 93)	OR (95% CI)	P
AdipoQ G -11391 A	GG	107 (89,92%)	70 (79,55%)	1,00 (referencia)		82 (88,17%)	1,00 (referencia)	
	GA	12 (10,08%)	18 (20,45%)	2,29 (1,04 - 5,05)	NS	10 (10,75%)	1,09 (0,45 - 2,64)	NS
	AA	0 (0%)	0			1 (1,08%)	3,91 (0,16 - 97,27)	NS
				$\chi^2 = 4,39$	NS		$\chi^2 = 1,32$	NS
	Alelos							
	G	226 (95%)	158 (89,8%)			174 (93,5%)		
	A	12 (5%)	18 (10,2%)	2,15 (1,01 - 4,58)	NS	12 (6,5%)	1,29 (0,57 - 2,96)	NS
AdipoQ C -11377 G	CC	68 (57,14%)	48 (54,55%)	1,00 (referencia)		56 (60,22%)	1,00 (referencia)	
	CG	42 (35,29%)	28 (31,82%)	0,94 (0,52 - 1,73)	NS	22 (23,66%)	0,54 (0,30 - 0,96)	NS
	GG	9 (7,56%)	12 (13,64%)	2,22 (0,96 - 5,10)	NS	15 (16,13%)	1,98 (0,89 - 4,41)	NS
				$\chi^2 = 2,08$	NS		$\chi^2 = 7,71$	NS
	Alelos							
	C	178 (74,8%)	124 (70,5%)			134 (72%)		
	G	60 (25,2%)	52 (29,5)	1,24 (0,80 - 1,92)	NS	52 (28%)	1,15 (0,75 - 1,78)	NS
AdipoQ T +45 G	TT	97 (81,51%)	60 (68,18%)	1,00 (referencia)		71 (76,34%)	1,00 (referencia)	
	TG	21 (17,65%)	26 (29,55%)	2,00 (1,04 - 3,87)	NS	19 (20,43%)	1,24 (0,62 - 2,47)	NS
	GG	1 (0,84%)	2 (2,27%)	3,23 (0,29 - 36,45)	NS	3 (3,23%)	4,09 (0,42 - 40,25)	NS
				$\chi^2 = 5,06$	NS		$\chi^2 = 1,96$	NS
	Alelos							
	T	215 (90,3%)	146 (83%)			161 (86,6%)		
	G	23 (9,7%)	30 (17%)	1,92 (1,07 - 3,44)	NS	25 (13,4%)	1,45 (0,79 - 2,65)	NS
AdipoQ G +276 T	GG	50 (42,02%)	46 (52,27%)	1,00 (referencia)		48 (51,61%)	1,00 (referencia)	
	GT	55 (46,22%)	35 (39,77%)	0,69 (0,39 - 1,24)	NS	37 (39,78%)	0,70 (0,39 - 1,24)	NS
	TT	14 (11,76%)	7 (7,95%)	0,54 (0,20 - 1,47)	NS	8 (8,60%)	0,59 (0,23 - 1,55)	NS
				$\chi^2 = 2,35$	NS		$\chi^2 = 2,04$	NS
	Alelos							
	G	155 (65,1%)	127 (72,2%)			133 (71,5%)		
	T	83 (34,9%)	49 (27,8%)	0,72 (0,47 - 1,10)	NS	53 (28,5%)	0,74 (0,49 - 1,13)	NS

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

*p<0,05 GS vs HAG (teste do qui-quadrado, χ^2).

p<0,05 GS vs PE (teste do qui-quadrado, χ^2).

Correção de Bonferroni p< 0,01

6.2 Gestantes com IMC>30

Na tabela 8 estão sumarizadas as características clínicas e laboratoriais das 90 gestantes com IMC>30.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação a idade, etnicidade, tabagismo, IMC, frequência cardíaca, concentrações de hemoglobina, concentrações de hematócrito e peso fetal. As gestantes com IMC>30 mostraram diferenças em relação aos níveis pressóricos sistólicos e diastólicos, tendo as gestantes diagnosticadas com HAG e com PE níveis mais elevados quando comparadas ao grupo de grávidas saudáveis, contudo é importante lembrar que esses valores foram inferiores a 140/90 mmHg, devido ao fato de que a maioria dessas pacientes estava utilizando terapia farmacológica hipotensora (metildopa).

Com relação aos valores médios de glicemia de jejum as gestantes com HAG e PE apresentaram valores maiores, no entanto essa diferença só foi estatisticamente significativa na comparação entre as gestantes com PE e as grávidas saudáveis. Houve diferença também em relação a idade gestacional da coleta e idade gestacional do parto, tendo as gestantes diagnosticadas com HAG e PE idades menores em comparação as GS.

Tabela 8. Características clínicas e laboratoriais das gestantes com IMC>30.

Parâmetros	GS (n=8)	HAG (n=42)	P	PE (n=40)	P
Idade (anos)	25,25±4,1	26,41± 5,2	NS	27,39±5,4	NS
Etnicidae (% brancas)	62,50	85,40	NS	77,50	NS
Fumante (%)	12,50	7,310	NS	7,50	NS
IMC (Kg/m ²)	35,30±3,6	35,97±4,8	NS	34,69±3,7	NS
PAS (mmHg)	116,8±10,2	129,3±15,6*	0,0234	135,9±17,6 *	0,0076
PAD (mmHg)	76,25±7,0	81,44±12,8	NS	86,35±12,4*	0,0154
FC (batimentos/min)	84,38±7,7	83,56±5,7	NS	82,80±6,6	NS
Glicemia (mg/dL)	74,57±12,8	89,04±18,3	NS	86,56±12,9*	0,0047
Hb (g/dL)	11,71±1,7	11,98±1,1	NS	12,13±1,1	NS
Hct (%)	36,01±6,8	35,92±3,5	NS	36,46±3,5	NS
Creatinina (µmol/l)	ND	0,59±0,1		0,62±0,1	
Proteinúria (mg/24h)	ND	164,7±63,2		722,9±751,9 [#]	P<0,0001
Peso fetal (g)	3563±397,9	3311±580,1	NS	3019±765,4	NS
IG coleta (semanas)	38,14±1,9	35,08±4,3*	0,0408	34,83±4,3	NS
IG parto (semanas)	40,67±1,2	38,60±1,7*	0,0098	37,77±2,7*	0,0064

IMC, índice de massa corporal (kg/m²) ; PSS, pressão sanguínea sistólica (mmHg); PSD, pressão sanguínea diastólica (mmHg); FC, frequência cardíaca (batimentos/minuto); Hb, hemoglobina (g/dL); Hct, hematócrito (%); IG coleta, idade gestacional da coleta (semanas); IG parto, idade gestacional do parto (semanas); ND, não determinado. Valores expressos como médias ± DPM.

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

#p<0,05 comparado ao grupo Hipertensão arterial gestacional

Nas gestantes com IMC>30 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos estudados (Tabela 9).

Tabela 9. Frequências genótípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia com IMC>30.

Polimorfismo	Genótipo	GS (n = 8)	HAG (n = 42)	OR (95% CI)	P	PE (n = 40)	OR (95% CI)	P
AdipoQ G -11391 A	GG	7 (87,50%)	36 (85,7%)	1,00 (referencia)		38 (95,0%)	1,00 (referencia)	
	GA	1 (12,50%)	6 (14,2%)	1,17 (0,12 - 11,26)	NS	2 (5,0%)	1,087 (0,45 - 2,64)	NS
	AA	0 (0%)	0 (0%)			0 (0%)		
				$\chi^2 = 0,02$	NS		$\chi^2 = 0,64$	NS
	Alelos							
	G	15 (93,75%)	78 (92,9%)			78 (97,5%)		
	A	1 (6,25%)	6 (7,1%)	2,15 (1,01 - 4,58)	NS	2 (2,5%)	1,30 (0,57 - 2,96)	NS
AdipoQ C -11377 G	CC	5 (62,50%)	22 (52,3%)	1,00 (referencia)		56 (60,2%)	1,00 (referencia)	
	CG	3 (37,50%)	12 (28,5%)	1,17 (0,12 - 11,26)	NS	22 (23,6%)	0,37 (0,03 - 4,64)	NS
	GG	0 (0%)	8 (19,0%)	4,16 (0,21 - 83,58)	NS	15 (16,1%)	3,67 (0,18 - 73,50)	NS
				$\chi^2 = 1,83$	NS		$\chi^2 = 2,88$	NS
	Alelos							
	C	13 (81,3%)	56 (66,7%)			57 (71,3%)		
	G	3 (18,8%)	28 (33,3%)	2,17 (0,57 - 8,23)	NS	23 (28,8%)	1,75 (0,45 - 6,71)	NS
AdipoQ T +45 G	TT	6 (75,00%)	31 (73,81%)	1,00 (referencia)		32 (80,00%)	1,00 (referencia)	
	TG	2 (25,00%)	10 (23,81%)	0,97 (0,17 - 5,58)	NS	6 (15,00%)	0,56 (0,09 - 3,48)	NS
	GG	0 (0%)	1 (2,38%)	0,62 (0,02 - 16,97)	NS	2 (5,00%)	1,00 (0,04 - 23,38)	NS
				$\chi^2 = 0,19$	NS		$\chi^2 = 0,82$	NS
	Alelos							
	T	14 (87,5%)	72 (85,7%)			70 (87,5%)		
	G	2 (12,5%)	12 (14,3%)	1,17 (0,23 - 5,79)	NS	10 (12,5%)	1,00 (0,20 - 5,07)	NS
AdipoQ G +276 T	GG	4 (50,00%)	23 (54,76%)	1,00 (referencia)		25 (62,50%)	1,00 (referencia)	
	GT	2 (25%)	17 (40,48%)	1,48 (0,24 - 9,03)	NS	12 (30,00%)	0,96 (0,15 - 5,99)	NS
	TT	2 (25%)	2 (4,76%)	0,17 (0,02 - 1,62)	NS	3 (7,50%)	0,24 (0,03 - 1,92)	NS
				$\chi^2 = 3,89$	NS		$\chi^2 = 2,19$	NS
	Alelos							
	G	10 (62,5%)	63 (75,0%)			62 (77,5%)		
	T	6 (37,5%)	21 (25,0%)	0,56 (0,18 - 1,71)	NS	18 (22,5%)	0,48 (0,15 - 1,51)	NS

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

*p<0,05 GS vs HAG (teste do qui-quadrado, χ^2).

p<0,05 GS vs PE (teste do qui-quadrado, χ^2).

Correção de Bonferroni p< 0,01

6.3 Gestantes com IMC<30

As características clínicas e laboratoriais das 288 gestantes com IMC<30 estão sumarizadas na tabela 10.

As gestantes analisadas não apresentaram diferenças em relação a etnicidade, tabagismo e frequência cardíaca. No entanto, houve diferenças

quanto à idade, IMC, PAS, PAD, glicemia, hemoglobina, hematócrito, creatinina, proteinúria, peso fetal, idade gestacional da coleta e idade gestacional do parto.

Em relação à idade as gestantes diagnosticadas com HAG e PE apresentaram idade superior quando comparadas as GS, o mesmo foi observado em relação ao IMC. Quando comparadas com as gestantes saudáveis, as HAG e as PE apresentaram níveis pressóricos sistólicos e diastólicos maiores, tendo as gestantes com PE os maiores níveis.

As gestantes diagnosticadas com PE apresentaram ainda valores médios de glicemia de jejum maiores quando comparadas com as GS, além disso as concentrações de hemoglobina, hematócrito e creatinina foram maiores em PE em comparação as gestantes com HAG, o mesmo foi observado para a proteinúria.

Diferenças no peso fetal também foram encontradas entre os grupos, sendo peso de nascimento médio menor nas gestantes com PE, assim como a idade gestacional da coleta e a idade gestacional do parto, quando comparadas com as GS e aquelas com HAG.

Tabela 10. Características clínicas e laboratoriais das gestantes com IMC<30

Parâmetros	GS (n=138)	HAG (n=67)	P	PE (n=83)	P
Idade (anos)	24,80±5,9	27,02± 7,2	NS	27,10±7,3*	0,0418
Etnicidade (% brancas)	62,30	76,10	NS	71,10	NS
Fumante (%)	12,30	14,90	NS	6,00	NS
IMC (Kg/m ²)	22,62±3,3	24,17±3,3*	0,0015	23,67±3,4	NS
PAS (mmHg)	112,3±8,6	136,1±16,2*	P<0,0001	144,5±17,3* [#]	P<0,0001
PAD (mmHg)	72,35±7,1	87,36±11,0*	P<0,0001	90,75±10,4* [#]	P<0,0001
FC (batimentos/min)	82,76±8,5	81,57±8,3	NS	83,02±8,8	NS
Glicemia (mg/dL)	75,16±10,8	81,54±14,2	NS	89,38±25,7*	0,0008
Hb (g/dL)	11,90±1,5	11,75±1,2	NS	12,13±1,9 [#]	0,0131
Hct (%)	35,59±5,1	35,30±3,6	NS	36,73±5,2 [#]	0,0099
Creatinina (µmol/l)	0,67±0,1	0,62±0,2	NS	0,71±0,2 [#]	0,0002
Proteinúria (mg/24h)	ND	135,4±63,5		1560±1791,0 [#]	P<0,0001
Peso fetal (g)	3306±540,4	3116±507,2*	0,0106	2427±913,4* [#]	P<0,0001
IG coleta (semanas)	37,03±2,5	37,31±3,5	NS	34,01±5,4* [#]	P<0,0001
IG parto (semanas)	39,71±1,4	39,22±1,3*	0,0118	35,46±4,7* [#]	P<0,0001

IMC, índice de massa corporal (kg/m²) ; PSS, pressão sanguínea sistólica (mmHg); PSD, pressão sanguínea diastólica (mmHg); FC, frequência cardíaca (batimentos/minuto); Hb, hemoglobina (g/dL); Hct, hematócrito (%); IG coleta, idade gestacional da coleta (semanas); IG parto, idade gestacional do parto (semanas); ND, não determinado. Valores expressos como médias ± DPM.

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

#p<0,05 comparado ao grupo Hipertensão arterial gestacional

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados quando comparadas as GS e gestantes com HAG ou PE com IMC<30 (tabela 11).

Tabela 11. Frequências genótípicas e alélicas dos quatro polimorfismos analisados em gestantes saudáveis, hipertensas gestacionais e pré-eclâmpsia com IMC<30.

Polimorfismo	Genótipo	GS (n = 138)	HAG (n = 67)	OR (95% CI)	P	PE (n = 83)	OR (95% CI)	P
AdipoQ G -11391 A	GG	125 (90,6%)	54 (80,6%)	1,00 (referencia)	NS	69 (83,1%)	1,00 (referencia)	NS
	GA	13 (9,4%)	13 (19,4%)	2,31 (1,01 - 5,32)		12 (14,5%)	1,67 (0,72 - 3,87)	
	AA	0 (0%)	0 (0%)			2 (2,4%)	9,03 (0,43 - 190,90)	
Alelos							$\chi^2 = 4,82$	NS
	G	263 (95,3%)	121 (90,3%)			150 (90,4%)		
	A	13 (4,7%)	13 (9,7%)	2,17 (0,98 - 4,83)	NS	16 (9,6%)	2,16 (1,01 - 4,61)	NS
AdipoQ C -11377 G	CC	82 (59,4%)	37 (55,2%)	1,00 (referencia)	NS	53 (63,9%)	1,00 (referencia)	NS
	CG	47 (34,1%)	22 (32,8%)	1,04 (0,55 - 1,96)		21 (25,3%)	0,69 (0,37 - 1,28)	
	GG	9 (6,5%)	8 (11,9%)	1,97 (0,70 - 5,51)		9 (10,8%)	1,55 (0,58 - 4,15)	
Alelos				$\chi^2 = 1,75$	NS		$\chi^2 = 2,65$	NS
	C	211 (76,4%)	96 (71,6%)			127 (76,5%)		
	G	65 (23,6%)	38 (28,4)	1,28 (0,80 - 2,05)	NS	39 (23,5%)	0,99(0,63 - 1,57)	NS
AdipoQ T +45 G	TT	112 (81,2%)	45 (70,1%)	1,00 (referencia)	NS	64 (77,1%)	1,00 (referencia)	NS
	TG	25 (18,1%)	18 (26,9%)	1,72 (0,86 - 3,44)		18 (21,7%)	1,26 (0,64 - 2,49)	
	GG	1 (0,7%)	2 (3,0%)	1,750 (0,11 - 28,48)		1 (1,2%)	0,37 (0,03 - 4,17)	
Alelos				$\chi^2 = 3,93$	NS		$\chi^2 = 0,58$	NS
	T	249 (90,2%)	191 (84,5%)			146 (88,0%)		
	G	27 (9,8%)	35 (15,5%)	1,81 (0,99 - 3,32)	NS	20 (12,0%)	1,26 (0,68 - 2,33)	NS
AdipoQ G +276 T	GG	60 (43,5%)	35 (52,2%)	1,00 (referencia)	NS	37 (44,6%)	1,00 (referencia)	NS
	GT	63 (45,7%)	26 (38,8%)	0,71 (0,38 - 1,31)		35 (42,2%)	0,90 (0,50 - 1,61)	
	TT	15 (10,9%)	6 (9,0%)	0,69 (0,24 - 1,93)		11 (13,3%)	1,19 (0,49 - 2,87)	
Alelos				$\chi^2 = 1,39$	NS		$\chi^2 = 0,41$	NS
	G	183 (66,3%)	96 (71,6%)			109 (65,7%)		
	T	93 (33,7%)	38 (28,4%)	0,78 (0,49 - 1,22)	NS	57 (34,3%)	1,03 (0,68 - 1,54)	NS

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

*p<0,05 GS vs HAG (teste do qui-quadrado, χ^2).

p<0,05 GS vs PE (teste do qui-quadrado, χ^2).

Correção de Bonferroni p< 0,01

Discussão

7. Discussão

O presente estudo avaliou a associação entre os polimorfismos -11391G>A e -11377C>G localizados na região promotora, 45T>G localizado no exon 2 e 276G>T localizado no intron 2 do gene ADIPOQ e HAG ou PE.

A literatura mostra que esses polimorfismos já foram analisados em diversos grupos e que os mesmos estão associados à regulação dos níveis da adiponectina e desenvolvimento de inúmeras doenças, tais como obesidade, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, hipertensão e PE (Saarela, T. et al 2006; Youpeng, B. et al. 2010; Park, J.W., Park, J., Jee, S.H. 2011; Jang, Y. et al. 2008; Jang, Y. et al. 2005; Leu, H.B. et al. 2011; Chang, Y.C. et al. 2009).

Em nosso estudo, não foram observadas diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo +276G>T entre os grupos estudados. Esses achados diferem dos resultados do estudo realizado por Saarela, T. et al (2006), que avaliou pacientes com PE e controles saudáveis.

O genótipo TT do SNP+276G>T foi associado com a proteção contra PE ($p = 0,012$) (odds ratio 0,27; 95% IC: 0,09-0,80). Observou-se também que as distribuições genotípicas e alélicas no SNP+276G>T diferiram significativamente entre o grupo PE e grupo saudável ($p = 0,035$ e $p = 0,043$, respectivamente). Vale lembrar que o estudo de Saarela foi realizado com mulheres finlandesas, que representam uma população geneticamente diferente da brasileira que é formada pela mistura de raças, outro ponto que diferencia nosso estudo é o fato de analisarmos também gestantes com o diagnóstico de hipertensão arterial gestacional.

Saarela analisou também as frequências genóticas e alélicas no SNP+45T>G, e assim como em nosso estudo não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No entanto, em nossos dados demonstram que o alelo G é mais frequente no grupo com HAG e PE do que no grupo GS, indicando uma possível associação desse alelo com maior susceptibilidade ao desenvolvimento do processo hipertensivo.

Em nossa análise dos haplótipos estimados, não observamos diferenças nas frequências dos haplótipos estudados, porém esses dados não podem ser comparados aos de Saarela, pois avaliamos os haplótipos estimados referente aos quatro polimorfismos estudados. No estudo de Saarela, T. et al (2006), na análise dos haplótipos estimados, os haplótipos T-G e G-G foram significativamente mais frequentes no grupo de PE ($P = 0,042$) quando comparados com o haplótipo T-T, reforçando a associação de haplótipos do SNP +45T>G e SNP +276G>T com a susceptibilidade à PE. De acordo com esse estudo os polimorfismos do gene ADIPOQ mostraram associação estatisticamente significativa, mesmo que fraca entre os haplótipos e a susceptibilidade a PE.

Os polimorfismos +45T>G e +276G>T também foram analisados em chinesas por Youpeng, B. et al. 2010. O estudo realizado com 81 grávidas saudáveis, 20 grávidas com PE moderada e 87 com PE grave, assim como o nosso, não observou diferenças entre os três grupos nas distribuições genóticas e alélicas ($p>0,05$) para nenhum dos dois polimorfismos.

No entanto, o estudo de Youpeng sugere que os SNPs +45T>G e +276G>T estão associados com importantes manifestações clínicas da pré-eclâmpsia.

Em um estudo realizado com indivíduos coreanos saudáveis divididos em três grupos, definidos de acordo com IMC e níveis séricos de adiponectina, foram analisados os SNPs -11377C>G, +45T>G e +276G>T e observou-se que o alelo G do SNP-11377C>G e a maioria dos haplótipos incluindo esse alelo, aumentaram significativamente o risco de obesidade. Contudo esse risco diminuiu entre os grupos quando uma definição menos rigorosa de obesidade foi utilizada. Evidências estatísticas do genótipo GG do SNP-11377C>G e do diplótipo GT/GT composto pelos SNPs -11377C>G e +45T>G confirmaram a contribuição do alelo G na direção de uma predisposição para a obesidade (Park, J.W., Park, J., Jee, S.H. 2011).

Embora o estudo de Park tenha sido realizado em uma população muito diferente da brasileira e que o foco tenha sido a obesidade, a comparação com os nossos resultados se torna plausível devido ao fato de a obesidade ser considerada um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças como a HAG e PE.

Poucos estudos avaliaram a relação entre os polimorfismos do gene ADIPOQ e o desenvolvimento de HAG e PE. Contudo, os polimorfismos que analisamos em nosso estudo já foram relacionados a outras patologias bem como com as variações nos níveis de adiponectina. Como exemplo disso temos o estudo feito por Jang, Y. et al. 2008, que demonstrou a relação entre os polimorfismos do gene ADIPOQ e variações nos níveis de adiponectina mulheres coreanas não diabéticas. Os autores analisaram 8 polimorfismos, sendo quatro deles os mesmos abordados em nosso estudo. Observou-se que portadoras do genótipo TT do polimorfismo +276G>T tinham concentrações de adiponectina significativamente maior do que as portadoras do genótipo GG (p

= 0,005), mulheres heterozigotas e mulheres homozigotas (genótipo TT no polimorfismo +45T>G e GG no polimorfismo +276G>T) portadoras do haplótipo TG apresentaram concentrações menores de adiponectina em relação as que não apresentaram esse haplótipo ($p < 0,001$). Além da associação com a variação nas concentrações de adiponectina, esse estudo demonstrou que o haplótipo TG está associado com as concentrações de insulina e com o índice de resistência à insulina em mulheres com sobrepeso e obesidade. (Jang, Y. et al. 2008).

Em um segundo estudo de Jang e colaboradores realizado em coreanos não diabéticos, além de demonstrar a associação do genótipo GG do polimorfismo +276G>T com níveis plasmáticos de adiponectina menores, demonstrou-se que os portadores do alelo G apresentam maior stress oxidativo, indicando que a presença do alelo G no polimorfismo +276G>T pode contribuir significativamente para o maior risco de desenvolver doença cardiovascular em coreanos (Jang, Y. et al. 2005).

Em um estudo que analisou famílias taiwanesas foi observado que no SNP+276G>T a presença dos genótipos GG e GT foi associada à presença de hipertensão na síndrome metabólica (odds ratio para GG + GT vs. TT = 2,46, IC 95%: 1,14-5,3, $p = 0,02$). Não foi observada nenhuma associação entre síndrome metabólica e/ou hipertensão com o SNP+45T>G e nenhuma associação foi observada entre os polimorfismos do gene ADIPOQ e hipertensão isolada nem com síndrome metabólica sem hipertensão (Leu, H.B. et al. 2011).

Em estudo realizado na população chinesa demonstrou que o alelo G do SNP+45T>G foi associado ao menor risco de desenvolver doença arterial

coronariana (DAC) (odds ratio (OR), 0.76; intervalo de confiança (IC) 95%:0.64–0.89; $p=0.001$, além disso o alelo G foi associado a tendência de menor pressão arterial sistólica ($p = 0,07$). No entanto, não houve associação com outros fenótipos metabólicos dentre eles, pressão arterial diastólica ($p = 0,22$), IMC ($p = 0,90$), glicemia de jejum ($p = 0,19$), triglicérides ($p = 0,78$) ou colesterol total ($p = 0,37$). Quando Chang analisou a interação do SNP+45T>G com os fatores de risco da DAC, o alelo G foi associado com o risco significativamente menor de desenvolver DAC em participantes com pressão sanguínea <140/90 mmHg (OR, 0.65; 95%CI, 0.51–0.82; $p=0.0004$), os efeitos protetores desapareceram em participantes com pressão sanguínea $\geq 140/90$ mmHg (OR, 0.98; 95%CI, 0.76– 1.28; $p=0.93$), indicando que outros fatores podem estar envolvidos no aumento do risco cardiovascular. Uma interação semelhante foi observada entre níveis plasmáticos de colesterol total e o SNP+45T>G (Chang, Y.C. et al. 2009).

Em nosso estudo não analisamos a associação das freqüências genótípicas e alélicas com nenhum dos fenótipos metabólicos, além disso, nossa amostra foi composta por gestantes que devido às adaptações provenientes da gestação já apresentam um perfil metabólico diferenciado.

Um estudo italiano analisou a associação entre os polimorfismos - 11391G>A, -11377C>G, +45T>G e +276G>T com o risco de infarto do miocárdio e diabetes tipo 2. Os grupos de estudo foram compostos por indivíduos que sofreram infarto do miocárdio, indivíduos apenas com diabetes tipo 2, indivíduos que além de ter sofrido infarto do miocárdio também tinham diabetes tipo 2 e um grupo de controles saudáveis. Homozigotos TT para o SNP+276G>T tinham metade do risco de infarto do miocárdio, tanto

isoladamente quanto em associação com diabetes tipo 2 quando comparados com os portadores do alelo G (OR = 0,58, p = 0,01 e OR = 0,55, p = 0,006, respectivamente). Os SNPs-11.391G>A, SNP-11.377C>G e SNP+45T>G não apresentaram associação significativa com infarto em qualquer um dos três grupos caso (Chiodini B.D. et al. 2010).

Como foi possível observar nos estudos citados acima os polimorfismos do gene ADIPOQ já foram associados ao desenvolvimento de inúmeras doenças inclusive com a pré-eclâmpsia e hipertensão.

Nosso estudo foi o primeiro no Brasil a estudar os SNPs-11.391G>A, SNP-11.377C>G, SNP+45T>G e SNP+276G>T em gestantes com hipertensão arterial gestacional e pré-eclâmpsia e embora não tenhamos encontrado nenhuma relação entre os polimorfismos analisados e o desenvolvimento dessas patologias, dados da literatura corroboram com a idéia de que polimorfismos do gene ADIPOQ podem ser associados ao desenvolvimento da HAG e PE.

A busca por mecanismos celulares, vasculares e genéticos que possam elucidar a fisiopatologia dessas doenças talvez possa auxiliar na predição de quais mulheres apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento das mesmas, no sentido de aprimorar o acompanhamento médico, os cuidados com a gestante e o desenvolvimento de novos tratamentos.

Conclusão

8. Conclusão

Nosso estudo não observou nenhuma associação entre os genótipos e alelos dos polimorfismos -11391G>A, 11377C>G, 45T>G e 276G>T e as doenças hipertensivas gestacionais, sendo que o mesmo ocorreu com os haplótipos.

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

Avci, I., Ozerkan, K., Uncu, G. Serum adiponectin levels increase in lean preeclamptic women. *Prenat Diagn* 2010; 30: 91–92.

Brosens I.A, Robertson W.B, Dixon H.G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1972;1:177-91.

Carvalho, M H C. de; Colaco, A L; Fortes, Z B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab*; vol.50, n.2, p. 304-312. 2006.

Carvalho, M.H.C. de; Colaco, A.L.; Fortes, Z.B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 50, n. 2, Apr. 2006.

Chang, Y.C., Jiang, J.Y., Jiang, Y.D., Chiang, F.T., Hwang, J.J., Lien, W.P., Chuang, L.M. Interaction of ADIPOQ genetic polymorphism with blood pressure and plasma cholesterol level on the risk of coronary artery disease. *Circ J*; 3(10):1934-8. 2009.

Chen,G., Wilson, R., Wang, S. H., et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alfa) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin. Exp. Immunol.*, 104, 154-9. (1996).

Chesley, L. C., E. Talledo, C. S. Bohler, and F. P. Zuspan. Vascular Reactivity to Angiotensin II and Norepinephrine in Pregnant Women. *Am J Obstet Gynecol.* 91:837-42. (1965).

Chiodini BD, Specchia C, Gori F et al Adiponectin gene polymorphisms and their effect on the risk of myocardial infarction and type 2 diabetes: an association study in an Italian population. *Thromb Haemostasis* 4:223–230.2010.

Clapp, J. F., 3rd, and E. Capeless. Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol.* 80(11):1469-73. (1997).

Crawford DC, N. D. "Definition and clinical importance of haplotypes." *Annu Rev Med.* 56:303-20. 2005.

Filippi, E., Sentinelli, F., Trischitta, V., Romeo, S., Arca, M., Leonetti¹, F., Di Mario, U. and Baroni, M. G. Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *European Journal of Human Genetics* 12, 199–205.2004.

Fonseca, A., Miriam, H. et al . O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 50, n. 2, Apr. 2006.

Gaio, D.S., Schmidt M.I. Duncan B.B., Nucci L.B., Matos M.C. and Branchtein L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of Brazilian women. *Hypertens Pregnancy.* 20(3):269-81. (2001).

Gant, N. F., S. Chand, P. J. Whalley, and P. C. MacDonald. The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet Gynecol.* 43(6):854. (1974).

Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. World Health Organization International Collaborative Study of Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 158(1):80-3. (1988).

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, and Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1595–1599, 2000.

Hyttén, F. E., and D. B. Paintin. Increase in plasma volume during normal pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 70:402-7. (1963).

Jang Y, Chae JS, Koh SJ, Hyun YJ, Kim JY, Jeong YJ, Park S, Ahn CM, Lee JH. The influence of the adiponectin gene on adiponectin concentrations and parameters of metabolic syndrome in non-diabetic Korean women. *Clin Chim Acta.* May;391(1-2):85-90. 2008.

Jang, Y., Lee, J. H., Chae, J. S., Kim, O. Y., Koh, S.J., Kim, J. Y., Cho, H., Lee, J.E. and Ordovas, J.M. Association of the 276G>T polymorphism of the adiponectin gene with cardiovascular disease risk factors in nondiabetic Koreans. *Am J Clin Nutr*; 82:760 –7.2005.

Jazet I.M, Pijl H, Meinders A.E. Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance. *Neth J Med*; 61(6): p.194-212. 2003.

Kadowaki T, Yamauchi N.T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*; 116: p.1748-1792. 2006.

Kadowaki T, Yamauchi N.T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*; 116: p.1748-1792. 2006.

Kadowaki, T. and Yamauchi, T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocrine Reviews* 26(3):439–451. 2005.

Kershaw E.E, Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *JCEM*; 89(6): p.2548-2556. (2004).

Laurenti, R., M. H. P. M. Jorge, and S. L. D. Gotlieb. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. *Rev Bras Epidemiol* 7(4):449-460 (2004).

Leu, H.B, Chung, C.M, Lin, S.J, Jong, Y.S, Pan, W.H, et al. Adiponectin Gene Polymorphism Is Selectively Associated with the Concomitant Presence of Metabolic Syndrome and Essential Hypertension. *PLoS ONE* 6(5): e19999. 2011.

Lyall, F., J. N. Bulmer, et al. "Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide." *Am J Pathol* 154(4): 1105-14. (1999).

MacGillivray, I., G. A. Rose, and B. Rowe. Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci.* 37(2):395-407. (1969).

Matsuzawa Y, Funahashi T, Kihara S, and Shimomura I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 29–33, 2004.

Melistas, L., Mantzoros, C.S., Kontogianni, M., Antonopoulou, S., Ordovas, J.M. and Yiannakouris, N. Association of the C45TOG and C276GOT polymorphisms in the adiponectin gene with insulin resistance in nondiabetic Greek women. *European Journal of Endocrinology* 161 845–852. 2009.

Menzaghi, C., T. Ercolino, L. Salvemini, A. Coco, S. H. Kim, G. Fini, A. Doria, and V. Trischitta. Multigenic control of serum adiponectin levels: evidence for a role of the APM1 gene and a locus on 14q13. *Physiol Genomics* 19: 170–174, 2004.

Noris, M., N. Perico, et al. "Mechanisms of disease: Pre-eclampsia." *Nat Clin Pract Nephrol* 1(2): 98-114; quiz 120. (2005).

Ouchi N., Kihara S., Arita Y., et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*; 100:2473-6. 1999.

Zhu W., Cheng K. K. Y., Vanhoutte P. M., Lam K. S. L., Xu A. Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clinical Science*; 114, 361–374. 2008

Ouchi, N., Ohishi, M., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nagaretani, H., Kumada, M., Ohashi, K., Okamoto, Y., Nishizawa, H., Kishida, K., Maeda, N., Nagasawa, A., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Komai, N., Kaibe, M., Rakugi, H., Ogiwara, T., Matsuzawa, Y. Association of Hypoadiponectinemia With Impaired Vasoreactivity Hypertension. *Sep*;42(3):231-4 2003.

Page, E. W., and R. Christianson. Influence of blood pressure changes with and without proteinuria upon outcome of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 126(7):821-33. (1976).

Park, J.W., Park, J., Jee, S.H. ADIPOQ Gene Variants Associated with Susceptibility to Obesity and Low Serum Adiponectin Levels in Healthy Koreans. *Epidemiol Health*. 2011;33:e2011003.

Pober, J.S. and Cotran, R.S. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.*, 70, 427-51. (1990).

Pré-eclâmpsia: etiologia e prática clínica. Editado Fiona Lyal, Michael Belfort; Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., p:50-77, 2009.

Pridjian, G., and J. B. Puschett. Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv.* 57(9):598-618. (2002).

Ramsay, J. E., Jamieson, Greer, I. A. and Sattar, N. Paradoxical Elevation in Adiponectin Concentrations in Women With Preeclampsia. *Hypertension*; originally published online Sep 29, 42; p.891-894. 2003.

Redman, C. W. and I. L. Sargent. "Latest advances in understanding preeclampsia." *Science* 308(5728): 1592-4. (2005).

Roberts, J. M., R. N. Taylor, et al. "Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in the pregnancy syndrome preeclampsia." *Am J Hypertens* 4(8): 700-8. (1991).

Robson, S. C., S. Hunter, R. J. Boys, and W. Dunlop. Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy. *Am J Physiol.* 256(4 Pt 2):H1060-5. (1989).

Rovinsky, J. J., and H. Jaffin. Cardiovascular Hemodynamics in Pregnancy. I. Blood and Plasma Volumes in Multiple Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 93:1-15. (1965).

Saarela, T., Hiltunen, M., Helisalmi, S., Heinonen, S., Laakso, M. Adiponectin Gene Haplotype Is Associated with Preeclampsia. *Genetic Testing*. Vol.10, n. 1, 2006.

Saftlas, A. F., D. R. Olson, A. L. Franks, H. K. Atrash, and R. Pokras. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. *Am J Obstet Gynecol*. 163(2):460-5. (1990).

Sambrook J, R. D. M. C. (2001). "A Laboratory Manual." 3rd ed. New York: Cold spring Harbor.

Sandrim, V. C., A. C. Palei, et al. "Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia." *Hypertension* 52(2): 402-7. (2008).

Solomon, C.G., Graves, S.W., Greena, M.F. and Seely, E.W. Glucose intolerance as a predictor of hypertension in pregnancy *Hypertension*, 23,717-21. 1994.

Stehouwer C.D.A, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res*; 34: p.55-68. 1997.

Szmitko P.E, Teoh H., Stewart D.J., Verma S. Adiponectin and cardiovascular disease: state of the art? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H1655–H1663, 2007.

Tilg, H., Moschen. A.R. “Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity”. *Nature Reviews Immunology* 6, 772-783 (2006).

Vasconcelos MJA, A. M., Kahhale S, Peraçoli JC, Sass N, Ramos JG. "Hipertensão na Gravidez." *Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia*. (2002).

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, and Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1930–1935, 2001.

Xu, J., A. Turner, et al. "Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error?" *Hum Genet* 111(6): 573-4.2002.

Youpeng, B. Wei, X., Wei, L., Jin, J., Haiyan, Y., Yuan, Y., Rong, Z. Relationships among adiponectin gene polymorphisms, proteinuria and increased blood pressure in the context of placental diseases. *Hypertens Res.*;33(10):1066-70. 2010

Zintzaras, E. and J. Lau. "Synthesis of genetic association studies for pertinent genedisease associations requires appropriate methodological and statistical approaches." *J Clin Epidemiol* 61(7): 634-45.2008.

Anexos



Ribeirão Preto, 24 de julho de 2009

Ofício nº 2380/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE ADIPONECTINA E LEPTINA EM MULHERES COM PRÉ-ECLÂMPSIA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 291ª Reunião Ordinária realizada em 20/07/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5182/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROF. DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI
JACKELINE DE SOUZA RANGEL MACHADO (Aluna)
Depto. de Ginecologia e Obstetria

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: “Quantificação dos níveis de adiponectina e leptina em mulheres com pré-eclâmpsia”

Responsáveis:

Jackeline de Souza Rangel Machado

Prof. Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli – CREMESP 91.680

Prof. Dr. Sonir Antonini

Dra. Valéria Cristina Sandrim

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos (FMRP-USP) – CREMESP
84.966

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

Este projeto pretende estudar o que acontece com as concentrações de substâncias importantes para o controle da pressão sanguínea ao longo de sua gravidez.

Sua participação neste estudo será:

Serão coletados 10 mL do seu sangue por punção venosa utilizando técnica adequada. Este volume de sangue é cerca de 20 (vinte) vezes menor do que o volume de sangue habitualmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Este sangue será utilizado para realizar as medidas das substâncias importantes na regulação da pressão sanguínea durante a gestação. Este estudo não comprometerá em nada a conduta médica e os procedimentos padrões realizados durante sua gestação.

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

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

Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetida. Qualquer questão a respeito do estudo ou de sua saúde deve ser dirigida ao Dr. Ricardo de Carvalho Cavalli (telefone 0xx16 36022588), do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) ou à Pós-Graduanda Jackeline Rangel (telefone 0xx16 3602-2804, 0xx16 3602-2231) do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP é 016-3602-2228.

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

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

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Paciente

Ricardo de Carvalho Cavalli / Jackeline Rangel

Testemunha

