

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Francielle Marques Araujo

“Ocorrência Familiar e Associação de Polimorfismos
dos Genes *H19* e *IGF2* com as Síndromes
Hipertensivas Gestacionais”

Ribeirão Preto

2007

Francielle Marques Araujo

"Ocorrência Familiar e Associação de Polimorfismos
dos Genes *H19* e *IGF2* com as Síndromes
Hipertensivas Gestacionais"

Dissertação apresentada ao Departamento de
Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto como pré-requisito para obtenção do
Título de Mestre em Biologia da Reprodução.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Ribeirão Preto

2007

Araujo, Francielle Marques.

Ocorrência Familiar e Associação de Polimorfismos dos Genes *H19* e *IGF2* com as Síndromes Hipertensivas Gestacionais / Francielle Marques Araujo; Orientadora Profa Dra Ester Silveira Ramos. Ribeirão Preto, 2007.

116p. il.; 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Biologia da Reprodução), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

Título em inglês: Familial Occurrence and *H19* and *IGF2* Polymorphism Association with Gestational Hypertensive Disorders.

1- Familiar, 2- Gene *H19*, 3 - Gene *IGF2*, 4 - *Imprinting* genômico,
5 - Síndromes hipertensivas gestacionais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Francielle Marques Araujo

Ocorrência familiar e associação de polimorfismos dos genes *H19* e *IGF2* com as síndromes hipertensivas gestacionais.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre.
Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia

Aprovada em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Dedico àqueles que deram tudo o que tinham
por mim:
meus pais ,Vicente e Maria José
meus irmãos, Jefferson e Gisele

AGRADEÇO

A **DEUS**, pela minha vida.

À Profa Dra Ester Silveira Ramos, pela paciência nas horas mais lentas, pelos ensinamentos, confiança, conselhos e orientação. Muito obrigada!!!

Ao Prof Dr Geraldo Duarte pelas ótimas conversas, preciosas sugestões, grandes ensinamentos, agradável convivência e amizade.

Ao Prof Dr Raysildo Barbosa Lôbo e à Profa Dra Lucia Regina Martelli pela convivência e ensinamentos.

Aos membros da banca que auxiliaram na redação final deste trabalho com sugestões importantes.

Aos demais professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP pelos ensinamentos e carinho demonstrado durante o mestrado.

Aos amigos do Bloco C do Departamento de Genética da FMRP-USP pela convivência e ajuda no desenvolvimento do trabalho, tornando agradável o ambiente de trabalho. Em especial às "Flores" Christina, Fernanda, Flávia, Juliana Meola, Luciana, Paulinha.

Às irmãs de coração Adriane e Lisandra pelo companheirismo, dedicação, ajuda, conversas, por estarem sempre por perto quando mais preciso.

Ao Marquinhos pelas idéias, sugestões, conselhos e ao Murilo pela preciosa ajuda na parte molecular do trabalho e pelos agradáveis momentos de descontração.

Aos técnicos do Bloco C, Marli, Reginaldo, Silvio, Luis e Paulo, pelos ensinamentos, ajuda e fundamental colaboração para a realização deste trabalho.

À Dona Júlia pelo carinho e conversas no início de tudo e à Dona Elizete pela convivência agradável e pelo chá nas horas de estresse.

À Ana Karina que sempre me incentivou e me ensinou os primeiros passos no Laboratório de Molecular. Obrigada por tudo!!!

À Cintia pela amizade dedicada mesmo à distância e pela realização das análises estatísticas finais. Ao Jeferson pelas análises estatísticas da primeira parte do trabalho.

Às secretárias da pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, Ilza que me recebeu tão bem, sempre com palavras certas nas horas incertas e à Taísa pela ajuda e apoio na reta final. Vocês são especiais!!!

Aos demais funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Às "meninas" do Centro Obstétrico, Rosângela, Lucinha, Adriana, Carol, Célia, Mira, Sandra, Caritas, Diva, Edimaura, Luciana, Maria Ângela, Maria José, Néia, Neide, Simone, Vitória, pessoas importantes para mim nestes anos que desempenham seu trabalho com carinho e dedicação e mesmo na correria do dia a dia lembravam de me ajudar, além dos agradáveis momentos de alegria e descontração na presença de vocês. O que seria de mim sem vocês... muito obrigada!!!!

Às enfermeiras e auxiliares da enfermagem do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela ajuda nos momentos que mais precisei.

Às pacientes que compartilharam comigo informações importantes para a realização deste trabalho. Que me deram atenção em um momento bonito e às vezes difícil de suas vidas. Muito obrigada!!!!

Aos amigos da pós-graduação da Ginecologia e Obstetrícia, Daniel Sakabe, Janaina, Mali, pela força, apoio, companherismo desde o início. Aos demais alunos, Alessandra Vireque, Ana Carolina, Conrado, Elisa, Emilia, Ivan, Julio Cesar, Lauriane, Liana, Luciana Abreu, Luciana Duarte, Márcia, Rodolpho, pela torcida, carinho e convivência nestes anos.

Ao Dr Rafael pelos ensinamentos, conversas, discussões e importante ajuda no recrutamento das pacientes.

Aos residentes e alunos que passaram pelo centro obstétrico e ambulatório (AGAR) e me ajudaram na realização deste trabalho.

As auxiliares de enfermagem do Centro Cirurgico da FMRP-USP pela ajuda na coleta das placentas.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) e do Arquivo Semi-ativo (ASA) pelo auxílio no levantamento dos prontuários das pacientes.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, professores, funcionários e colegas de graduação, pelos ensinamentos que me ajudaram a buscar os meus sonhos. Em especial à "gangue": Jupy's, Baiana (*in memoriam*) e Val, pela amizade, alegres momentos juntos e pela presença (mesmo distante) até os dias de hoje.

As meninas, companheiras de república, que fizeram parte da "minha família" em Ribeirão Preto, Renata (amiga de todas as horas), Mariana, Juliana (sempre presente), Daniela, Kelly Cristina (sempre disposta a me ouvir), Fernanda e Paula. Obrigada por me ouvirem e me entenderem nos momentos mais difíceis.

À Alessandra Marcolin e Flávia Meziara pela amizade, conselhos, torcida, oportunidades e momentos alegres que me proporcionaram. Vocês são muito importantes para mim.

Aos meus amigos de Passos "city", em especial Graciela, José Ivan, Luciana, Mara, Simoni que entenderam minha ausência em alguns momentos e sempre me deram força, torcendo por mim.

Aos meus pais pelo exemplo de vida, apoio, conselhos, confiança acima de tudo. À minha irmã Gisele por estar sempre presente, abdicando de seu sonhos por mim e em especial ao meu irmão Jefferson, obrigada por você existir, foi você quem me trouxe até aqui. Obrigada pelo amor incondicional de vocês.

Aos meus familiares de Passos, Belo Horizonte e Franca que sempre torceram por mim. Em especial ao Tio Milton e à Tia Lina (pais de coração), Aires e Nely.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA) pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que participaram de uma forma ou de outra para a realização deste trabalho, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal.

"Viva como se hoje fosse o último dia
Aprenda como se fosse viver para sempre..."

(Ghandi)

RESUMO

ARAÚJO, F. M. Ocorrência Familiar e Associação de Polimorfismos dos Genes *H19* e *IGF2* com as Síndromes Hipertensivas Gestacionais. 2007. 116f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

As síndromes hipertensivas gestacionais [Pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE/E), hipertensão gestacional (HG) e hipertensão arterial crônica (HAC)] estão entre as maiores causas de morte materna e fetal. A PE é a mais prevalente dessas síndromes e o papel dos fatores genéticos na sua etiologia é bem aceito, embora o padrão de herança seja ainda assunto para debate. Os genes *H19* e *IGF2* sofrem *imprinting* (marcação) genômico e estão envolvidos na formação placentária e no desenvolvimento fetal. O objetivo do presente trabalho foi a pesquisa de ocorrência familiar e da associação com os polimorfismos *H19/RsaI* e do *IGF2/ApaI* das síndromes hipertensivas gestacionais e do peso do recém-nascido. Todas as pacientes do estudo foram atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética deste hospital e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Para a condução do estudo familiar foram selecionadas 226 mulheres (75 apresentavam PE, 49 com HG e 102 do grupo controle). Os dados foram analisados pelos Testes Exato de Fisher e do Qui-quadrado, resultando em uma maior frequência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de parentes de primeiro-grau com PE/E entre o grupo de PE/E comparado aos outros grupos. Não foi observada influência da “cor da pele” na distribuição entre os grupos de pacientes. Para a pesquisa de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição *H19/RsaI* (alelos A e B) e *IGF2/ApaI* (alelos A e G) através da reação em cadeia da polimerase, foi extraído DNA de sangue periférico de 236 pacientes (55 apresentavam PE, 40 com HG, 34 com HAC e 107 do grupo controle). Os resultados, analisados através dos Testes do Qui-quadrado e G, não mostraram associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos e as síndromes hipertensivas gestacionais ou HAC. Houve uma maior frequência do alelo G na população estudada. Foi observado que em torno de 80% das pacientes dos quatro grupos estudados apresentou pelo menos uma cópia do alelo B e uma do alelo G, concomitantemente. A associação do peso do recém-nascido com os polimorfismos foi analisada utilizando-se os Testes Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) e os Não-paramétricos de Kruskal-Wallis (a

P<0,05), não tendo sido evidenciadas diferenças estatisticamente significativas. No grupo da PE houve uma diminuição estatisticamente significativa do peso dos recém-nascidos quando não havia correção para a idade gestacional. Embora não tenha sido evidenciada correlação entre os polimorfismos e os fenótipos estudados, trabalhos futuros com um número amostral maior serão importantes para auxiliar no entendimento do envolvimento de fatores epigenéticos nas síndromes hipertensivas gestacionais e fornecer indícios para a prevenção, o tratamento e o aconselhamento genético.

Palavras-chave: Síndromes hipertensivas gestacionais, familiar, *imprinting* genômico, gene *H19*, gene *IGF2*.

ABSTRACT

ARAÚJO, F. M. Familial Occurrence and *H19* and *IGF2* Polymorphism Association with Gestational Hypertensive Disorders. 2007. 116p. Dissertation (Master's degree) - University of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Gestational hypertensive disorders [preeclampsia/eclampsia (PE/E), gestational hypertension (GH) and chronic hypertension (CH)] are among the largest causes of maternal and fetal death. PE is the more prevalent of those syndromes and the role of the genetic factors in its etiology is well accepted, although the pattern of inheritance is still subject for debate. The imprinted genes *H19* and *IGF2* are involved in the placental formation and in the fetal development. The objective of the present study was to verify the familial occurrence of these disorders and the *H19/RsaI* and *IGF2/ApaI* polymorphism association with gestational hypertensive disorders and the weight of the newborn. All patients of the study were referred to the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, and the project was approved by the Hospital Ethic Committee and the National Commission of Ethics in Research. For the familial study, 226 women were selected (75 presented PE/E, 49 with GH and 102 from the control group). The data were analyzed by Exact of Fisher and Qui-square tests, and the frequency of families with at least one female first-degree relative (mothers and/or sisters) with PE/E was higher among the PE/E group compared to the other groups, and it was statistically significant ($P < 0.05$). There was no statistically significant influence of the "skin color". Blood samples of 236 pregnant women (55 with PE/E, 40 with GH, 34 with CH and 107 from the control group) were obtained for DNA extraction, and PCR. Genotyping was carried out by enzymatic digestion with *ApaI* (*IGF2*) and *RsaI* (*H19*). The statistical analyses were performed by Qui-square and G tests. The genotypes were not significantly associated with the different groups. A higher frequency of the G allele (*IGF2*) was observed. Around 80% of the patients presented at least one copy of the allele B (*H19*) and G (*IGF2*), concomitantly. The association of the weight of the newborn with the polymorphisms was analyzed using the Kolmogorov-Smirnov ($P < 0.05$) and the Non-parametric Test of Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) tests, and statistically significant differences were not evidenced. In the group of the PE/E there was a statistically significant decrease of

the weight of the newborn when the correction for the gestational age was not carried out. Although correlation has not been evidenced between the polymorphisms and the phenotypes, future studies with a higher number of patients and other imprinted genes will be important to elucidate the involvement of epigenetic factors for the prevention, treatment and genetic counseling of the gestational hypertensive disorders..

Keyword: Gestational Hypertensive Disorders, familial, genomic imprinting, *H19* gene, *IGF2* gene.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
	1.1 Classificação da hipertensão arterial na gestação	25
	1.2 Pré-eclâmpsia.....	27
	1.3 Aspectos genéticos da pré-eclâmpsia/eclampsia	30
	1.4 <i>Imprinting</i> (marcação) genômico e pré-eclâmpsia/eclampsia	32
	1.5 A região cromossômica 11p15.5	37
	1.6 O gene <i>H19</i>	40
2	OBJETIVOS	43
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	45
	3.1 Aspectos éticos do projeto	46
	3.2 Seleção de pacientes	46
	3.3 Estudo familiar.....	47
	3.4 Análise molecular	47
	3.4.1 Coleta de material	48
	3.4.2 Extração de DNA.....	48
	3.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	49
	3.4.4 Polimorfismo <i>IGF2/ApaI</i>	50
	3.4.5 Polimorfismo <i>H19/RsaI</i>	50
	3.5 Análise estatística	51
4	RESULTADOS	52
	4.1 Descrição do grupos.....	53
	4.2 Estudo familiar.....	53
	4.3 Polimorfismo <i>H19/RsaI</i>	57
	4.4 Polimorfismo <i>IGF2/ApaI</i>	58

4.5	Análise estatística	59
4.6	Gene <i>H19</i>	59
4.7	Gene <i>IGF2</i>	62
4.8	Associação entre os genótipos dos genes <i>H19</i> e <i>IGF2</i>	63
4.9	Combinações de genótipos	65
4.10	Análise do peso dos recém-nascidos	68
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÃO	80
	BIBLIOGRAFIA	82
	ANEXOS	102
	APÊNDICES	105

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Interação entre os prováveis fatores envolvidos na PE.....29
- Figura 2 – Padrão do *imprinting* genômico durante o desenvolvimento humano.....34
- Figura 3 – Esquema de genes que sofrem “*imprinting*”. As regiões CpG são mostradas pelas setas. O sítio das mudanças epigenéticas alelo-específicas, como condensação nucleossomal através da desacetilação e metilação (alelo 1) e liberação da cromatina por acetilação e demetilação também são mostrados.....36
- Figura 4 – Hipótese de que um gene *E* “marcado” paternalmente (materno ativo) expresso no feto sofre mutação na pré-eclâmpsia.....38
- Figura 5 – Herdogramas representando parentes afetadas de primeiro-grau das pacientes com PE/E (A e B) e herdogramas evidenciando provável efeito paterno (C-E).....57
- Figura 6 – Genotipagem através do RFLP *H19/RsaI*.....58
- Figura 7 – Genotipagem através do RFLP *IGF2/ApaI*.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das pacientes nos grupos de estudo de acordo com a classificação étnica/racial adotada no HCFMRP-USP.....	52
Tabela 2 - Distribuição das pacientes com PE/E e HG em relação à classificação étnica/racial adotada no HCFMRP-USP. Os valores esperados encontram-se entre parênteses.....	54
Tabela 3 - Ocorrência de PE/E e HG em parentes femininos de primeiro grau das pacientes.....	55
Tabela 4 - Análise estatística das famílias utilizando-se o Teste Exato de Fisher.....	56
Tabela 5 - Ocorrência de PE/E ou HG entre sogras e/ou cunhadas.....	56
Tabela 6 - Grupos de estudo, idade média materna, idade média gestacional, peso médio dos recém-nascidos	59
Tabela 7 - Frequências genótípicas para <i>H19</i> para todos os grupos em conjunto.....	59
Tabela 8 - Frequências gênicas do <i>H19</i> para os quatro grupos de estudo.....	60
Tabela 9 - Frequência dos genótipos do <i>H19</i> para PE/E, HAC, HG. Os valores esperados encontram-se entre parênteses.....	60
Tabela 10- Associação do genótipo do <i>H19</i> com a PE/E em relação ao grupo controle.....	61
Tabela 11 - Frequências genótípicas para o gene <i>IGF2</i>	62
Tabela 12 - Frequências gênicas do <i>IGF2</i> para os quatro grupos de estudos.....	62

Tabela 13 - Frequências gênicas do <i>IGF2</i>	63
Tabela 14 - Associação entre as frequências relativas dos genótipos <i>H19</i> (vertical) e <i>IGF2</i> (horizontal). Os valores esperados encontram-se entre parênteses.....	64
Tabela 15 - Frequências relativas das combinações de <i>H19</i> e <i>IGF2</i> entre os grupos de HAC, HG e PE/E Os valores esperados encontram-se entre parênteses.....	65
Tabela 16 - Classes de idade gestacional para o gene <i>H19</i>	68
Tabela 17 - Classes de idade gestacional para o gene <i>IGF2</i>	69
Tabela 18 - Peso dos recém-nascidos com e sem correção para idade gestacional em relação ao genótipo <i>IGF2</i>	70

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Distribuição dos casos de pré-eclâmpsia/eclampsia (PE/E) nas combinações de genótipo para *H19* e *IGF2*.....66
- Gráfico 2 – Distribuição dos casos de hipertensão gestacional (HG) nas combinações de genótipo para *H19* e *IGF2*.....66
- Gráfico 3 – Distribuição dos casos de hipertensão arterial crônica (HAC) nas combinações de genótipo para *H19* e *IGF2*.....67
- Gráfico 4 – Distribuição dos genótipos *H19* e *IGF2* no grupo controle.....67

LISTA DE ABREVIATURAS

AGAR - Ambulatório de Gestação de Alto Risco

CDKN1C - do inglês *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C* (inibidor de quinase dependente de ciclina 1C)

C. O. - Centro Obstétrico

CONEP - Comitê Nacional de  tica em Pesquisa

CTCF - do inglês *CCCTC binding factor* (fator de ligação)

DNA -  cido desoxiribonucleico

DMR - do inglês *differential methylated region* (região diferencialmente metilada)

DNMT - do inglês *DNA methyltransferase* (metiltransferase de DNA)

dNTP - desoxinucleotideo trifosfato

EDTA –  cido etilenodiaminotetraacético

HAC - hipertensão arterial crônica

HCFMRP- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

H19 - gene supressor tumoral

H19DMR - do inglês *H19 differential methylated region* (região diferencialmente metilada do H19)

HG – hipertensão gestacional

H4 – histona H4

H3 – histona H3

IGF2 - do inglês *Insulin-like growth factor 2* (fator de crescimento semelhante   insulina 2)

KvLQT1 – do inglês K^+ *channel voltage-gated Long* QT1 (canal de potássio do QT longo)

LIT1 – do inglês *Long Intronic Transcript* (transcrito anti-sense do gene KvLQT1)

Mgcl2 – cloreto de magnésio

NaCl – cloreto de sódio

NHBPEP - *National High Blood Pressure Education Program*

p – braço curto do cromossomo

pb – pares de bases

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PE/E – pré-eclâmpsia/eclâmpsia

PROC FREQ – estatística de frequência

RFLP – do inglês *Restriction Fragment of Length Polymorphism* (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição)

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

USP - Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

mmHg – milímetro de mercúrio

µg – micrograma

mg – miligrama

µL – microlitro

mL – mililitro

M – molar

mM – milimolar

% - porcentagem

U - unidade

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é um sério problema de saúde pública em todo o mundo, acometendo pessoas independente da raça, idade ou sexo (PAHO, 1998). Em 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a hipertensão arterial como “uma doença caracterizada por elevação crônica da pressão arterial sistólica e/ou pressão arterial diastólica” e classificou-a em primária ou essencial, para a qual não existe causa orgânica evidente e secundária. Esta seria decorrente de administração de drogas (contraceptivos orais, hormônios da adrenal, dentre outras), gravidez, doença cardiovascular como coarctação da aorta, doença renal, doença das adrenais.

A hipertensão arterial que se desenvolve no ciclo gravídico-puerperal é denominada de hipertensão gestacional ou pré-eclâmpsia/eclâmpsia (SIBAI, 1999). A pré-eclâmpsia pode se desenvolver em gestantes com hipertensão arterial crônica, sendo denominada pré-eclâmpsia sobreposta (NHBPEP, 2000).

A hipertensão gestacional e a pré-eclâmpsia/eclâmpsia fazem parte do grupo das síndromes hipertensivas gestacionais e contribuem significativamente para o nascimento de natimortos e para a mortalidade e a morbidade neonatais (ACOG, 1996). Na América Latina e no Caribe elas representam a maior causa de óbito materno. No Brasil, estima-se que 20 a 30% das mortes maternas estejam associadas às síndromes hipertensivas gestacionais (KHAN et al., 2006).

A frequência total destas síndromes apresenta grande variação na literatura, sendo estimada entre 2 e 35% (CAMPBELL; MACGILLVRAY; CARR-HILL, 1985; SAFTLAS et al., 1990; SAMADI et al., 1996). Essa discrepância se deve, em parte, à heterogeneidade na classificação e às diferentes definições utilizadas.

1.1 Classificação da hipertensão arterial na gestação

A primeira classificação das síndromes hipertensivas foi proposta por Williams em 1912. O American Committee of Maternal Welfare introduziu algumas modificações em 1940 e o American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) publicou nova definição na década de 70, até hoje aceita (ERKKOLA,1997).

Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia e controle dos distúrbios hipertensivos da gravidez, a literatura médica ainda é controversa em relação à sua definição, classificação e nomenclatura.(REDMAN; JEFERIES, 1988; EKHOLM, 1997; HELEWA et al., 1997; NORTH; RENNAE; SCHELENBERG, 1999; STEER, 1999; DAVEY; MACGILLIVRAY, 2000; LEVINE et al., 2000; HARLOW; BROWN, 2001; HIGGINS; SWIET, 2001; PERAÇOLI et al., 2001). A classificação mais recente foi apresentada pelo National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP), em 2000, relatada a seguir:

a) Hipertensão Arterial Crônica (HAC) - definida como hipertensão de qualquer etiologia, precedendo a gestação ou diagnosticada antes da 20ª semana de gestação. A hipertensão é definida quando a pressão sistólica é ≥ 140 mmHg e/ou a pressão diastólica ≥ 90 mmHg. Hipertensão diagnosticada pela primeira vez durante a gestação e que persiste no pós-parto é também classificada como hipertensão arterial crônica;

b) Pré-eclâmpsia/Eclâmpsia (PE/E) - é uma síndrome específica do ciclo gravídico-puerperal que surge após a 20ª semana de gestação. É determinada por aumento da pressão sanguínea (pressão sistólica/diastólica $\geq 140/90$ mmHg) acompanhada por proteinúria. Sua caracterização é determinada em pacientes normotensas antes da 20ª

semana. A proteinúria é considerada significativa para este diagnóstico quando ≥ 300 mg em urina de 24 horas, na ausência de infecção urinária, sangue, corpos cetônicos. De forma geral, esta medida corresponde a cifras ≥ 300 mg/litro em amostra isolada de urina ou a uma cruz em urina de tipo 1. Caracteriza-se como eclâmpsia a ocorrência de convulsões não atribuídas a outras causas, em pacientes com PE. Presença de edema e do acréscimo de 30/15 mmHg nas pressões sistólica/diastólica não fazem parte dos critérios diagnósticos da PE nesta nova classificação, mas são considerados indicativos de cuidados, principalmente na presença de proteinúria;

c) Hipertensão arterial crônica com pré-eclâmpsia sobreposta – existem claras evidências que a pré-eclâmpsia talvez ocorre com maior frequência em mulheres que apresentam hipertensão arterial crônica prévia à gestação. Este diagnóstico é baseado no aumento da pressão arterial e do aparecimento de proteinúria maior que 300mg/24horas. A sobreposição do processo específico da gestação com a HAC previamente instalada é uma complicação cujo prognóstico materno-fetal é pior do que qualquer das duas complicações isoladamente;

d) Hipertensão gestacional - elevação da pressão arterial na segunda metade da gestação, mas sem desenvolvimento de proteinúria é considerada hipertensão gestacional. Este diagnóstico inespecífico pode ser temporário e identificar gestantes com PE que ainda não desenvolveram proteinúria. Deve-se ficar atento quanto à possibilidade da paciente apresentar outros sinais, muitas vezes requerendo intervenção. A determinação final deste diagnóstico pode ser feita só após 12 semanas do término da gravidez, sendo denominada de hipertensão transitória da gravidez. Se a hipertensão persiste, a paciente é considerada hipertensa crônica.

1.2 Pré-Eclâmpsia

A PE é o maior problema obstétrico mundial (SAFTLAS, et al., 1990), reconhecida na antiguidade como uma das principais causas de mortalidade materna e perinatal (CHESLEY, 1978), que afeta em torno de 10% das gestantes dependendo da população estudada e da definição utilizada (DEKKER; SIBAI, 1998).

Apesar de muitos estudos focando a PE, sua etiologia é desconhecida. É denominada de “doença das teorias”, refletindo a confusão que envolve suas causas e fisiopatologia (ROBERTS, 1998), sendo mais freqüente em primigestas ou em gestação gemelar (SAFTLAS et al., 1990). Muito tempo, dinheiro e esforços são gastos para identificar este problema clínico antes que complicações mais sérias aconteçam (ARNGRIMSSON, 2005).

Fatores de risco para PE incluem a história prévia de PE, primiparidade, obesidade, história familiar de PE, gestação múltipla, condições médicas crônicas tais como hipertensão ou diabetes e a trombofilia. Paradoxalmente, a nicotina reduz o risco (DUCKITT; HARRINGTON, 2005). Embora a PE se desenvolva a qualquer momento depois da 20ª semana de gestação, o início precoce da doença é grave e caracterizado por taxas maiores de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional e de recorrência da doença quando se compara com o início tardio da mesma (REDMAN; SARGENT, 2005).

A PE parece ser conseqüente a um defeito na placentação caracterizado pela incapacidade do trofoblasto se diferenciar (LIM et al., 1997), resultando em invasão superficial da decídua e modificação da artéria espiral (BROSENS; ROBERTSON; DIXON, 1972). Estudos indicam que os efeitos desta síndrome são mais sistêmicos do que

o previamente assumido, com mudanças isquêmicas ocorrendo no cérebro, rim e fígado das pacientes (ROBERTS; REDMAN, 1993). Efeitos adicionais incluem dano celular endotelial grave (ROBERTS, 1998) e possível ativação do sistema imune materno (REDMAN; SACKS; SARGENT, 1999). É considerado que a PE talvez seja uma forma de rejeição imune materna aos fatores fetais (MOFFETT-KING, 2002).

A placenta é de importância crítica para o desenvolvimento e crescimento do embrião e feto nos mamíferos placentários. Muitos tipos celulares deste órgão surgem precocemente no desenvolvimento, começando com a diferenciação do trofotoderma e células do endoderma extraembrionário antes da implantação do blastocisto (ROSSAN; CROSS, 2001).

A PE pode ser o resultado de mudanças patológicas no desenvolvimento placentário com subsequente disfunção celular endotelial, que explicaria seus sinais clínicos (WILSON et al., 2002).

Uma antiga idéia de que a PE talvez seja uma doença placentária é refletida no primeiro nome da doença: toxemia gravídica. Acreditava-se que a PE era causada por toxinas liberadas da placenta na circulação sanguínea materna. Mais recentemente, a literatura sugere que os agentes tóxicos talvez sejam debris de células apoptóticas ou fatores circulantes da placenta (SARGENT et al., 2003; LEVINE et al., 2004). Estes agentes causam disfunção endotelial materna característica da hipertensão na gestação (ROBERTS; REDMAN, 1993).

Além da susceptibilidade genética há outros três fatores importantes (DEKKER; SIBAI, 1998; DEKKER, 1999; ROBERTS, 2000) que podem estar envolvidos no desenvolvimento da PE que são a adaptação imune deficiente, a isquemia placentária e o estresse oxidativo, sendo que estes fatores não são mutuamente exclusivos (Figura 1):

a) Adaptação imune deficiente – a PE talvez resulte de uma resposta imune materna anormal aos antígenos paternos. A evidência desse envolvimento no desenvolvimento da PE vem da pesquisa imunológica envolvendo as seguintes observações: 1) o risco de PE diminui após a primeira gestação, 2) este risco pode aumentar se há mudança de parceiro, 3) aborto ou transfusão sanguínea protege contra PE, 4) inseminação artificial com doador e doação de oócito levam a um aumento no risco de PE, 5) aumento da exposição ao sêmen (por exemplo: período de coabitação, utilização de contraceptivo oral) pode ser um fator protetor (WILSON et al., 2002);

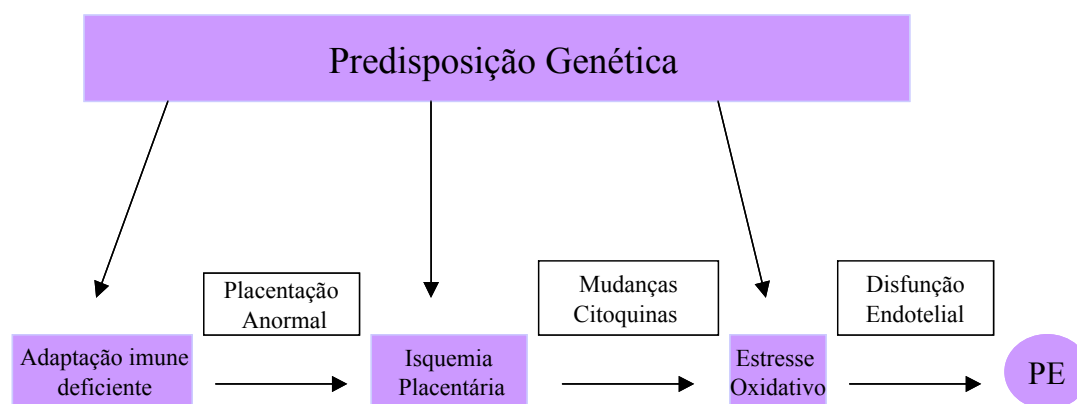


Figura 1 – Interação entre os prováveis fatores envolvidos na PE (modificado de WILSON et al., 2002). PE: Pré-eclâmpsia.

b) Isquemia Placentária – na PE, a invasão trofoblástica e subsequente remodelamento da artéria espiralada são deficientes, resultando na diminuição do diâmetro da mesma, o que determina isquemia placentária em mulheres que eventualmente podem

desenvolver os sinais clínicos da PE (WILSON et al., 2002). A pressão sanguínea elevada na PE é devida principalmente à alteração na vasodilatação característica da gestação normal, substituída por aumento nos marcadores da resistência vascular periférica (NEED, 1975; ESPLIN et al., 2001).

c) Estresse Oxidativo - causado por desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é gerado na placenta e transferido à circulação sistêmica, resultando em danos endoteliais nas células. A interação de componentes maternos, particularmente neutrófilos e lipídios susceptíveis à oxidação, com células placentárias e fatores derivados da placenta induzem ao estresse oxidativo que causa disfunção celular e manifestações clínicas da PE (HUBEL, 1999; WILSON et al., 2002).

1.3 Aspectos Genéticos da Pré-eclâmpsia/Eclâmpsia

Chesley, Cosgrove e Annitto (1961) foram pioneiros em propor que a PE tem forte componente familiar, ao descreverem um aumento acentuado na incidência da PE na primeira gestação de irmãs e filhas de mulheres eclâmpicas, quando comparadas à população controle. Também foi observado que o risco era maior para as filhas nascidas de uma gestação pré-eclâmpica em relação a irmãs que nasceram de uma gestação normal (COOPER et al., 1988). Outros autores descobriram aumento no risco para todas as filhas nascidas de mãe com história de PE (ARNGRIMSSON et al., 1990; MOGREN et al., 1999). O aumento na incidência da doença é observado em parentes geneticamente relacionados de

mulheres afetadas comparadas a parentes por casamento, implicando no envolvimento do genótipo materno (SUTHERLAND et al., 1981; ARNGRIMSSON; BJORNSSON; GEIRSSON, 1995).

Embora o papel dos fatores genéticos na etiologia da PE seja bem aceito, o padrão de herança é ainda assunto para debate. Alguns pesquisadores sugerem que a susceptibilidade para a PE pode ser herdada através de um único gene autossômico recessivo (COOPER; LISTON, 1979; SUTHERLAND et al., 1981; CHESLEY; COOPER, 1986; ARNGRIMSSON et al., 1990; CHESLEY, 1993) ou um gene dominante com penetrância incompleta (ARNGRIMSSON et al., 1990; CHESLEY, 1993; ARNGRIMSSON et al., 1994; DEKKER; SIBAI, 1999). Também foi sugerido que a susceptibilidade à PE é devida a interações complexas entre dois ou mais genes maternos, fatores ambientais e genótipo fetal (ARNGRIMSSON et al., 1997; MOGREN et al., 1999; BROUGHTON, 1999; WALKER, 2000), uma combinação de contribuição genética materna, fetal e paterna (através do feto) (LIE et al., 1998; KILPARTICK, 1999) ou interações materno-fetais (LISTON; KILPATRICK, 1991; KILPARTICK, 1999).

Um modelo genético para uma condição que é restrita à gestação deve incluir, em princípio, componentes da mãe e do feto (MORGAN et al., 1999). Muitos estudos genéticos da PE e doenças relacionadas se centralizam na susceptibilidade materna, tentando identificar alterações genéticas que talvez causem ou aumentem o risco para a condição. Os primeiros estudos familiares sustentaram a hipótese de que um único gene poderia estar envolvido. Mais tarde, segregação mais complexa e estudos epidemiológicos levaram à compreensão de que o modelo familiar pode ser melhor explicado pela interação materno-fetal, com contribuição de ambos os componentes da gestação (LIE et al., 1998).

Há grupos que sugerem um componente fetal (paterno) para susceptibilidade à PE. Por exemplo, a associação entre PE e anormalidades cromossômicas fetais dá embasamento para uma contribuição fetal na etiologia (BOYD; LINDENBAUM; REDMAN, 1987), assim como a observação de que o risco de desenvolver PE é maior em mulheres com mola hidatiforme completa, que são de origem paterna (GOLDSTEIN; BERKOWITZ, 1994). Além do mais, o pequeno, mas estatisticamente significativo aumento da incidência entre noras de casos índices (ARNGRIMSSON et al., 1990) e a observação de que homens nascidos de gestação pré-eclâmptica têm maior probabilidade de serem pais em uma gestação pré-eclâmptica que os controles (ESPLIN et al., 2001) também dão subsídios à idéia da contribuição fetal/paterna para o risco.

Parece provável que um gene possa ser responsável por todos os riscos nas mulheres e que polimorfismos em um número de genes possa afetar o risco da PE. Os genes específicos envolvidos talvez dependam, pelo menos em parte, das características da população estudada como etnia, gravidade da doença, idade materna ou idade gestacional do início do quadro (WILSON et al., 2002).

1.4 *Imprinting* (marcação) genômico e Pré-eclâmpsia/Eclâmpsia

Mecanismos epigenéticos (modulação herdável da expressão gênica que não altera a seqüência de DNA) possuem importante papel em grande número de doenças humanas, incluindo síndromes complexas, doenças multifatoriais e câncer (WALTER; PAULSEN, 2003).

O *imprinting* genômico é um tipo de marcação epigenética do genoma de um organismo diplóide com a sua respectiva origem parental, onde apenas um dos alelos herdados (materno ou paterno) é expresso de forma específica para o tecido e estágio do desenvolvimento (PAULSEN; SMITH-FERGUSON, 2001; WALTER; PAULSEN, 2003; ARNEY, 2003).

A regulação apropriada dos genes “marcados” requer que as modificações alelo-específicas sejam reiniciadas em cada geração para refletir o sexo de um dos pais. Marcações são estabelecidas durante o desenvolvimento das células germinativas no interior de espermatozóides ou oócitos. Após a fertilização, esse padrão de marcação é mantido nas células somáticas do novo organismo, mas em suas células germinativas primordiais essa marcação é apagada e um novo padrão de *imprinting* sexo específico é determinado e mantido nos gametas maduros do indivíduo (REIK; WALTER, 2001) (Figura 2).

Em mamíferos, muitos genes “marcados” estão envolvidos no controle do crescimento fetal e são expressos em ambos os tecidos placentário e fetal. Na placenta, estes genes regulam o crescimento e a transferência de nutrientes (CONSTANCIA et al., 2002).

Se genes que sofrem *imprinting* são cruciais no desenvolvimento de mamíferos, pode se esperar que alterações nestes genes causem doenças e que as mesmas talvez sejam reconhecidas por sua exclusiva transmissão materna ou paterna na família. Existem várias doenças causadas por alterações do *imprinting* (MORISON; PATON; CLEVERLEY, 2001), muitas das quais afetam o crescimento fetal (resultando em recém-nascidos grandes ou pequenos para a idade gestacional), o sistema hormonal após o nascimento ou o comportamento adulto. Como o *imprinting* é um mecanismo epigenético de regulação

gênica, epimutações (erros na manutenção de marcadores epigenético) também levam à doenças causadas por *imprinting* (CONSTANCIA; KELSEY; REIK, 2004).

Os primeiros genes de mamíferos que sofrem *imprinting* foram identificados em 1991 (BARLOW et al., 1991; DECHIARA et al., 1991; FERGUSON-SMITH et al., 1991; BARTOLOMEI; ZEMEL; TILGHMAN, 1991). Já estando identificados aproximadamente 80 genes no genoma humano que sofrem essa marcação (MORISON; RAMSAY; SPENCER, 2005). As duas cópias parentais do gene marcado dividem informação genética igual; o não silenciamento de um alelo necessariamente pré-determina que qualquer função relacionada àquele gene é agora dependente de uma simples cópia ativa (MURPHY; JIRTLE, 2003).

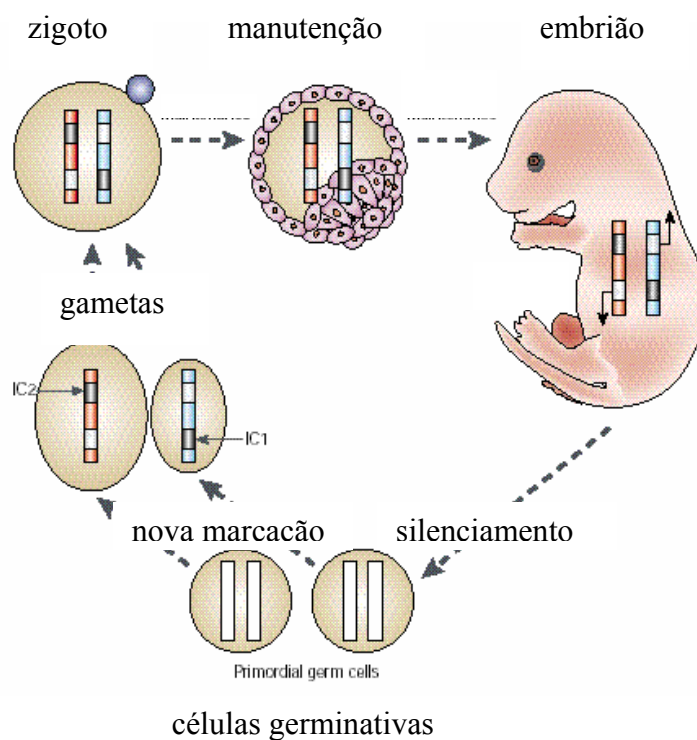


Figura 2 - Padrão do *imprinting* genômico durante o desenvolvimento humano (modificado de REIK; WALTER, 2001).

Uma característica notável de genes marcados é que eles raramente são encontrados sozinhos, sendo que aproximadamente 80% deles estão fisicamente agrupados com outros genes também marcados. A organização em grupos (*clusters*) destes genes reflete uma regulação coordenada em um domínio cromossomal (WOLFFE; MATZKE, 1999; URNOV; WOLFFE, 2001).

De acordo com Varmuza e Mann (1994), o foco do *imprinting* está no oócito, uma vez que os mamíferos são protegidos de doenças malignas do trofoblasto pela inativação nos seus oócitos de genes necessários para o desenvolvimento do mesmo. A cópia ativa desses genes, importantes para o sucesso da implantação, é então fornecida pelo genoma do espermatozóide depois da fertilização. O único risco de se desenvolver doença do trofoblasto decorre da gravidez. Entretanto, a natureza do processo reprodutivo e o curto período da vida gasto durante a gravidez ajudam a minimizar este risco.

Embora o processo de *imprinting* genômico não esteja totalmente explicado, sabe-se que ele envolve dois ou mais mecanismos de regulação da expressão de genes como a metilação diferencial do DNA e a desacetilação de histonas (Figura 3). Alguns autores ainda acreditam na participação da proteína CTCF como coadjuvante no processo de controle da expressão gênica (CHAO et al., 2002).

A metilação do DNA é executada por DNA metiltransferases (DNMTs), tendo como alvo os dinucleotídeos CpGs. Nestes são adicionados grupos metil a uma base citosina (metiladas principalmente quando estão em uma sequência CpG) na molécula de DNA formando 5-metilcitosina (PAULSEN; SMITH-FERGUSON, 2001). Uma vez metilados, os dinucleotídeos são alvos específicos para ligação com proteínas MeCP2, pois acredita-se que as mesmas promovam o sinal inicial para a repressão da transcrição. A partir de sua ligação às sequências promotoras CpGs metiladas ocorre o reconhecimento

por um complexo composto de um repressor de transcrição (Sin3) e uma desacetilase de histona (HATs-histonas acetil-transferases) (JONES; LEVORSE; TILGHMAN, 1998; BOYES; BIRD, 1991). Esta irá retirar grupamentos acetil dos resíduos de lisina próximos aos N-terminais de histonas, modificando assim a conformação da molécula de DNA, tornando-a mais compacta e dificultando a transcrição (JAENISCH; BIRD, 2003).

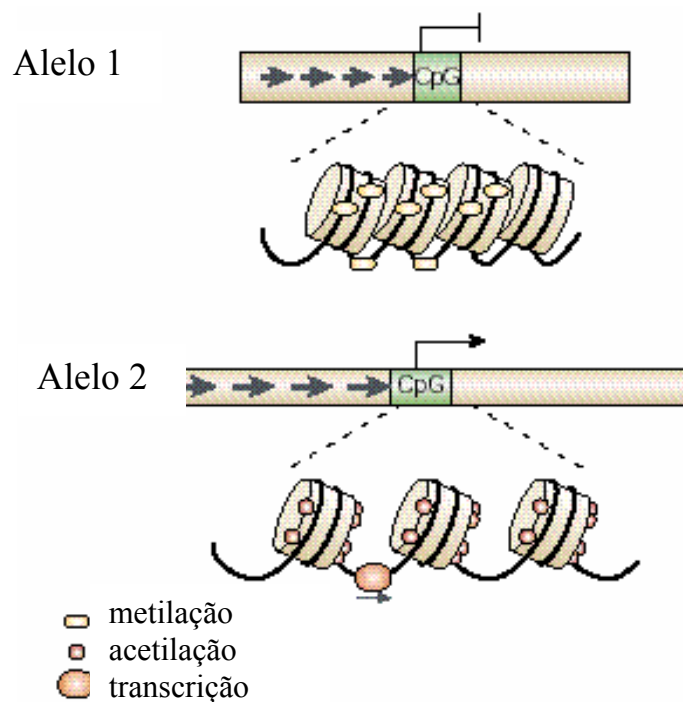


Figura 3 - Esquema de genes que sofrem “*imprinting*”. As regiões CpG são mostradas pelas setas. O sítio das mudanças epigenéticas alelo-específicas, como condensação nucleossomal através da desacetilação e metilação (alelo 1) e liberação da cromatina por acetilação e demetilação também são mostrados (modificado de REIK; WALTER, 2001).

O silenciamento transcricional de alguns genes por metilação do DNA pode ser mediado por fatores protéicos que se ligam especificamente em sítios metilados ou não. Estudos recentes apontam a proteína ligadora CTCF com ação isoladora na regulação do mecanismo de *imprinting* nos genes *H19/Igf2* presentes no cromossomo 11 (BELL; FELSENFELD, 2000).

Segundo a hipótese de Graves (1998), um gene que sofre *imprinting* paterno expresso no feto é mutado ou está ausente na PE. Esta autora propôs que a expressão de um gene *E* é necessária para invasão trofoblástica e estabelecimento da placentação normal. Este gene é marcado por sua origem parental tal que somente o alelo materno E^m é expresso no feto (*imprinting* paterno). Se um alelo materno é mutado ou está ausente no feto, a PE é induzida no organismo materno. Em famílias com PE que segregam um alelo mutante *e*, o modelo de expressão da PE dependerá de sua origem parental. Uma mulher será afetada somente se gerar um feto com um alelo e^m materno mutado. Assim uma mulher afetada deve ser ela mesma heterozigota *Ee* e deve passar o alelo mutante *e* para seu feto ($E^p e^m$) (Figura 4). Um feto heterozigoto $e^p E^m$, recebendo o alelo mutante do pai, iniciará o processo de placentação normal e não causará efeito adverso à mãe, desde que o alelo paterno esteja inativo (“marcado”).

1.5 A região cromossômica 11p15.5

Em humanos, a perda da região 11p15.5 derivada maternalmente implica em tumores esporádicos e na síndrome de Beckwith–Wiedemann (SBW), que é caracterizada

por macrosomia e malformações congênitas, estando associada com aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias em crianças. Entre os genes marcados no cromossomo 11p15.5 há candidatos implicados na SBW (ENGEL et al., 2000; HATADA; MUKAI, 2000; MAHER; REIK, 2000). Os portadores de SBW com essa perda materna, envolvendo o gene *CDKN1C* (*Ciclin-dependent kinase inhibitor 1C* ou *p57^{kip2}*) mostram proliferação anormal do trofoblasto, freqüentemente associada com pré-eclâmpsia (MCCOWAN; BECROFT, 1994).

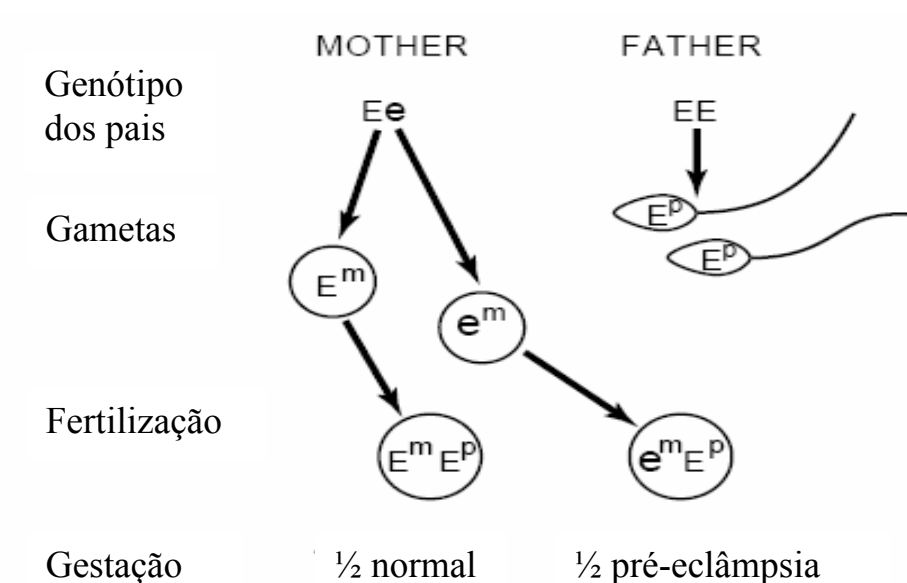


Figura 4 - Hipótese de que um gene *E* “marcado” paternalmente (materno ativo) expresso no feto sofre mutação na pré-eclâmpsia (modificado de GRAVES, 1998)

Muitos autores sugerem que a região cromossômica 11p15.5 está dividida em dois domínios gênicos regulados por *imprinting*, sendo um telomérico, onde estão mapeados os

genes *IGF2* e *H19*, e outro centromérico, onde estão os genes *CDKN1C*, *KvLQT1* e *LIT1* (ou *KvLQT1AS*) (REIK; MAHER, 1997; ENGEL et al., 2000; MAHER; REIK, 2000).

No domínio centromérico, o gene *CDKN1C* é marcado paternalmente, codifica um inibidor de quinase dependente de ciclina, está envolvido na regulação do ciclo celular e apresenta ação de supressão tumoral (MATSUOKA et al., 1995; LAM et al., 1999). O gene *KvLQT1* (*K+Channel voltage-gated Long QT 1*), também conhecido como *KCNQ1*, codifica um canal de potássio e apenas o alelo materno se expressa (WANG et al., 1996; LEE et al., 1997; LEE et al., 1999). Alterações na expressão desse gene foram descritas em doenças cardíacas (TOWBIN et al., 1994; NEYROUD et al., 1999). Mais recentemente descoberto, o gene *LIT1* (*Long Intronic Transcript 1* ou *KvLQT1AS*) é um transcrito anti-sense do gene *KvLQT1*, cuja função ainda não é totalmente conhecida e expressa-se apenas a partir do cromossomo paterno, codificando um mRNA que não é traduzido (LEE et al., 1999; SMILINICH et al., 1999).

Muitos dos genes que sofrem *imprinting* e são paternalmente ou maternalmente expressos influenciam o crescimento fetal (REIK; WALTER, 2001). O gene *IGF2* (*insuline-like growth factor 2*), que está mapeado na região cromossômica 11p15.5 e está sujeito a *imprinting* genômico, codifica o fator de crescimento semelhante à insulina tipo II (IGFII ou *insuline-like growth factor II*) que desempenha importante papel no desenvolvimento embrionário, no crescimento, influenciando a divisão e a diferenciação celular de mamíferos e possivelmente também a sua regulação metabólica (O'DELL; DAY, 1998).

Os mecanismos de *imprinting* e de expressão de *IGF2* foram estudados em camundongo. O gene é regulado por elementos de DNA próximos ao *IGF2*, tal como os silenciadores (CONSTANCIA et al., 2000) e os ativadores (MURRELL et al., 2001) e

particularmente por *enhancers* localizados distalmente ao vizinho *H19* (LEIGHTON et al., 1995; DAVIES et al., 2002). O acesso a estes *enhancers* é restringido por um isolador epigeneticamente controlado *upstream* do *H19* (THORVALDSEN; DURAN; BARTOLOMEI, 1998; BELL; FELSENFELD, 2000; HARK et al., 2000; MURRELL; HEESON; REIK, 2004).

Alterações na expressão do gene *IGF2* já foram descritas em tumores como carcinomas de pulmão do adulto, rabdomyosarcoma embrionário, hepatoblastomas, coriocarcinomas e tumores de célula germinativa do testículo (WEKSBERG et al., 1993; SQUIRE et al., 1996).

1.6 O gene *H19*

O gene *H19* é composto por cinco exons e quatro introns e seu RNA é completamente revestido por uma estrutura cap (adição de 7-metilguanossina à porção terminal 5' do transcrito), sofre *splicing* e é poliadenilado. Foi descoberto por ser monoalelicamente expresso do cromossomo de origem materna em camundongo e humanos, tendo sido identificado como um dos primeiros genes descritos a sofrer *imprinting* (BARTOLOMEI, ZEMEL; TILGHMAN, 1991; ZHANG; TYCKO, 1992). Após várias comparações, sem o aparecimento de qualquer estrutura conservada, foi concluído que o produto deste gene é um RNA não traduzido (BRANNAN et al., 1990).

O gene *H19* é altamente expresso no desenvolvimento fetal, sendo seu nível de expressão comparado ao do gene da β -actina. O gene adjacente *IGF2* é expresso nos

mesmos tecidos que o *H19* (LEE et al., 1990). Assim, estes dois genes têm uma expressão coordenada, com tecidos e estágios específicos. Expresso principalmente no endoderma e mesoderma de tecidos derivados durante a vida fetal, eles não são encontrados no cérebro ou sistema nervoso central, com exceção das leptomeninges e plexos coróides. Em todos os órgãos, estes dois genes são reciprocamente expressos. Após o nascimento, ambos os genes têm sua expressão diminuída em todos os tecidos com exceção do músculo esquelético. (WEBER et al., 2001).

Enquanto o *H19* é expresso a partir do alelo materno, o *IGF2* é expresso do alelo paterno (BARTOLOMEI; ZEMEL; TILGHMAN, 1991; DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991). Esta co-expressão é o resultado da presença de elementos regulatórios em ambos os genes (LEIGHTON et al., 1995; BELL; FELSENFELD, 2000; HARK et al., 2000).

Localizada a 2kb *upstream* do gene *H19* está a Região Diferencialmente Metilada (DMR). Esta seqüência contém ilhas CpGs que são metiladas no alelo paterno e completamente não-metiladas no alelo materno. O alelo materno não-metilado torna-se acessível à ligação da proteína isoladora CTCF. A ligação de CTCF à *H19*DMR cria um elemento limite no alelo materno e inibe a interação de *enhancers downstream* com os promotores de *IGF2* (GABORY et al., 2006), impedindo sua expressão. No alelo paterno a *H19*DMR está metilada, o que bloqueia a ligação da proteína CTCF e impede a expressão do *H19* (HARK et al., 2000). O promotor do *IGF2* tem, então, acesso ao *enhancer* e o alelo paterno é expresso (KANDURI et al., 2000).

O enigmático gene *H19* tem despertado interesse dos pesquisadores desde que foi descoberto (PACHNIS; BRANNAN; TILGHMAN, 1988). Sua conservação nas espécies, o transcrito não-codificado, seu alto nível de expressão e modificações epigenéticas em

muitas doenças congênitas e câncer, sugerem que esta molécula talvez tenha importante função biológica (HAO et al., 1993).

O *imprinting* genômico é um tipo de marcação epigenética e está alterado em muitas doenças. Vários genes que sofrem esta marcação estão envolvidos no desenvolvimento e crescimento fetais, a maioria é expressa na placenta, mostram uma complexa interação da regulação gênica incluindo envolvimento de RNA não-codificado e metilação diferencial de ilhas CpG e regiões controladoras de *imprinting* (POON et al., 2002). Os genes *IGF2* e *H19* sofrem *imprinting*, influenciam a divisão e diferenciação celulares e estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento fetal. Por estas características, o possível papel destes genes nas síndromes hipertensivas gestacionais deve ser considerado.

2 OBJETIVOS

Objetivos gerais

Observar a influência de genes que sofrem o processo de *imprinting* genômico no desenvolvimento de síndromes hipertensivas gestacionais

Objetivos específicos

Verificar a ocorrência da pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE/E) ou hipertensão gestacional (HG) em mulheres parentes de primeiro-grau de gestantes com PE/E ou HG;

Relacionar o polimorfismo *H19/RsaI* com a hipertensão arterial crônica e as síndromes hipertensivas gestacionais;

Relacionar o polimorfismo *IGF2/ApaI* com a hipertensão arterial crônica e as síndromes hipertensivas gestacionais;

Verificar a influência do genótipo (polimorfismos *H19/RsaI* e *IGF2/ApaI*) materno no peso do recém-nascido.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos do Projeto

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) de acordo com o Processo HCRP n° 4628/2004 e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o número 25000.080992/2004-11 (ANEXOS A e B).

3.2 Seleção de Pacientes

As pacientes foram selecionadas no Ambulatório de Gestação de Alto Risco (AGAR) do HCFMRP-USP e durante o atendimento no Centro Obstétrico (CO) do mesmo hospital. A seleção foi realizada de acordo com o diagnóstico de hipertensão arterial crônica (HAC), hipertensão gestacional (HG), pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE/E) ou HAC com PE sobreposta realizado pela equipe médica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP de acordo com a classificação do National High Blood Pressure Education Program (NHBPEP, 2000). Também foram incluídas gestantes que realizaram pré-natal sem alterações clínicas e/ou laboratoriais, que constituíram o grupo controle.

As pacientes que aceitaram participar do estudo, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), passaram por uma entrevista durante a qual foi aplicado um questionário semi-estruturado (APÊNDICE B), composto por questões sobre os membros de sua família, com ênfase especial nos problemas de parentes de primeiro-grau femininos relacionados às síndromes hipertensivas gestacionais e outras doenças.

Participaram da primeira parte da pesquisa relacionada ao estudo familiar das síndromes hipertensivas gestacionais 226 pacientes, estratificadas em três grupos (HG, PE/E e controle). Da análise molecular participaram 236 pacientes, estratificadas em quatro grupos (HAC, HG, PE/E e controle).

3.3 Estudo familiar

Foram selecionadas 450 mulheres para participarem do estudo. Dezoito pacientes foram excluídas por apresentarem gestação gemelar e/ou diabetes gestacional. Como parte do estudo foi realizada por revisão de prontuários médicos e muitos desses documentos não apresentavam os dados completos e atualizados (endereço, telefone), 206 pacientes também foram excluídas. Foram selecionadas, no final, 226 pacientes, estratificadas em três grupos, sendo 75 no grupo de PE/E, 49 no grupo de HG e 102 no grupo controle.

A confirmação do diagnóstico das síndromes hipertensivas gestacionais foi realizada por exames clínicos e laboratoriais, mas a história familiar e a construção dos heredogramas foram baseadas nas informações obtidas diretamente com as pacientes.

3.4 Análise Molecular

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Genética da Reprodução do Departamento de Genética da FMRP-USP.

3.4.1 Coleta de material

Após esclarecimento sobre a pesquisa e assinatura do TCLE, foram coletados 5-10mL de sangue periférico de cada paciente em tubos estéreis contendo EDTA, a vácuo.

3.4.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de sangue periférico pelo método de extração e precipitação em NaCl (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992, modificado).

Ao volume de 1 mL de sangue foi adicionado 450 μ L de Tampão de Lise gelado [Sacarose 0,32 M; Tris HCl (pH 7,5)12mM; MgCl₂ 5,0 M; Triton X 1,0%] em microtubos de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 20 segundos, o sobrenadante descartado e o procedimento repetido até a obtenção de *pellet* branco. O *pellet* foi ressuspenso em 80 μ L de Tampão de Proteinase K (5X) [NaCl 0,375M; EDTA (pH8,0) 0,12 M], 8,0 μ L de proteinase K (20 mg/mL), 10 μ L de SDS 20% e 280 μ L de água destilada e incubado à 55° C *overnight*. Foram adicionados 120 μ L de NaCl 5M e após agitação por 8 segundos a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 8 minutos.

O sobrenadante (400 μ L) foi transferido para outro microtubo e o *pellet* descartado. Foi adicionado 1,0 mL de etanol à -20° C, sendo o material posteriormente homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm a uma temperatura de 0°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante desidratado. O *pellet* foi ressuspenso em 50 μ L de água deionizada e utilizado para os próximos passos.

3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) foi utilizada para amplificação de seqüências dos genes estudados (*H19* e *IGF2*) a partir do DNA genômico extraído do sangue periférico. As condições de PCR foram padronizadas para cada par de *primers*.

As reações foram realizadas em aparelhos termociclador programável T-gradiente (Biometra), seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes e por Innis et al. (1990). Para o gene *H19* foi utilizado *primer* específico para a região a ser amplificada no éxon 5: H1 (*sense*) 5' TACAACCACTGCACTACCTG 3' e H3 (*anti-sense*) 5' TGGAAATGCTTGAAGGCTGCT (RAINER et al., 1993) e para a seqüência do gene *IGF2* foram utilizados os *primers sense* (5'- CTTGGACTTTGAGTCAAATTGG – 3') e *antisense* (5'- CCTCCTTTGGTCTTACTGGG – 3') descritos por Tadokoro et al. (1991). As condições das reações foram padronizadas de forma a evitar amplificações inespecíficas. O meio de reação da PCR foi constituído por KCl 50mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris HCl (pH 8,4) 10mM; dNTP (0,1 mM de cada nucleotídeo); *primer* 0,2 mM (de cada); Taq DNA Polimerase 1U; DNA genômico 0,1 µg. Também foram tomados os devidos cuidados de assepsia para evitar a contaminação do material. O protocolo de amplificação para o a seqüência do gene *H19* constitui-se de um ciclo de 94°C por 5 minutos, 65°C por 3 minutos e 72°C por 4 minutos e 34 ciclos de 94°C por 1 minuto, 65°C por 3 minutos e 72°C por 3 minutos. Para a seqüência do gene *IGF2* o protocolo de amplificação constituiu-se de um ciclo de 94°C por 5 minutos, 60°C por 1 minuto e trinta segundos e 72°C por 30 segundos, seguido de 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto.

3.4.4 Polimorfismo *IGF2/ApaI*

O polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (*restriction fragment length polymorphism* ou RFLP) *IGF2/ApaI* foi realizado a partir de DNA de 236 pacientes, sendo 52 do grupo de PE/E, 40 do grupo de HG, 29 com HAC e 94 do grupo controle.

A análise molecular deste gene foi realizada pelo aluno Murilo Racy Soares como parte do seu trabalho de iniciação científica, sob a orientação da Profa. Dra Ester Silveira Ramos.

Os produtos da PCR foram submetidos à digestão com enzima *ApaI* (20U) a 37°C por 12 horas nas condições ótimas de restrição com o tampão recomendado pelo fabricante. Os alelos foram diferenciados pelo padrão de migração eletroforética dos fragmentos de restrição em gel de agarose 2% utilizando-se TBE 1X [Tris-base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,5M (pH 8,0)] como tampão de corrida e coloração com brometo de etídio.

3.4.5 Polimorfismo *H19/RsaI*

A genotipagem através de RFLP para *H19/RsaI* foi realizada para 236 pacientes (56 PE/E, 40 HG, 34 HAC e 105 do grupo controle).

Os produtos da PCR foram submetidos à digestão com a enzima *RsaI* (30U) a 37°C por 12 horas nas condições ótimas de restrição com o tampão recomendado pelo fabricante [50nM Tris-HCL (pH 8,0); 10mM MgCl₂].

Os alelos foram diferenciados pelo padrão de migração eletroforética dos fragmentos de restrição em gel de agarose 2% utilizando-se TBE 1X [Tris-base 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,5M (pH 8,0)] como tampão de corrida e coloração com brometo de etídio.

3.5 Análise Estatística

Os dados do estudo familiar foram analisados estatisticamente pelo teste Exato de Fisher e pelo teste do Qui-quadrado realizados por PROC FREQ e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A descrição dos dados (número de pacientes por grupo, média de idade das pacientes, média de idade gestacional e peso médio dos recém-nascidos) para a pesquisa da associação dos polimorfismos H19/RsaI e IGF2/ApaI, bem como o cálculo das frequências gênicas e genóticas e os testes de Qui-quadrado ($\chi^2 = 0,05$), foram executados por meio do programa Excel for Windows. Para confirmar os testes estudaram-se as hipóteses sob o Teste G ($P < 0,05$).

Com o objetivo de evidenciar a maior presença de problemas hipertensivos em algumas combinações de genótipos para *H19* e *IGF2* foram elaborados gráficos de distribuição em Excel.

A característica de peso do recém-nascido (PN) foi testada quanto à normalidade ($n=222$), segundo o Teste de Kolmogorov-Smirnov ($P < 0,05$). Os dados foram divididos em Classes de Idade Gestacional (CIG), para cada um dos genes estudados. Para ajustar os dados de PN à CIG, utilizou-se o aplicativo SAS para Windows (SAS, 2003), procedimento GLM, sendo o modelo analisado $PN = CIG / \text{solution}$. Após o ajuste, a característica passou a ser denominada PNC (peso ao nascer corrigido) e para estudar o efeito do genótipo para *H19* sobre o PNC e também o efeito do genótipo para *IGF2* sobre o PNC foram realizados Testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (a $P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Descrição dos grupos

As pacientes foram divididas em grupos segundo o diagnóstico das síndromes hipertensivas gestacionais realizado pela equipe médica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP. Tabelas mais detalhadas com os dados das pacientes encontram-se no APÊNDICE C.

4.2 Estudo familiar

As gestantes foram estratificadas nos grupos de estudos de acordo com a caracterização étnica/racial do HCFMRP-USP, a qual classifica os pacientes como “brancos, negros ou pardos/mulatos” (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das pacientes nos grupos de estudo de acordo com a classificação étnica/racial adotada no HCFMRP-USP.

	n	Branças	Negras	Pardas/Mulatas
Controle	102	60	10	32
PE/E	75	47	12	16
HG	49	26	08	15
Total	226	133	30	63

PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HG = hipertensão gestacional, n = número de pacientes.

O Teste do Qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para testar as hipóteses:

- H_0 : não há associação entre as pacientes brancas, negras ou pardas/mulatas e a PE/E;

- H_1 : há associação entre as pacientes brancas, negras ou pardas/mulatas e a PE/E .

O χ^2 tabelado com quatro graus de liberdade foi igual a 5,991.

Cada grupo (PE/E e HG) foi analisado com o grupo Controle, os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das pacientes com PE/E e HG em relação à classificação étnica/racial adotada no HCFMRP-USP. Os valores esperados encontram-se entre parênteses

	Brancas	Negras	Pardas
PE/E	47 (45,3)	12 (9,3)	16 (20,3)
Controle	60 (61,6)	10 (12,6)	32 (27,6)
HG	26 (27,9)	8 (5,8)	15 (15,2)
Controle	60 (58)	10 (12,1)	32 (31,7)
PE/E +HG	73 (72,9)	20 (16,4)	31 (34,5)
Controle	60 (60)	10 (13,5)	32 (28,4)

PE/E = pré-eclâmpsia/eclampsia, HG = hipertensão gestacional

Para o grupo de PE/E o χ^2 calculado foi igual a 2,5020 ($P < 0,05$), indicando que não há associação entre os grupos (PE/E e controle).

O χ^2 calculado para o grupo de HG foi 1,3804, evidenciando que $P < 0,05$. Aceita-se e a hipótese H_0 , ou seja, que não há associação entre as pacientes brancas, negras ou pardas/mulatas e a HG.

O χ^2 calculado foi 2,5020, indicando que não há associação entre os grupos ($P < 0,05$), ou seja, a PE/E e a HG não sofreram influência das “cores da pele” das pacientes.

Os resultados da análise familiar estão resumidos nas Tabelas 3-5. Cinco heredogramas com mais de um parente de primeiro-grau feminino afetado ou com provável influência paterna foram selecionados como exemplos (Figura 5). Os heredogramas restantes encontram-se no APÊNDICE D.

A frequência de famílias com pelo menos um parente de primeiro-grau (irmãs e/ou mães) com PE/E foi mais elevada entre o grupo de PE/E comparado ao grupo de HG e ao grupo controle, e este resultado foi estatisticamente significativo ($P < 0.05$) (Tabela 4). Não houve nenhuma diferença estatística observada entre os três grupos com relação à incidência de famílias com pelo menos um parente de primeiro-grau feminino com HG (Tabela 4).

Uma possível influência paterna foi observada em alguns casos (Tabela 5, Figura 5). Devido ao pequeno número amostral, a análise estatística não foi realizada.

Tabela 3 - Ocorrência de PE/E e HG em parentes femininos de primeiro grau das pacientes.

		PE/E	HG	Controle	Total
n		75	49	102	226
PE/E	Irmã	5 (6,66%)	1 (2,04%)	1 (0,98%)	7
	Mãe	4 (5,33%)	0	0	4
	Irmã+Mãe	9 (12%)	1 (2,04%)	1 (0,98%)	11
	Famílias	6 (8%)	1 (2,04%)	1 (0,98%)	8
HG	Irmã	3 (4%)	2 (4,08%)	9 (8,82%)	14
	Mãe	5 (6,66%)	1 (2,04%)	3 (2,94%)	9
	Irmã+Mãe	8 (10,66%)	3 (6,12%)	12 (11,76%)	23
	Famílias	8 (10,66%)	3 (6,12%)	12 (11,76%)	23

PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HG = hipertensão gestacional.

Tabela 4 - Análise estatística das famílias utilizando-se o Teste Exato de Fisher

		PE/E		Controle		HG		Controle	
		Norm	Af	Norm	Af	Norm	Af	Norm	Af
PE/E	Obs	67	8	101	1	48	1	101	1
	Esp	71.18	3.81	96.81	5.18	48.35	0.64	100.65	1.35
	TP (P)	0.0045				0.4413			
	TS Pr<=P*	0.0048				0.5452			
HG	Obs	68	7	91.05	10.94	46	3	91.86	10.13
	Esp	66.94	8.05	90	12	44.13	4.86	90	12
	TP (P)	0.1726				0.1380			
	TS Pr<=P*	0.8066				0.3877			

PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HG = hipertensão gestacional, Norm. = normal, Af. = afetado, Obs. = observado, Esp. = esperado, TP (P) = probabilidade, TS = *Two-sided* * p<0.05.

Tabela 5 - Ocorrência de PE/E ou HG entre sogras e/ou cunhadas.

		PE/E	HG	Controle	Total
n		75	49	102	226
PE/E	Esposa do irmão	2 (2,66%)	1 (2,04%)	1 (0,98%)	4
	Irmã do parceiro	0	1 (2,04%)	0	1
	Esposa do irmão do parceiro	2 (2,66%)	0	0	2
	Sogra	0	0	0	0
	Total de parentes	4 (5,33%)	2 (4,08%)	1 (0,98%)	7
	Famílias	4	2	1 (0,98%)	7
HG	Esposa do irmão	2 (2,66%)	0	1 (0,98%)	3
	Irmã do parceiro	0	0	1 (0,98%)	1
	Esposa do irmão do parceiro	0	0	0	0
	Sogra	1 (1,33%)	0	0	1
	Total de parentes	3 (4%)	0	2 (1,96%)	5
	Famílias	3	0	2	5

PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HG = hipertensão gestacional.

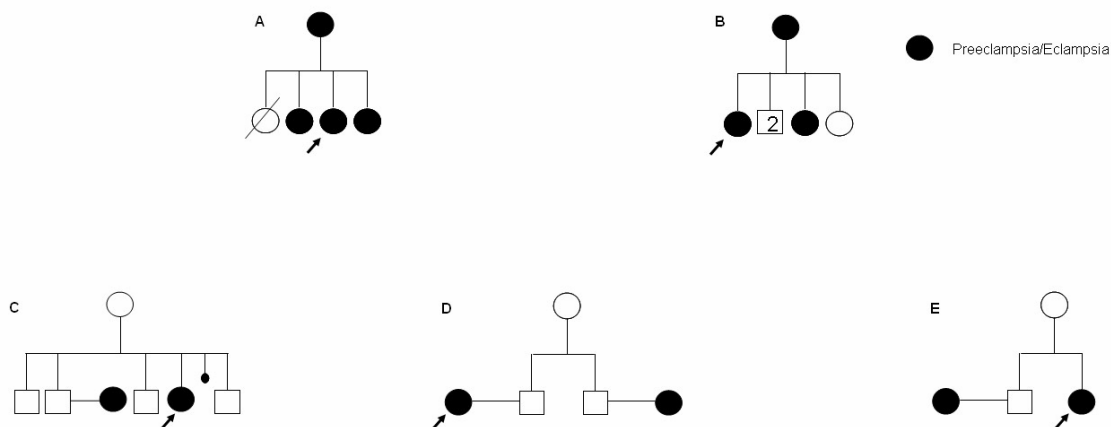


Figura 5. Heredogramas representando parentes afetadas de primeiro-grau das pacientes com PE/E (A e B) e heredogramas evidenciando provável efeito paterno (C-E).

4.3 Polimorfismo *H19/RsaI*

A presença ou ausência do sítio polimórfico de restrição GT/AC, reconhecido e clivado pela enzima *RsaI*, garantem a diferenciação entre os alelos A (não clivado) e B (clivado) (Figura 6). Na ausência do sítio de restrição e conseqüentemente da digestão o fragmento gerado pela PCR é de 655 pb (alelo A). Na presença do sítio de restrição ocorre a digestão do produto da PCR e são produzidos dois fragmentos, sendo um de 545 pb e outro de 110pb (alelo B). Já na presença do sítio de restrição em apenas um cromossomo (no caso de heterozigoto), são gerados três fragmentos, sendo um de 655 pb, um de 545 pb e outro de 110 pb.

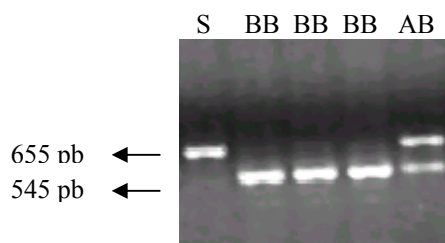


Figura 6. Genotipagem através do RFLP *H19/RsaI*. (S) fragmento sem digestão, (A) alelo A, (B) alelo B, (pb) pares de bases.

4.4 Polimorfismo *IGF2/ApaI*

A diferença dos alelos envolvidos em cada genótipo foi estabelecida pela presença ou não do sítio de restrição GGGCC/CC, o qual é reconhecido e clivado pela enzima *ApaI* (Figura 7). Na ausência do sítio de restrição e, conseqüentemente, da digestão o fragmento gerado pela PCR é de 236 pb (alelo A). Na presença do sítio de restrição são produzidos dois fragmentos, um de 173 pb e outro de 63 pb (alelo G) e, quando presente em apenas um cromossomo (heterozigoto AG), são gerados três fragmentos, sendo um de 236 pb, um de 173 pb e outro de 63 pb.

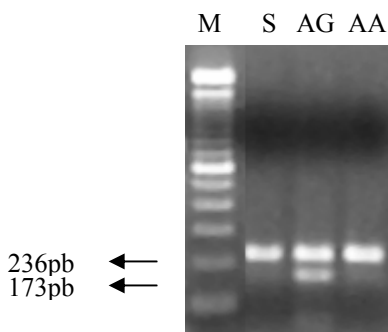


Figura 7. Genotipagem através do RFLP *IGF2/ApaI*. (M) marcador (padrão de pb), (S) fragmento sem digestão, (A) alelo A, (G) alelo G, (pb) pares de bases.

4.5 Análise estatística

Foram analisados os dados de 236 pacientes, sendo a idade média das gestantes de 26,9 anos, a idade gestacional média de 263 dias (ou 37 semanas e 4 dias) e o peso médio dos recém-nascidos de 2851g (Tabela 6).

Tabela 6 - Grupos de estudo, idade média materna, idade média gestacional, peso médio dos recém-nascidos

Grupo	n	Idade média materna (anos)	Idade média gestacional (dias)	Peso médio do RN (g)
Controle	107	26	271 (38s5d)	3067
Pré-eclâmpsia/Eclâmpsia	55	25,9	247 (35s2d)	2304
Hipertensão Arterial Crônica	34	30,5	261 (37s2d)	2885
Hipertensão Arterial Gestacional	39	27,3	268 (38s2d)	3043

RN = recém-nascido; s = semanas; d = dias; g = gramas.

4.6 Gene *H19*

As frequências genótípicas para *H19*, para todas as pacientes e grupo controle em conjunto, estão representadas na Tabela 7, as quais resultaram nas frequências gênicas: $f(A) = 0,42$ e $f(B) = 0,58$

Tabela 7 - Frequências genótípicas para *H19* para todos os grupos em conjunto.

Genótipo	n	Frequência genotípica
AA	30	0,13
AB	132	0,57
BB	69	0,30
	231	1,00

n = número de genótipos

Os dados para as freqüências gênicas de acordo com cada grupo [Controle (n=107), PE/E (n=55), HG (n=39) e HAC (n=34)] estão representadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Freqüências gênicas do *H19* para os quatro grupos de estudo.

	C	PE/E	HG	HAC
n	107	55	39	34
f(A)	0,44	0,43	0,42	0,32
f(B)	0,56	0,57	0,58	0,68

C = controle, PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HG = hipertensão gestacional, HAC = hipertensão arterial crônica, f(A) = freqüência do alelo A do gene *H19*, f(B) = freqüência do alelo B do gene *H19*.

Confrontando-se o grupo de mulheres sadias (controle) com os outros três grupos, por meio do Teste do Qui-quadrado (χ^2), as análises mostraram que as freqüências gênicas não foram estatisticamente diferentes entre as mulheres com ou sem quadro de problema hipertensivo, sendo que a comparação PE/E e Controle, apresentou χ^2 calculado=2,83, P>0,50; HG e Controle: χ^2 calculado=1,73, P>0,50; HAC e Controle: χ^2 calculado=3,75, P>0,50.

Quanto à análise de freqüências genotípicas:

- Hipótese H_0 : as freqüências relativas dos genótipos para *H19* são iguais entre as mulheres com PE/E, HAC e HG.

- Hipótese alternativa H_1 : as freqüências relativas são diferentes.

Foi utilizado o teste de χ^2 (com quatro graus de liberdade e $\alpha=0,05$). O χ^2 tabelado foi igual a 9,488. Os resultados encontram-se representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Freqüência dos genótipos do *H19* para PE/E, HAC, HG. Os valores esperados encontram-se entre parênteses.

Genótipos (<i>H19</i>)	PE/E	HAC	HG	Totais
AA	7 (6,4)	3 (4)	5 (4,6)	15
AB	33 (30,9)	16 (19,1)	23 (21,9)	72
BB	15 (17,6)	15 (10,9)	11 (12,5)	41
Totais	55	34	39	128

PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia; HAC = hipertensão arterial crônica; HG = hipertensão gestacional.

O χ^2 calculado foi igual a 3,148, indicando que as frequências relativas dos genótipos para *H19* não diferem estatisticamente ($P < 0,05$) para mulheres com PE/E, HAC e HG.

Também foi aplicado o Teste G, sendo que:

- H_0 = a ocorrência de doença hipertensiva independe do genótipo para *H19* ao qual pertence a paciente;

- H_1 = a ocorrência da doença está associada ao genótipo para *H19* ao qual pertence a paciente.

A associação do genótipo para cada grupo (PE/E, HAC e HG) foi analisada em relação ao grupo controle e os resultados encontram-se representados nas Tabelas 10.

Tabela 10- Associação do genótipo do *H19* com a PE/E em relação ao grupo controle.

	AA	AB	BB
PE/E	7	33	15
Controle	15	57	28
HAC	3	16	15
Controle	15	57	28
HG	5	23	11
Controle	15	57	28

PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HAC = hipertensão arterial crônica, HG = hipertensão gestacional.

O resultado do Teste G = 0,1928 ($P = 0,9081$) indicou que, deve-se , aceitar a hipótese H_0 , ou seja, não existe associação estatisticamente significativa entre o genótipo e PE/E.

O resultado do Teste G foi $G = 3,1797$ com $P = 0,2040$. Como o valor de G foi baixo, aceita-se a hipótese H_0 , ou seja, que não existe associação estatisticamente significativa entre o genótipo e HAC.

O resultado do Teste G foi $G=0,1142$ com $P=0,9445$. Como o valor de G foi baixo, aceita-se a hipótese H_0 , ou seja, que não existe associação estatisticamente significativa entre o genótipo e hipertensão gestacional.

4.7 Gene *IGF2*

As frequências genóticas para *IGF2*, para todas as pacientes e grupo controle em conjunto, estão representadas na Tabela 11, as quais resultaram nas frequências gênicas: $f(A) = 0,22$ e $f(G) = 0,78$.

Os dados para as frequências gênicas de acordo com cada grupo [Controle (n=107), PE/E (n=55), HG (n=39) e HAC (n=34)] estão representadas na Tabela 12.

Tabela 11 - Frequências genóticas para o gene *IGF2*

Genótipo	n	Frequência genotípica
AA	13	0,06
AG	80	0,34
GG	143	0,61
	236	1,00

n = número de genótipos

Tabela 12 - Frequências gênicas do *IGF2* para os quatro grupos de estudo.

	C	PE/E	HG	HAC
n	107	55	39	34
f(A)	0,23	0,21	0,17	0,28
f(G)	0,77	0,79	0,83	0,72

C = controle, PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia, HG = hipertensão gestacional, HAC = hipertensão arterial crônica, f(A) = frequência do alelo A do gene *H19*, f(B) = frequência do alelo B do gene *H19*.

Os resultados de Gomes *et al.* (2005) mostraram $f(A)=0,30$ e $f(G)=0,70$ para o gene *IGF2*. Foi realizada a análise através do teste de χ^2 , considerando as frequências gênicas de Gomes *et al.* (2005) como sendo os valores esperados em uma população normal (Tabela 13).

O χ^2 calculado (=13,36) foi maior que o χ^2 tabelado para dois graus de liberdade (= 5,99 a $\alpha=0,05$), evidenciando a rejeição da hipótese H_0 (os valores observados eram iguais aos valores esperados), ou seja, as frequências gênicas do referido estudo (em mulheres gestantes) foram estatisticamente diferentes daquelas encontradas por Gomes *et al.* (2005), para homens e mulheres sadios.

Tabela 13 - Frequências gênicas do *IGF2*

Genótipo	Obs.	Esp.	Obs-Esp
AA	13	21	3,196685
AG	80	99	3,6882
GG	143	116	6,473276
	236	236	13,35816

Obs. = observado; Esp. = esperado.

4.8 Associação entre os genótipos dos genes *H19* e *IGF2*

Foram consideradas as hipóteses:

- Hipótese H_0 : as frequências relativas dos genótipos *H19* são iguais entre as mulheres genotipadas como AA, AG ou GG para o gene *IGF2*

- Hipótese alternativa H_1 : as frequências relativas são diferentes.

Foi utilizado o teste de χ^2 (com quatro graus de liberdade e $\alpha=0,05$). O χ^2 tabelado foi igual a 9,488. (Tabela 14).

O χ^2 calculado foi igual a 8,913, indicando que as frequências relativas dos genótipos para *H19* não diferem estatisticamente ($P<0,05$) para mulheres genotipadas como AA, AG ou GG para o gene *IGF2*, ou seja, não há evidências de associação entre os dois genótipos.

Tabela 14 - Associação entre as frequências relativas dos genótipos *H19* (vertical) e *IGF2* (horizontal). Os valores esperados encontram-se entre parênteses.

Genótipos	AA	AG	GG	Totais
AA	1 (1,7)	10 (10,1)	19 (18,2)	30
AB	10 (7,4)	52 (44,6)	70 (80)	132
BB	2 (3,9)	16 (23,3)	51 (41,8)	69
Totais	13	78	140	231

Também foram comparados os resultados nos vários sub-grupos.

- Hipótese H_0 : as frequências relativas das combinações de genótipos para *H19* e *IGF2* são iguais entre as mulheres com PE/E, HAC e HG.

- Hipótese alternativa H_1 : as frequências relativas são diferentes.

Foi utilizado o teste de χ^2 (com quatro graus de liberdade e $\alpha=0,05$). O χ^2 tabelado foi igual a 9,488 (Tabela 15). Foram consideradas somente as combinações que apresentaram casos de PE/E, HAC e HG.

Tabela 15 - Frequências relativas das combinações de *H19* e *IGF2* entre os grupos de HAC, HG e PE/E Os valores esperados encontram-se entre parênteses.

	HAC	HG	PE/E	Totais
BB+GG	9 (6,8)	8 (9,3)	13 (13,9)	30
AB+GG	9 (8,8)	13 (12,1)	17 (18,1)	39
AB+AG	4 (6,4)	9 (8,7)	15 (13)	28
Totais	22	30	45	97

HAC = hipertensão arterial crônica; HG = hipertensão gestacional; PE/E = pré-eclâmpsia/eclâmpsia.

O χ^2 calculado foi igual a 2,281, indicando que não há prova estatisticamente significativa (a $P < 0,05$) capaz de sustentar a idéia de que as frequências relativas das combinações de genótipos para *H19* e *IGF2* diferem para mulheres que tiveram PE/E, HAC e HG.

4.9 Combinações de Genótipos

Para evidenciar a maior presença de síndromes hipertensivas gestacionais em algumas combinações de genótipos para *H19* e *IGF2*, foram elaborados gráficos de distribuição (Gráficos 1-4). Observou-se que a maioria dos casos de PE/E (86%), HG (84%), HAC (82%) e grupo Controle (78%) ocorreram nas combinações que apresentaram pelo menos um dos alelos B e um dos alelos G, concomitantemente.

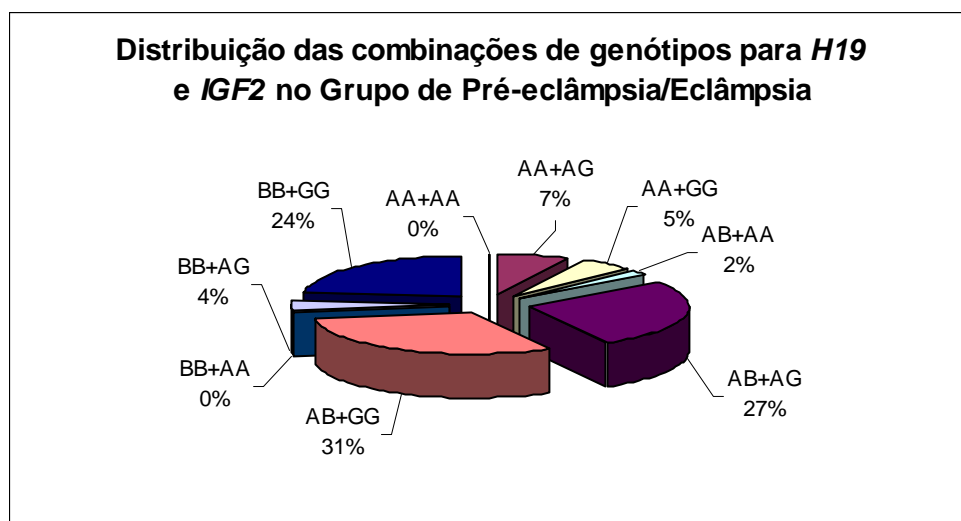


Gráfico 1- Distribuição dos casos de pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE/E) nas combinações de genótipo para *H19* e *IGF2*

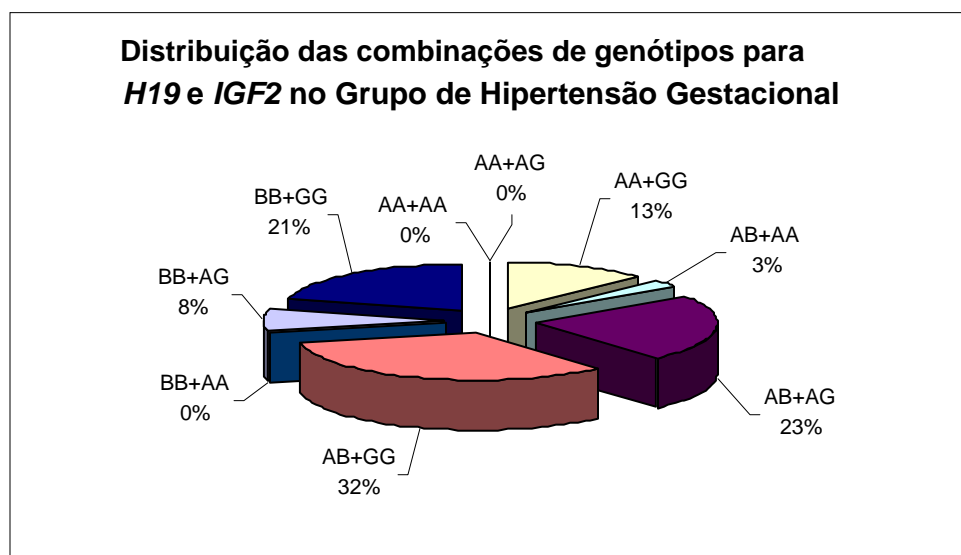


Gráfico 2- Distribuição dos casos de hipertensão gestacional (HG) nas combinações de genótipo para *H19* e *IGF2*.

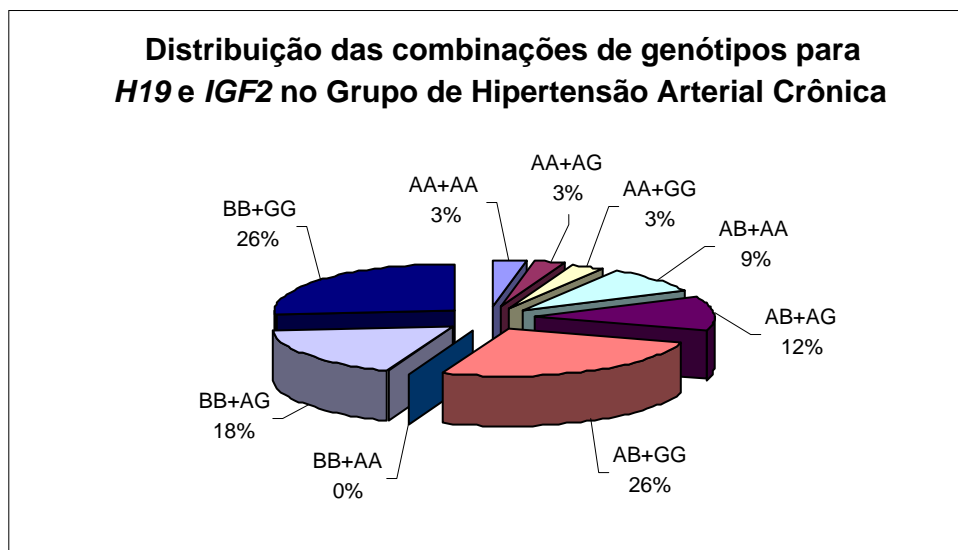


Gráfico 3- Distribuição dos casos de hipertensão arterial crônica (HAC) nas combinações de genótipo para *H19* e *IGF2*.

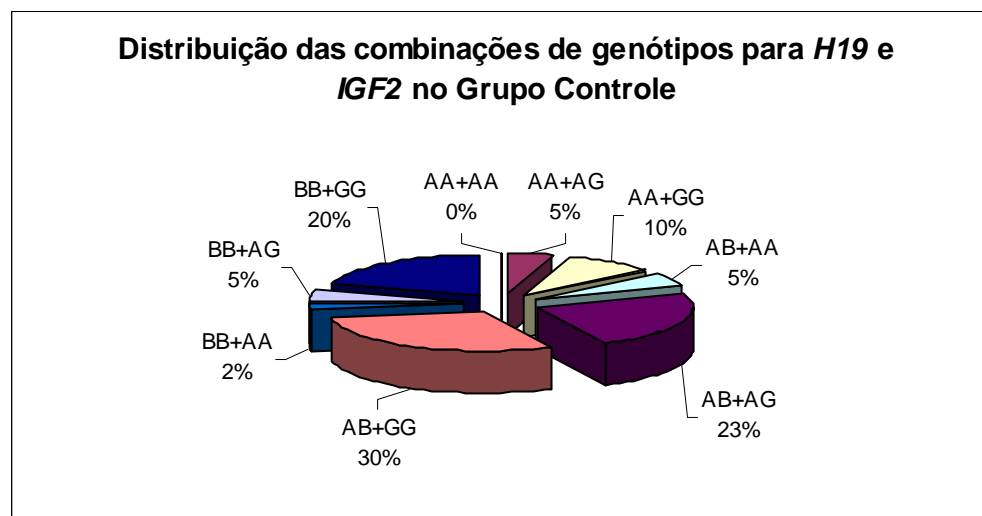


Gráfico 4- Distribuição dos genótipos *H19* e *IGF2* no grupo Controle

4.10 Análise do peso dos recém-nascidos

A característica de peso do recém-nascido (peso ao nascimento ou PN) não apresentou distribuição normal nos 222 registros, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Assim, os testes posteriores foram realizados no âmbito da Estatística Não-Paramétrica. Foi utilizada a idade gestacional para corrigir os PN. Foram criadas cinco classes de idade gestacional (IG), descritas abaixo (Tabela 16):

Com este ajuste, o PN passou a ser denominado PNC (peso ao nascimento corrigido). Para estudar o efeito do genótipo para *H19* sobre o PNC foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, o qual resultou em $H=0,6105$ ($P=0,7369$) estatisticamente não significativo, ou seja, os genótipos maternos não apresentaram influência significativa sobre o PNC.

Tabela 16 - Classes de idade gestacional para o gene *H19*.

IG	Classe	Ajuste
De 170 a 195 dias	1	+1656g
De 196 a 220 dias	2	+2203g
De 221 a 245 dias	3	+1167g
De 246 a 270 dias	4	+447g
Acima de 270 dias	5	0

IG: idade gestacional; g = gramas.

O mesmo teste foi aplicado para verificar o efeito do genótipo *IGF2* materno sobre o PNC, resultando em $H=0,1570$ ($P=0,9245$), também evidenciando que o genótipo *IGF2* materno não influenciou o PNC.

Considerando-se os grupos estudados (Controle, HAC, HG e PE/E), o teste de Kruskal-Wallis não evidenciou efeito significativo do grupo sobre o PNC ($H=3,4211$ e $P=0,3311$). Utilizando-se, no entanto, o PN (sem correção para IG), houve efeito significativo do grupo sobre o PN ($H=17,2979$ e $P=0,0006$), sendo que as diferenças significativas foram: Controle e PE/E (+547g), HAC e PE/E (+454g) e HG e PE/E (+629g).

Em relação à genotipagem para *IGF2*, o PN foi corrigido pela Classe de Idade Gestacional, seguindo a tabela abaixo:

Tabela 17 - Classes de idade gestacional para o gene *IGF2*.

IG	Classe	Ajuste
De 170 a 195 dias	1	+2597g
De 196 a 220 dias	2	+2202g
De 221 a 245 dias	3	+1455g
De 246 a 270 dias	4	+447g
Acima de 270 dias	5	0

IG: idade gestacional; g = gramas.

Passou a ser denominado PNC e seguiu-se com a comparação pelo teste de Kruskal-Wallis. O mesmo teste foi aplicado para verificar o efeito do genótipo materno para *IGF2* sobre o PNC, resultando em $H=0,5471$ ($P=0,7607$), também evidenciando que o genótipo materno para *IGF2* não influenciava o PNC.

Utilizando-se o PN (sem correção para IG), não houve efeito significativo do genótipo para *IGF2* sobre o PN ($H=0,0574$ e $P=0,9717$).

Na Tabela 18 estão relacionados os PN e PNC de cada genótipo para *IGF2* e respectivos coeficiente de variância (CV).

Percebe-se, mesmo sem análise estatística, que os valores médios não diferiram de maneira expressiva e que os PN variaram bem mais que os PNC.

Tabela 18 - Peso dos recém-nascidos com e sem correção para idade gestacional em relação ao genótipo *IGF2*.

		AA	AG	GG
PN	Média (g)	2817	2764	2624
	CV (%)	35	33	43
PNC	Média (g)	3266	3265	3291
	CV (%)	16	22	20

PN = peso recém-nascido; PNC = peso recém-nascido corrigido para idade gestacional; (g) = gramas; CV = coeficiente de variância.

5 DISCUSSÃO

A importância das síndromes hipertensivas gestacionais está em sua alta prevalência na população mundial, do não conhecimento da etiologia e das sérias conseqüências materno-fetais se não forem diagnosticadas e tratadas a tempo.

Os aspectos genéticos da PE são estudados há várias décadas, na tentativa de se descobrir o padrão de herança envolvido na complexa etiologia desta “doença das teorias”. Na busca deste resultado, inúmeros trabalhos foram realizados através de estudos familiares e, principalmente, por análise de polimorfismos genéticos que estão envolvidos na cascata de eventos que levam à PE/E (SOHDA et al., 1997; YAMADA et al., 2000; MARUYAMA et al., 2004). A identificação do fenótipo da PE é um desafio para os estudos genéticos desta doença e vem sofrendo mudanças e adaptações ao longo do tempo (NHBPEP, 2000; DUARTE et al., 2003).

O estudo familiar com gestantes atendidas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) mostrou, de forma estatisticamente significativa, que pacientes com PE/E apresentam maior número de parentes de primeiro-grau (mãe/irmã) com PE/E quando comparadas a gestantes com HG e a população controle. Os resultados estão de acordo com a literatura, que também observou risco elevado para desenvolver PE/E em mães e irmãs de mulheres com PE/E. (COOPER et al., 1988; CINCOTTA; BRENNECKE, 1998; DAWSON et al., 2002; CARR et al., 2005).

Há pouca informação disponível com relação ao impacto da “raça” e da “etnia” na apresentação clínica e progressão das síndromes hipertensivas gestacionais (GOODWIN; MERCER, 2005). No Brasil, as informações sobre “raça” (ou “cor da pele”) devem ser avaliadas com cuidado, pois existem diferenças com relação à percepção da cor da pele em determinados contextos regionais, culturais e sociais (TELLES, 1994).

Não foram verificadas diferenças significativas entre indivíduos considerados pela classificação dos prontuários médicos do HCFMRP-USP como “brancos, negros ou pardos/mulatos”. Gaio et al. (2001), realizaram estudo em seis capitais brasileiras (Manaus, Fortaleza, Salvador, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre) participantes do Sistema Único de Saúde (SUS) e observaram que a ocorrência de HAC em mulheres de “cor da pele preta” foi duas vezes mais prevalente do que nas mulheres de “cor da pele branca”. Pacientes de “cor da pele misturada” tiveram frequência mais baixa de PE/E que as “brancas”, enquanto as “negras” novamente apresentaram frequência mais alta, mas sem estatística significativa.

Os resultados de Gaio et al. (2001) e os encontrados no presente estudo podem ser devidos a maior miscigenação existente na população brasileira. Ferreira et al. (2006), em estudo realizado com 400 pessoas nascidas no estado de São Paulo e identificadas como “brancas” nos prontuários médicos do HCFMRP-USP, estimaram que 79% da ancestralidade genética destes indivíduos era europeia, 14% africana e 7% ameríndia. Esta grande ancestralidade africana na população considerada “branca” pode explicar os resultados encontrados no presente trabalho, que não mostrou relação da “cor da pele preta” com as síndromes hipertensivas gestacionais.

Estudos mostram também que os fatores paternos contribuem com a doença, uma vez que o risco de uma gravidez com PE é aumentado entre os homens cujas mães tiveram PE (ESPLIN et al., 2001) e entre os homens que geraram previamente uma gravidez pré-eclâmptica com outra parceira (LIE et al., 1998). Embora a amostra seja pequena, foi observada a ocorrência de alguns casos de síndromes hipertensivas gestacionais em sogra, cunhada e esposa de cunhado das probandas. Desta maneira, a influência do genótipo paterno não pode ser rejeitada. Estudos futuros, com aumento da amostra e também com

coleta de sangue dos familiares de pacientes são necessários e úteis para o entendimento da participação paterna na etiologia da PE/E.

Após revisão da literatura foi observado que este é o primeiro estudo familiar de síndromes hipertensivas entre gestantes brasileiras. Informações sobre esta população heterogênea é importante, porque diferentes etiologias da PE/E podem ocorrer e ser reveladas. As famílias também poderão ser selecionadas para futuros estudos de ligação.

Os exames laboratoriais atualmente empregados no diagnóstico da PE incluem a utilização da análise de biomarcadores. A concentração de vários marcadores protéicos, tais como proteína C-reativa (CRP), fator de crescimento placentário (PGF) e seu receptor (FLT1), inibina-A (INHA) entre outros, apresentam potencial preditivo pré-sintomático, mas, até o momento, nenhum marcador que seja aceito universalmente e possa ser utilizado para prevenção de novos casos de PE foi descrito (BOSIO et al., 2001; TJOA et al., 2001; CLAUSEN et al., 2002; SALOMON et al., 2003; TJOA et al., 2003; LEVINE et al., 2004; ONG et al., 2004; QIU et al., 2004; THARDANI et al., 2004; LEVINE et al., 2005). Vários marcadores genéticos, dentre eles o gene da metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR), da protrombina (F II), do fator V (FV Leiden) e da angiotensina (AGT), estão em estudo e poderão auxiliar na prevenção da PE (para revisão vide WILSON et al., 2002; SMETS et al., 2006).

Na região 11p15.5 que sofre *imprinting* estão mapeados genes importantes como o *IGF2*, que codifica o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-II) (GIANNOUKAKIS et al., 1993; OHLSSON et al., 1993). Este gene é altamente expresso nos tecidos embrionários e extra-embrionários humanos (OHLSSON et al., 1989). Por outro lado, o transcrito do gene *H19* é o RNA mensageiro mais abundante no desenvolvimento embrionário de camundongos (BRANNAN et al., 1990) e em tecidos

embrionários e na placenta de humanos (RACHMILEWITZ et al., 1992a; RACHMILEWITZ et al., 1992b). No entanto, mesmo estando entre os prováveis genes envolvidos na PE, existe apenas um trabalho relatando a possível associação de polimorfismos do gene *IGF2* com a PE (BERMINGHAM et al., 2000) e nenhum relato sobre polimorfismos do *H19*.

No presente trabalho foi demonstrada menor frequência do alelo A em relação ao polimorfismo *H19/RsaI* [$f(A) = 0,42$ e $f(B) = 0,58$]. Este resultado está de acordo com os obtidos por Rainho, Pontes e Rogatto (1999) que, em trabalho sobre a expressão dos genes *H19* e *IGF2* em leiomiomas uterinos, encontraram os alelos A e B com uma frequência de 0,34 e 0,66, respectivamente, evidenciando menor frequência do alelo A.

Houve mudança nos valores das frequências gênicas quando as pacientes foram estratificadas em diferentes grupos de hipertensão arterial e controle. Entretanto o valor da frequência gênica do alelo A do *H19* permaneceu menor que a do alelo B.

Os resultados estatísticos demonstraram que as frequências relativas dos genótipos para *H19/RsaI* não diferiram entre mulheres com HAC, HG e PE/E. O pequeno número amostral pode ser a explicação para este resultado e futuros trabalhos com maior número de pacientes são necessários para comprovar a participação deste gene na etiologia da PE/E.

As frequências gênicas para *IGF2/ApaI* no grupo de PE/E foram $f(A) = 0,21$ e $f(G) = 0,79$ e as frequências genóticas AA 1,8%, AG 38,2%, GG 60,0%, evidenciando maior frequência do alelo G e do genótipo GG para este gene. Bermingham et al. (2000), estudando a relação de polimorfismos *IGF2/ApaI* com a PE encontram $f(A) = 0,61$ e $f(G) = 0,39$ e as seguintes frequências genóticas para *IGF2*, sendo AA 39,7%, AG 42,6%, GG 17,7%. Provavelmente, a explicação para a diferença nos resultados está na seleção das pacientes, uma vez que participaram desse estudo um grupo restrito de 68 primigestas

(irlandesas e caucasianas) que tiveram sua gestação resolvida por cesariana, enquanto o grupo de estudo do presente trabalho foi formado por 55 gestantes brasileiras (“brancas,” “negras”, “pardas/mulatas”) com PE/E, que tiveram a resolução da gestação por parto normal ou cesariana. Entretanto, a discrepância dos resultados talvez seja atribuída não somente aos diferentes critérios utilizados na seleção das pacientes, mas também às diferenças “raciais” e “étnicas” existente entre as populações irlandesa e brasileira.

Houve diferença estatística entre as frequências gênicas do *IGF2* encontradas por Gomes et al. (2005) em estudo realizado no mesmo laboratório, na população geral brasileira e os resultados atuais em gestantes. Foi observada uma maior frequência do alelo G no presente estudo em relação ao outro trabalho, o que poderia indicar uma maior fertilidade dos portadores deste alelo. Para uma análise estatística mais acurada seria necessário um aumento no número de gestantes na amostra em futuros trabalhos, além de grupos formados por mulheres comprovadamente férteis e também por mulheres inférteis para avaliar uma possível relação do alelo G com a fertilidade feminina, uma vez que a população estudada por Gomes et al. (2005) era formada por homens e mulheres com idade entre 18 e 30 anos que não haviam sido testados quanto à sua fertilidade.

A análise estatística demonstrou que as frequências relativas dos genótipos para *IGF2* não diferiram entre mulheres com HAC, HG e PE/E (Tabela 13). Estes resultados estão de acordo com Bermingham et al. (2000), que também não encontraram associação entre o *IGF2/ApaI* e o desenvolvimento da PE.

Outros estudos descritos na literatura de polimorfismos de genes, possivelmente envolvidos com a PE, também não foram informativos (ZHANG et al., 2005; KAUR et al., 2005; KIM et al., 2004). Conforme Dalmáz et al. (2006), os polimorfismos de *MTHFR*, *FII*, *Leiden* e *PAI-1*, que são genes relacionados a fatores de coagulação sanguínea, também não

apresentaram associação significativa entre pacientes com PE em uma população no sul do Brasil, quando os genótipos individuais e as frequências gênicas foram comparados entre casos e controles.

Estudos de ligação mais informativos mostraram em populações diferentes a segregação com a PE de pelo menos quatro *loci*, sendo mapeados nas regiões 2p12 em população da Islândia (ARNGRIMSSON et al., 1999), 2p25 e 9p13 na Finlândia (LAIUVUORI et al., 2003) e 10q22 na Holanda (LACHMEIJER et al., 2001; OUDEJANS et al., 2004).

O seqüenciamento de 17 genes em uma região crítica com efeito materno em 10q22 serviu para a identificação de variações nucleotídicas utilizadas para estudos posteriores de ligação de famílias de pacientes com PE na população holandesa. Esta região apresenta vários genes que sofrem *imprinting*, homologia com as regiões 2p12 e 9p13 (também descritas como ligadas à PE), homologia com uma região em camundongos ligada à pressão sanguínea e uma possível influência da origem parental, uma vez que, em famílias holandesas com PE, o alelo compartilhado entre os afetados era sempre o materno (OUDEJANS et al., 2004; VAN DIJK et al., 2005).

Através desses estudos foi caracterizado um gene candidato para o desenvolvimento da PE, o *Storkhead Box 1 (STOX1)*, que contém cinco diferentes mutações *missense*, idênticas entre irmãs afetadas, co-segregando com o fenótipo de PE e seguindo herança de linhagem materna (matrilínea). A sua expressão envolve pelo menos quatro transcritos diferentes na fase inicial da formação da placenta (VAN DIJK et al., 2005). Com a presença do efeito materno, a relação causal deste gene com a PE demonstra a importância da inclusão da pesquisa de marcadores não tradicionais (epigenéticos) para a PE.

A participação paterna na PE também pode ser discutida sob o ponto de vista de fatores epigenéticos, que receberam maior destaque após a observação da alta incidência de PE em gestações androgenéticas e a indução de PE em camundongo com mutação no gene *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C* (*CDKN1C* ou *p57^{Kip2}*) marcado paternalmente (maternalmente expresso). Foi observado que, camundongas prenhes portadoras de deleções heterozigotas do gene *CDKN1C* desenvolvem PE com uma seqüência de eventos placentários e sintomas clínicos idênticos ao dos humanos (KANAYAMA et al., 2002).

Outra característica dos genes estudados neste trabalho é o envolvimento no crescimento e desenvolvimento fetais. Portanto, uma associação dos polimorfismos com o desenvolvimento dos recém-nascidos também foi pesquisada. Os resultados mostraram que os genótipos maternos para *H19* e *IGF2* não apresentaram influência significativa sobre o peso dos recém-nascidos com ou sem correção do peso para a idade gestacional (Tabela 23).

Observou-se analisando os quatro grupos de estudo que a idade gestacional média foi menor no grupo de PE/E, assim como o menor peso médio do recém-nascido. Maior idade gestacional e peso do recém-nascido foram observados no grupo controle (Tabela 9). De acordo com estudos anteriores, recém-nascidos de mães com PE são menores e pré-termos (LONG; ABELL; BEISCHER, 1980; XIONG; BRISSON; FABIA, 2000; XIONG et al., 2002; BRAZY; GRIMM; LITTLE, 1982; MOORE; REDMAN, 1983;).

No entanto a análise estatística, não evidenciou efeito significativo do grupo sobre o peso do recém-nascido quando corrigido para idade gestacional, mas, o peso do recém-nascido, sem correção para a idade gestacional, teve um efeito significativo do grupo, o que também foi observado por Tranquilli e Giannubilo (2004).

Estudos futuros sobre a heterogeneidade clínica e fisiopatológica da PE/E, que avalie simultaneamente fatores clínicos e maternos, assim como a associação com fatores genéticos e epigenéticos auxiliarão a aumentar a predição de riscos clínicos e identificar intervenções que talvez atenuem os efeitos fetais e maternos associados com a PE/E.

6 CONCLUSÃO

O estudo mostrou um maior número de parentes de primeiro grau afetadas nas famílias de pacientes portadoras de PE/E em relação ao grupo de HG e ao grupo controle, indicando a necessidade da avaliação dos antecedentes familiares e posterior aconselhamento genético.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados em relação aos polimorfismos analisados (*H19/RsaI* e *IGF2/ApaI*), mostrando que os últimos não influenciam no desenvolvimento das síndromes hipertensivas gestacionais na população estudada.

Houve uma maior porcentagem (aproximadamente 80%) de pacientes com pelo menos uma cópia do alelo B (*H19*) e uma do alelo G (*IGF2*), concomitantemente. Esse resultado pode refletir a maior frequência dos alelos B e G na população estudada.

Os polimorfismos *H19/RsaI* e *IGF2/ApaI* maternos não apresentaram associação estatisticamente significativa com o peso dos recém-nascidos.

Esta é a primeira pesquisa da influência do polimorfismo *H19/RsaI* no desenvolvimento das síndromes hipertensivas gestacionais.

BIBLIOGRAFIA

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. **Hypertension in pregnancy**. Washington, DC: The College, 1-8, 1996. (ACOG Technical Bulletin n° 219).

ARNEY, K. L. *H19* and *IGF2*-enhancing the confusion? **Trends Genet**, Cambridge, v.19, n.1, p.17-23, 2003.

ARNGRIMSSON, R. Epigenetics of hypertension in pregnancy. **Nature Genetics**, New York, v.37, n.5, p.460-61, 2005.

ARNGRIMSSON, R.; BJORNSSON, H.; GEIRSSON, R. T. Analysis of different inheritance patterns in pre-eclampsia/eclampsia syndrome. **Hypertension in Pregnancy**, Philadelphia, v. 14, p. 27-38, 1995.

ARNGRIMSSON, R.; BJORNSSON, S.; GEIRSSON, R. T.; BJORNSSON, H.; WALKER, J. J.; SNAEDAL, G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.97, n.9, p.762-9, 1990.

ARNGRIMSSON, R.; CONNOR, J. M.; GEIRSSON, R. T.; BRENNECKE, S.; COOPER, D. W. Is genetic susceptibility for pre-eclampsia and eclampsia associated with implantation failure and fetal demise [letter]. **Lancet**, London, v.343, p.1643-4, 1994.

ARNGRIMSSON, R.; HAYWARD, C.; NADAUD, S.; BJARNADOTTIR, R. I.; BROCK, D. J.; GEIRSSON, R. T.; CONNOR, J. M.; SOUBRIER, F. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.61, p.354-62, 1997.

ARNGRIMSSON, R.; SIGURARDOTTIR, R. I.; JONSSON, T.; STEFANSSON, H.; BALDURSDOTTIR, A. S.; PALSSON, B.; SNORRADOTTIR, A. M.; NICOLAE, D.; KONG, A.; BRAGASON, B. T.; GULCHER, J. R.; GEIRSSON, R. T.; STEFANSSON, K. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. **Hum Mol Genet**, Oxford, v.8, n.9, p.1799-805, 1999.

BARLOW, D. P.; STOGER, R.; HERRMANN, B. G.; SAITO, K.; SCHWEIFER, N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor and closely linked to the Time locus. **Nature**, London, v.349, n.6304, p.84-7, 1991.

BARTOLOMEI, M. S.; ZEMEL, S.; TILGHMAN, S. M. Parental imprinting of the mouse *H19* gene. **Nature**, London, v.351, n.6322, p.153-5, 1991.

BELL, A. C.; FELSENFELD, G. Methylation of a CTCF – dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. **Nature**, London, v.405, n.6785, p.482-5, 2000.

BERMINGHAM, J.; JENKINS, D.; MCCARTHY, T.; O'BRIEN, M. Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. **Biochem Soc Trans**, London, v.28, n.2, p.215-9, 2000.

BOSIO, P. M.; CANNON, S.; MCKENNA, P. J.; O'HERLIHY, C.; CONROY, R.; BRADY, H. Plasma P-selectin is elevated in the first trimester in women who subsequently develop pre-eclampsia. **BJOG**, Oxford, v.108, n.7, p.709-15, 2001.

BOYD, P. A.; LINDENBAUM, R. H.; REDMAN, C. Pre-eclampsia and trisomy 13: a possible association. **Lancet**, London, v.2, n.8556, p.425-7, 1987.

BOYES, J.; BIRD, A. DNA methylation inhibits transcription indirectly a metal-CpG binding protein. **Cell**, Cambridge, v.64, p.1123-34, 1991.

BRANNAN, C. I.; DEES, E. C.; INGRAM, R.S.; TILGHMAN, S. M. The product of the *H19* gene may function as an RNA. **Mol Cell Biol**, Washington, v.10, n.1, p.28-36, 1990.

BRAZY, J. E.; GRIMM, J. K.; LITTLE, V. A. Neonatal manifestations of severe maternal hypertension occurring before the thirty-sixth week of pregnancy. **J Pediatr**, St. Louis, v.100, n.2, p.265-71, 1982.

BROSENS, I. A.; ROBERTSON, W. B.; DIXON, H. G. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. **Obstet Gynecol Annu**, New York, v.1, p.177-91, 1972.

BROUGHTON, P. F. What is the place of genetics in the pathogenesis of preeclampsia? **Biol Neonate**, Basel, v.76, p.325-330, 1999.

CAMPBELL, D. M.; MACGILLIVRAY, I.; CARR-HILL, R. Pre-Eclampsia in second pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.92, n.2, p.131-40, 1985.

CARR, D. B.; EPPLEIN, M.; JOHNSON, C. O.; EASTERLING, B. A.T. R.; CRITCHLOW, C. W. A sister's risk: Family history as a predictor of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.193, p.965-972, 2005.

CHAO, W., HUYNH, K. D.; SPENCER, R. J.; DAVIDOW, L. S.; LEE, J. T. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. **Science**, Washington, v.295, n.5553, p.345-7, 2002.

CHESLEY L. C. Hypertensive disorders of pregnancy. New York, Appleton-Century-Crofts, 1978.

CHESLEY, L. C. The genetics of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, Philadelphia, v.12, p.7-10, 1993.

CHESLEY, L. C.; COOPER, D. W. Genetics of hypertension in pregnancy: Possible single gene control of pre-eclampsia and eclampsia in the descendants of eclamptic women. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.93, p.898-908, 1986.

CHESLEY, L. C.; COSGROVE, R. A.; ANNITTO, J.E. Pregnancy in the sisters and daughters of eclamptic women. **Pathol Microbiol (Basel)**, Basel, v.24, p.662-6, 1961.

CINCOTTA, R. B.; BRENNECKE, S. P. **Family history of preeclampsia as a predictor for preeclampsia in primigravidas**. *Int J Gynecol Obstet*, 60(1):23-27, 1998.

CLAUSEN, T.; DJUROVIC, S.; RESELAND, J. E.; BERG, K.; DREVON, C. A.; HENRIKSEN, T. Altered plasma concentrations of leptin, transforming growth factor-beta (1) and plasminogen activator inhibitor type 2 at 18 weeks of gestation in women destined to develop pre-eclampsia. Circulating markers of disturbed placentation? **Placenta**, London, v.23, n.5, p.380-5, 2002.

CONSTANCIA, M.; DEAN, W.; LOPES, S.; MOORE, T.; KELSEY, G.; REIK, W. Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19. **Nat Genet**, New York, v.26, n.2, p.203-6, 2000.

CONSTANCIA, M.; HEMBERGER, M.; HUGHES, J.; DEAN, W.; FERGUSON-SMITH, A.; FUNDELE, R.; STEWART, F.; KELSEY, G.; FOWDEN, A.; SIBLEY, C.; REIK, W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, London, v.417, n.6892, p.945-8, 2002.

CONSTANCIA, M.; KELSEY, G.; REIK, W. Resourceful imprinting. **Nature**, London, v.432, n.7013, p.53-7, 2004.

COOPER, D. W., HILL, J. A., CHESLEY, L. C., BRYANS, C. I. Genetic control of susceptibility to eclampsia and miscarriage. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.95, p.644-53, 1988.

COOPER, D. W.; LISTON, W. A. Genetic control of severe pre-eclampsia. **J Med Genet**, London, v.16, p.409-16, 1979.

DALMÁZ, C. A.; SANTOS, K. G.; BOTTON, M. R.; TEDOLDI, C. L.; ROISENBERG, I. Relationship between polymorphisms in thrombophilic genes and preeclampsia in a Brazilian population. **Blood Cells Molecules and Diseases**, Orlando, v.37, p.107-10, 2006.

DAVEY, D. A.; MACGILLIVRAY, I. The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St Louis, v.158, n.4, p.892-98, 2000.

DAVIES, K.; BOWDEN, L.; SMITH, P.; DEAN, W.; HILL, D.; FURUUMI, H.; SASAKI, H.; CATTANACH, B.; REIK, W. Disruption of mesodermal enhancers for Igf2 in the minute mutant. **Development**, Cambridge, v.129, n.7, p.1657-68, 2002.

DAWSON, L. M.; PARFREY, P. S.; HEFFERTON, D.; DICKS, E. L.; COOPER, M. J.; YOUNG, D.; MARSDEN, P. A. Familial Risk of Preeclampsia in Newfoundland: A Population-Based Study. **J Am Soc Nephrol**, Washington, v.13, n.7, p.1901-6, 2002.

DECHIARA, T. M.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, Cambridge, v.64, n.4, p.849-59, 1991.

DEKKER, G. A. Risk factors for preeclampsia. **Clin Obstet Gynecol**, Hagerstown, v.42, p422-435, 1999.

DEKKER, G. A., SIBAI, B. M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts [see comments]. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.179, p.1359-75, 1998.

DEKKER, G. A.; SIBAI, B. M. The immunology of preeclampsia. **Semin Perinatol**, Philadelphia, v.23, p.24-33, 1999.

DUARTE, G.; CUNHA, S. P.; FILHO, F. M.; NOGUEIRA, A. A.; BEREZOWSKI, A. T.; RODRIGUES, R. Hipertensão Arterial e Gravidez. In: _____. **Protocolos de Condutas em Gestação de Alto Risco**. 3ª ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003, p.177-85.

DUCKITT, K.; HARRINGTON, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. **BMJ**, London, v.330, p.565-7, 2005.

EKHOLM, E. Hemodynamic measures in prediction of pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand Suppl**, Copenhagen, v.164, n.76, p.101-3, 1997.

ENGEL JUNIOR; SMALLWOOD, A.; HARPER, A.; HIGGINS, M. J.; OSHIMURA, M.; REIK, W.; SCHOFIELD, P. N.; MAHER, E. R. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-wiedemann syndrome. **J Med Genet**, London, v.37, n.12, p.921-6, 2000.

ERKKOLA R. Can pre-eclampsia be predicted and prevented? **Acta Obstet Gynecol Scand Suppl**, Copenhagen, v.164, n.76, p.98-100, 1997.

ESPLIN, M. S.; FAUSETT, M. B.; FRASER, A.; KERBER, R.; MINEAU, G.; CARRILLO, J.; VARNER, M. W. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. **N Engl J Med**, Boston, v.344, n.12, p.867-72, 2001.

FERGUSON-SMITH, A. C.; CATTANACH, B. M.; BARTON, S. C.; BEECHEY, C. V.; SURANI, M. A. Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. **Nature**, Basingstoke, v.351, n.6328, p.667-70, 1991.

FERREIRA, L. B.; MENDES-JUNIOR, C. T.; WIEZEL, C. E. V.; LUIZON, M. R.; SIMÕES, A. L. Genetic ancestry of a sample population from the State of São Paulo, Brazil. **Am J Hum Biol**, New York, v.18, p.702-4, 2006.

GABORY, A.; RIPOCHE, M. A.; YOSHIMIZU, T.; DANDOLO, L. The H19 gene: regulation and function of a non –coding RNA. **Cytogenet Genome Res**, Basel, v.113, n.1-4, p.188-93, 2006.

GAIO, D. S.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; NUCCI, L. B.; MATOS, M. C.; BRANCHTEIN, L. Hypertensive disorders in pregnancy: frequency and associated factors in a cohort of brazilian women. **Hypertension in Pregnancy**, Philadelphia, v.20, n.3, p.269-81, 2001.

GIANNOUKAKIS, N.; DEAL, C.; PAQUETTE, J.; GOODYER, C. G.; POLYCHRONAKOS, C. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. **Nat Genet**, New York, v.4, n.1, p.98-101, 1993.

GOLDSTEIN, D. P.; BERKOWITZ, R. S. Current management of complete and partial molar pregnancy. **J Reprod Med**, St. Louis, v.39, n.3, p.139-46, 1994.

GOMES, M. V. M.; SOARES, M. R.; PASQUALIM-NETO, A.; MARCONDES, C. R.; LÔBO, R. B.; RAMOS, E. S. Association between birth weight, body mass index and IGF2/ApaI polymorphism. **Growth Horm IGF Res**, Edinburgh, v.15, n.5, p.360-2, 2005.

GOODWIN, A. A.; MERCER, B. M. Does maternal race or ethnicity affect the expression of severe preeclampsia? **Am J Obstet Gynecol**, New York, v.193, p.973-8, 2005.

GRAVES, J. A. M. Genomic imprinting, development and disease—is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? **Reprod Fertil Dev**, East Melbourne, v.10, p.23–9, 1998.

HAO, Y.; CRENSHAW, T.; MOULTON, T.; NEWCOMB, E.; TYCKO, B. Tumor-suppressor activity of H19 RNA. **Nature**, Basingstone, v.365, n.6448, p.764-7, 1993.

HARK, A. T.; SCHOENHERR, C. J.; KATZ, D. J.; INGRAM, R. S.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, S. M. CTCF mediates methylation –sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. **Nature**, London, v.405, n.6785, p.486-9, 2000.

HARLOW, F. H.; BROWN, M. A. The diversity of diagnoses of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, New York, v.20, n.1, p.57-67, 2001.

HATADA, I.; MUKAI, T. Genomic imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. **Histol Histopathol**, Murcia, v.15(1):309-12, 2000.

HELEWA, M. E.; BURROWS, R. F.; SMITH, J.; WILLIAMS, K.; BRAIS, P.; RABKIN, W. Report of the Canadian Hypertension Society consensus conference: 1. Definitions, evaluation and classification of hypertensive disorders in pregnancy. **Can Med Assoc J**, Vancouver, v.157, n.15, p.715-25, 1997.

HIGGINS, J. R.; SWIET, M. Blood-pressure measurement and classification in pregnancy. **Lancet**, London, v.357, n.13, p.131-5, 2001.

HUBEL, C. A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. **Proc Soc Exp Biol Med**, Malden, v.222, n.3, p.222-35, 1999.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNISSKY, H. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols; a guide to methods and applications**. San Diego; Academic Press, 1990.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.**, v.33, p.245-54,2003.

JONES, B. K.; LEVORSE, J. M.; TILGHMAN, S. M. *IGF2* imprinting does not requires its own DNA methylation or *H19* RNA. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v.12, n.14, p.2200-7, 1998.

KANAYAMA, N.; TAKAHASHI, K.; MATSUURA, T.; SUGIMURA, M.; KOBAYASHI, T.; MONIWA, N.; TOMITA, M.; NAKAYAMA, K. Deficiency in p57Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v.8, n.12, p.1129-35, 2002.

KANDURI, C.; PANT, V.; LOUKINOV, D.; PUGACHEVA, E.; QI, C. F.; WOLFFE, A.; OHLSSON, R.; LOBANENKOV, V. V. Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin –specific and methylation –sensitive. **Curr Biol**, Cambridge, v.10, n.14, p.853-6, 2000.

KAUR, R.; JAIN, V.; KHULLER, M.; GUPTA, I. SHERAWAT, B. S. Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with pregnancy-induced hypertension. **Acta Obstet Gynecol Scand**, Copenhagen, v.84, n.10, p.929-33, 2005.

KHAN, K. S., WOJDYLA D., SAY L., GÜLMEZOGLU, A. M., LOOK P. F. A. V. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review., **Lancet**, London, v.367, p.1066-74, 2006.

KILPATRICK, D. C. Influence of human leukocyte antigen and tumor necrosis factor genes on the development of pre-eclampsia. **Hum Reprod Update**, Oxford, v.5, p.94-102, 1999.

KIM, Y. J.; PARK, M. H.; PARK, H. S.; LEE, K. S.; HÁ, E. H.; PANG, M. G. Associations of polymorphisms of the angiotensinogen M235 polymorphism and angiotensin-converting-enzyme intron 16 insertion/deletion polymorphism with preeclampsia in Korean women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Limerick, v. 116, n.1, p.48-53, 2004.

LACHMEIJER, A. M.; ARNGRIMSSON, R.; BASTIAANS, E. J.; FRIGGE, M. L.; PALS, G.; SIGURDARDOTTIR, S.; STEFANSSON, H.; PALSSON, B.; NICOLAE, D.; KONG, A.; AARNOUDSE, J. G.; GULCHER, J. R.; DEKKER, G. A.; TEM KATE, L. P.; STEFANSSON, K. A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. **Eur J Hum Genet**, London, v.9, n.10, p.758-64, 2001.

LAIVUORI, H.; LAHERMO, P.; OLLIKAINEN, V.; WIDEN, E.; HAIVA-MALLINEN, L.; SUNDSTROM, H.; LAITINEN, T.; KAAJA, R.; YLIKORKALA, O.; KERE, J. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish families. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.72, n.1, p.168-77, 2003.

LAM, W. W.; HATADA, I.; AHISHI, S.; MUKAI, T.; JOYCE, J. A.; COLE, T. R.; DONNAI, D.; REIK, W.; SCHOFIELD, P. N.; MAHER, E. R. Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. **J Med Genet**, London, v.36, n.7, p.518-23, 1999.

LEE, J. E.; PINTAR, J.; EFSTRATIADIS, A. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. **Development**, Cambridge, v.110, p.151-9, 1990.

LEE, M. P.; DEBAUN, M. R.; MITSUYA, K.; GALONEK, H. L.; BRANDENBURG, S.; OSHIMURA, M.; FEINBERG, A. P. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.96, n.9, p.5203-8, 1999.

LEE, M. P.; DEBAUN, M.; RANDHAWA, G.; REICHARD, B. A.; ELLEDGE, S. J.; FEINBERG, A. P. Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.61, n.2, p.304-9, 1997.

LEIGHTON, P. A.; INGRAM, R. S.; EGGENSCHWILER, J.; EFSTRATIADIS, A.; TILGHMAN, S. M. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. **Nature**, London, v.375, p.34-9, 1995.

LEVINE, R. J.; EWELL, M. G.; HAUTH, J. C.; CURET, L. B.; CATALANO, P. M.; MORRIS, C. D.; CHOUDHARY, G.; SIBAI, B. M. Should the definition of preeclampsia include a rise in diastolic blood pressure of ≥ 15 mmHg to a level <90 mmHg in association with proteinuria? **Am J Obstet Gynecol**, St Louis, v.183, n.4, p.787-92, 2000.

LEVINE, R. J.; MAYNARD, S. E.; OLAN, C.; LIM, K. H.; ENGLAND, L. J.; YU, K. F.; SCHISTERMAN, E. F.; SACHS, B. P.; EPSTEIN, F. H.; SIBAI, B. M.; SUKHATME, V. P.; KARUMANCHI, S. A. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med**, Boston, v.350, n.7, p.672-83, 2004.

LEVINE, R. J.; THADHANI, R.; QIAN, C.; LAM, C.; LIM, K. H.; YU, K. F.; BLINK, A. L.; SACHS, B. P.; EPSTEIN, F. H.; SIBAI, B. M.; SUKHATME, V. P.; KARUMANCHI, S. A. Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. **JAMA**, Chicago, v.293, n.1, p.77-85, 2005.

LIE, R. T.; RASMUSSEN, S.; BRUNBORG, H.; GJESSING, H. K.; LIE-NIELSEN, E.; IRGENS, L. M. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: Population-based study. **Br Med J**, London, v.316, p.1343-7, 1998.

LIM, K. H.; ZHOU, Y.; JANATPOUR, M.; MCMASTER, M.; BASS, K.; CHUN, S. H. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. **Am J Pathol**, Bethesda, v.151, p.1809-18, 1997.

LISTON, W. A.; KILPATRICK, D. C. Is genetic susceptibility to pre-eclampsia conferred by homozygosity for the same single recessive gene in mother and fetus? **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.98, p.1079-86, 1991.

LONG, P.A.; ABELL, D. A.; BEISCHER, N. A. Fetal growth retardation and pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.87, n.1, p.13-8, 1980.

MAHER, E. R.; REIK, W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in cluster revisited. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v.105, n.3, p.247-52, 2000.

MARUYAMA, A.; NAKAYAMA, T.; SATO, N.; MIZUTANI, Y.; FURUYA, K.; YAMAMOTO, T. Association Study Using Single Nucleotide Polymorphisms in the Estrogen Receptor *b* (ESR2) Gene for Preeclampsia. **Hypertens Res**, Toyonaka, v.27, n.12, p.903-9, 2004.

MATSUOKA, S.; EDWARDS, M. C.; BAI, C.; PARKER, S.; ZHANG, P.; BALDINI, A.; HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v.9, n.6, p.650-62, 1995.

MCCOWAN, L. M.; BECROFT, D. M. Beckwith-Wiedemann syndrome, placental abnormalities, and gestational proteinuric hypertension. **Obstet Gynecol**, Hagerstown, v.83, n.5, p.813-7, 1994.

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol**, London, v.2, n.9, p.656-63, 2002.

MOGREN, I.; HOQBERQ, U.; WINKVIST, A.; STENLUND, H. Familial occurrence of preeclampsia. **Epidemiology**, Baltimore, v.10, n.5, p.518-22, 1999.

MOORE, M. P.; REDMAN, C. W. Case-control study of severe pre-eclampsia of early onset. **Br Med J (Clin Res Ed)**, London, v.287, n.6392, p.580-3, 1983.

MORGAN, L. CRAWSHAW, S., BAKER, P. N., BROUGHTON, P. F.; KALSHEKER, N. Maternal and fetal angiotensinogen gene allele sharing in pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.106, p.244-51, 1999.

MORISON, I. M.; PATON, C. J.; CLEVERLEY, S. D. The imprinted gene and parent-of-origin effect database. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.29, n.1, p.275-6, 2001.

MORISON, I. M.; RAMSAY, J. P.; SPENCER, H. G. A census of mammalian imprinting. **Trends in Genetics**, Cambridge, v.21, n.8, p.457-65, 2005.

MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Imprinting evolution and the price silence. **Bioessays**, New York, v.25, n.6, p.577-88, 2003.

MURRELL, A.; HEESON, S.; BOWDEN, L.; CONSTANCIA, M.; DEAN, W.; LEKSEY, G.; REIK, W. An intragenic methylated region in the imprinted *Igf2* gene augments transcriptions. **EMBO Rep**, London, v.2, n.12, p.1101-6, 2001.

MURRELL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. **Nat Genet**, New York, v.36, n.8, p.889-93, 2004.

NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM (NHBPEP). Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**; St. Louis, v.183, S1-S22, 2000.

NEED, J. A. Preeclampsia in pregnancies by different fathers: immunological studies. **Br Med J**, London, v.1, p.548, 1975.

NEYROUD, N.; RICHARD, P.; VIGNIER, N.; DONGER, C.; DENJOY, I.; DEMAY, L.; SHKOLNIKOVA, M.; PESCE, R.; CHEVALIER, P.; HAINQUE, B.; COUMEL, P.; SCHWARTZ, K.; GUICHENEY, P. Genomic organization of the *KCNQ1* K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. **Circ. Res**, Baltimore, v.84, n.3, p.290-7, 1999.

NORTH, A. R.; RENNAE, S. T.; SCHELENBERG, J. C. Evaluation of a definition of pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.106, p.767-73, 1999.

O'DELL, S. D.; DAY, I. N. M. Molecules in focus Insulin Like growth factor II (IGF-II). **Int J Bioch Cell Biol**, Exeter, v.30, p.767-71, 1998.

OHLSSON, R.; HOLMGREN, L.; GLASER, A.; SZPECHT, A.; PFEIFER-OHLSSON, S. Insulin-like growth factor 2 and short-range stimulatory loops in control of human placental growth. **EMBO J**, v.8, n.(7), p.1993-9, 1989.

OHLSSON, R.; NYSTROM, A.; PFEIFER-ONLSSON, S.; TOHONEN, V.; HEDBORG, F.; SCHOFIELD, P.; FLAM, F.; EKSTROM, T. J. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nature Genetics**, New York, v.4, p. 94-7, 1993.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.39, n.5, p.225-35, 1992.

ONG, C. Y.; LIAO, A. W.; MUNIM, S.; SPENCER, K.; NICOLAIDES, K. H. First-trimester maternal serum activin A in pre-eclampsia and fetal growth restriction. **J Matern Fetal Neonatal Med**, Boca Raton, v.15, n.3, p.176-80, 2004.

OUDEJANS, C. B.; MULDER, J.; VAN DIJK, M.; KONST, A. A.; WESTERMAN, B. A.; VAN WIJK, I. J.; LEEGWATER, P. A.; KATO, H. D.; MATSUDA, T.; WAKE, N.; DEKKER, G. A.; PALS, G.; BLANKENSTEIN, M. A. The parent-of -origin effect of 10q22 in pre-eclamptic females coincides with two regions clustered for genes with down-regulated expression in androgenetic placentas. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v.10, n.8, p.589-98, 2004.

PACHNIS, V.; BRANNAN, C. I.; TILGHMAN, S. M. The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. **EMBO J**, Oxford, v.7, n.3, p.673-81, 1988.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Health in the Americas. **PAHO Scientific Publication**, Washington, v.2, n.569, p.210-20, 1998.

PAULSEN, M.; SMITH-FERGUSON, A. C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. **J Pathol**, Chichester, v.195, p.97-110, 2001.

PERAÇOLI, J. C.; MARCHIOLI, M.; RUDGE, M. V. C. Controvérsia na classificação da hipertensão arterial da gestação: até quando? **Femina**, Rio de Janeiro, v.29, n.9, p.597-601, 2001.

POON, L. L. M.; LEUNG, T. N.; LAU, T. K.; CHOW, K. C. K.; LO, Y.M. D. Differential DNA Methylation between Fetus and Mother as a Strategy for Detecting Fetal DNA in Maternal Plasma. **Clinical Chemistry**, Washington, v.48, n.1, p.35–41, 2002.

QIU, C.; LUTHY, D. A.; ZHANG, C.; WALSH, S. W.; LEISENRING, W. M.; WILLIAMS, M. A. A prospective study of maternal serum C-reactive protein concentrations and risk of preeclampsia. **Am J Hypertens**, New York, v.17, p.154-60, 2004.

RACHMILEWITZ, J.; GILEADI, O.; ELДАР-GEVA, T.; SCHNEIDER, T.; DE-GROOT, N.; HOCHBERG, A. Transcription of the H19 gene in differentiating cytotrophoblasts from human placenta. **Mol Reprod Dev**, New York, v.32, n.3, p.196-202, 1992b.

RACHMILEWITZ, J.; GOSHEN, R.; ARIEL, I.; SCHNEIDER, T.; DE GROOT, N.; HOCHBERG, A. Parental imprinting of the human H19 gene. **FEBS Lett**, Amsterdam, v.309, n.1, p.25-8, 1992a.

RAINHO, C. A.; PONTES, A.; ROGATTO, S. R. Expression and imprinting of insulin-like growth factor II (IGF2) and H19 genes in uterine leiomyomas. **Gynecol Oncol**, Chevy Chase, v.74, n.3, p.375-80, 1999.

RAINIER, S.; JOHNSON, L. A. Relaxation of imprinted genes in human cancer. **Nature**, Basingstoke, v.362, p.747-9, 1993.

REDMAN, C. G. W.; JEFERIES, M. Revised definition of pre-eclampsia. **Lancet**, London, v.9, p.809-12, 1988.

REDMAN, C. W.; SACKS, G. P.; SARGENT, I. L. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, New York, v.180, p.499-506, 1999.

REDMAN, C. W.; SARGENT, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. **Science**, Washington, v.308, p.1592-94, 2005.

REIK, W.; MAHER, E. R. Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. **Trends Genet**, Cambridge, v.13, n.8, p.330-4, 1997.

REIK, W.; WALTER, J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. **Nat Genet**, New York, v.27, n.3, p.255-6, 2001.

ROBERTS, J. M. Endothelial dysfunction in preclampsia. **Semin Reprod Endocrinol**, New York, v.16, p.5-15, 1998.

ROBERTS, J. M. Preeclampsia: what we know and what we do not know. **Semin Perinatol**, Philadelphia, v.24, p.24-8, 2000.

ROBERTS, J. M.; REDMAN, C. W. Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension. **Lancet**, London, v.341, p.1447-51, 1993.

ROSSANT, J.; CROSS, J. C. Placental development: lessons from mouse mutants. **Nat Rev Genet**, London, v.2, p.538-48, 2001.

SAFTLAS A. F.; OLSON D. R.; FRANKS A. L.; ATRASH H.; POKRAS R. Epidemiology of preeclampsia and eclampsia in the United States, 1979-1986. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.163, p.460-5, 1990.

SALOMON, L. J.; BENATTAR, C.; AUDIBERT, F.; FERNANDEZ, H.; DUyme, M.; TAIEB, J.; FRYMAN, R. Severe preclampsia is associated with high inhibin A levels and normal leptin levels at 7 to 13 weeks into pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.189, n.6, p.1517-22, 2003.

SAMADI, A. R.; MAYBERRY, R. M.; ZAIDI, A. A.; PLEASANT, J. C.; MCGHEE JUNIOR, N.; RICE, R.J. Maternal hypertension and associated pregnancy complications among African-american and other women in the United States. **Obstet Gynecol**, Hagerstown, v.87, n.4, p.557-63, 1996.

SARGENT, I. L.; GERMAIN, S. J.; SACKS, G. P.; KUMAR, S.; REDMAN, C. W. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. **J Reprod Immunol.**, Limerick, v.59, n.2, p.153-60, 2003.

SAS, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2003.

SIBAI, B. M. Hypertension in pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, Philadelphia, v.42, n.3, p.421, 1999.

SMETS, E. M. L; VISSER, A.; GO, A. T. J. I.; VAN VUGT, J. M. G.; OUDEJANS, C. B. M. Novel biomarkers in preeclampsia. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.364, p.22-32, 2006.

SMILINICH, N. J.; DAY, C. D.; FITZPATRICK, G. V.; CALDWELL, G. M.; LOSSIE, A. C.; COOPER, P. R.; SMALLWOOD, A. C.; JOYCE, J. A.; SCHOFIELD, P. N.; REIK, W.; NICHOLLS, R. D.; WEKSBERG, R.; DRISCOLL, D. J.; MAHER, E. R.; SHOWS, T. B.; HIGGINS, M. J. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v.96, n.14, p.8064-9, 1999.

SOHDA, S.; ARINAMI, T.; HAMADA, H.; YAMADA, N.; HAMAGUCHI, H.; KUBO, T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. **J Med Genet**, London, v.34, p.525-6, 1997.

SQUIRE, J.; WEKSBERG, R. Genomic imprinting in tumors. **Semin Cancer Biol**, London, v.7, n.1, p.41-7, 1996.

STEER, P. J. The definition of pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.106, p.753-55, 1999.

SUTHERLAND, A.; COOPER, D. W.; HOWIE, P. W.; LISTON, W. A.; MACGILLIVRAY, I. The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptics and controls. **Br J Obstet Gynaecol**, Oxford, v.88, p.785-91, 1981.

TADOKORO, K.; FUJIII, H.; INOUE, T.; YAMADA, M. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of ApaI polymorphism at the insulin like growth factor II gene (IGF2). **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.19, n.24, p.6967, 1991.

TELLES, E. E. Industrialization and racial inequality in employment: The Brazilian example. **Am Sociol Rev**, NewYork, v.59, p.46-63, 1994.

THARDHANI, R.; MUTTER, W. P.; WOLF, M.; LEVINE, R. J.; TAYLOR, R. N.; SUKHATME, V. P.; ECKER, J.; KARUMANCHI, S. A. First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia. **J Clin Endocrinol Metab**, Chevy Chase, v.89, n.2, p.770-5, 2004.

THORVALDSEN, J. L.; DURAN, K. L.; BARTOLOMEI, M. S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. **Genes Dev**, Cold Spring Harbor, v.12, n.23, p.3693-702, 1998.

TJOA, M. L., VAN VUGT, J. M.; GO, A. T.; BLANKENSTEIN, M. A.; OUDEJANS, C. B.; VAN WIJK, I. J. Elevated C-reactive protein levels during first trimester of pregnancy are indicative of preeclampsia and intrauterine growth retardation. **J Reprod Immunol**, Limerick, v.59, p.29-37, 2003.

TJOA, M. L.; VAN VUGT, J. M.; MULDER, M. A.; SCHUTGENS, R. B.; OUDEJANS, C. B.; VAN WIJK, I. J. Plasma placenta growth factor levels in midtrimester pregnancies. **Obstet Gynecol**, Hagerstown, v.98, p.596-9, 2001.

TOWBIN, J. A.; LI, H.; TAGGART, R. T.; LEHMANN, M. H.; SCHWARTZ, P. J.; SATLER, C. A.; AYYAGARI, R.; ROBINSON, J. L.; MOSS, A.; HEJTMANCIK, J. F. Evidence of genetic heterogeneity in Romano-Ward long QT syndrome. Analysis of 23 families. **Circulation**, Hagerstown, v.90, n.6, p.2635-44, 1994.

TRANQUILLI, A. L.; GIANNUBILO, S. R. The "weight" of fetal growth restriction in 437 hypertensive pregnancies. **Arch Gynecol Obstet**, Berlin, v.270, p.214-6, 2004.

URNOV, F. D.; WOLFFE, A. P. Above and within the genome: epigenetics past and present. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, New York, v.6, p.153-67, 2001.

VAN DIJK, M.; MULDER, J.; POUTSMA, A.; KONST, A. A. M.; LACHMEIJER, A. M. A.; DEKKER, G. A.; BLANKENSTEIN, M. A.; OUDEJANS, C. B. M. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. **Nature Genetics**, New York, v.37, n.5, p.514-9, 2005.

VARMUZA, S.; MANN, M. Genomic imprinting-defusing the ovarian time bomb. **Trends Genet**, Cambridge, v.10, n.4, p.118-23, 1994.

WALKER, J. J. Preeclampsia. **Lancet**, London, v.356, p.1260-5, 2000.

WALTER, J.; PAULSEN, M. Imprinting and Disease. **Semin Cell Dev Biol**, London, v.14, n.1, p.101-10, 2003.

WANG, Q.; CURRAN, M. E.; SPLAWSKI, I.; BURN, T. C.; MILLHOLLAND, J. M.; VANRAAY, T. J.; SHEN, J.; TIMOTHY, K. W.; VINCENT, G. M.; DE JAGER, T.; SCHWARTZ, P. J.; TOUBIN, J. A.; MOSS, A. J.; ATKINSON, D. L.; LANDES, G. M.; CONNORS, T. D.; KEATING, M. T. Positional cloning of a novel potassium channel gene: *KVLQT1* mutations cause cardiac arrhythmias. **Nat Genet**, New York, v.12, n.1, p.17-23, 1996.

WEBER, M.; MILLIGAN, L.; DELALBRE, A.; ANTOINE, E.; BRUNEL, C.; CATHALA, G.; FORNE, T. Extensive tissue-specific variation of allelic methylation in the *Igf2* gene during mouse fetal development: relation to expression and imprinting. **Mech Dev**, Limerick, v.101, n.1-2, p.133-41, 2001.

WEKSBERG, R.; SHEN, D. R.; FEI, Y. L.; SONG, Q. L. SQUIRE, J. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Nat Genet**, New York, v.5, n.2, p.143-50, 1993.

WILSON, M. L.; GOODWIN, T. M.; PAN, V. L.; INGLES, S. A. Molecular Epidemiology of Preeclampsia. **Obstet Gynecol Surv**, Baltimore, v.58, n.1, p.39-66, 2002.

WOLFFE, A. P.; MATZKE, M. A. Epigenetics regulation through repression. **Science**, Washington, v.293, p.226-32, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Arterial Hypertension. **Technical Report Series**, Geneva, v.628, 1978.

XIONG, X.; BRISSON, J.; FABIA, J. The effect of cigarette smoking on the risk of preeclampsia and gestational hypertension. **Am J Obstet gynecol**, New York, v.183, p.148-55, 2000.

XIONG, X.; DEMIANCZUK, N. D.; SAUNDERS, L. D.; WANG, F. L.; FRASER, W. D. Impact of preeclampsia and gestational hypertension on birth weight by gestational age. **Am J Epidemiol**, Cary, v.155, p.203-9, 2002.

YAMADA, N.; ARINAMI, T.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; WATANABE, H.; SOHDA, S.; HAMADA, H.; KUBO, T.; HAMAGUCHI, H. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. **J Hum Genet**, Tokyo, v.45, p.138-41, 2000.

ZHANG, Y.; TYCKO, B. Monoallelic expression of the human *H19* gene. **Nat Genet**, New York, v.1, p.40-4, 1992.

ZHANG, Z.; JIA, L.; HOU, L.; XIONG, P.; WU, X.; WANG, X.; HUANG, Y.; KE, H.; CHANG, C.; CUI, S.; GONG, F. Analysis of TAP1 and TAP2 polymorphism of mother-infant in Chinese patients with pre-eclampsia. **Cell Mol Immunol**, Beijing, v.2, n.2, p.141-4, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 26 de maio de 2004

Ofício nº 1525/2004
CEP/SPC

Senhora Professora:

O trabalho intitulado "**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA REGIÃO 11p15.5 NA PRÉ-ECLÂMPSIA**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 180ª Reunião Ordinária realizada em 24/05/2004, e enquadrado na categoria: **APROVADOS, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4628/2004. Lembramos que devem ser encaminhados a este CEP relatórios semestrais e relatório final da pesquisa.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PROFª DRª ESTER SILVEIRA RAMOS
FRANCIELLE MARQUES ARAÚJO (Mestranda)
Diretora do Comitê de Ética em Pesquisa - FMRP-USP

ANEXO B - Aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 2066/2004

Registro CONEP: 19401 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE-0091.0.004.000-04 Processo nº 25000.000992/2004-11
Projeto de Pesquisa: "Estudo da Influência da Região 11p15.5 na Pré-Eclâmpsia"
Pesquisador Responsável: Dra. Ester Silveira Ramos
Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo
Área Temática Especial: Genética Humana e Reprodução Humana

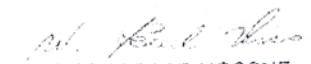
Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 1351/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) O projeto preenche os requisitos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/98, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

Brasília, 5 de Outubro de 2004.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



CEP. 14048-900
RIBEIRÃO PRETO - S.P.
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

ESCLARECIMENTO AO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME DA PESQUISA: “**Estudo da influência da região 11p15.5 na pré-eclâmpsia**”
2. PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Francielle M. Araujo, Profa. Dra. Ester S. Ramos (CRM - 57.626)
3. PROMOTOR DA PESQUISA: Hospital das Clínicas da FMRP-USP
4. ESCLARECIMENTOS: Algumas mulheres após a 20ª semana de gravidez apresentam pressão alta e perda de proteínas na urina, o que é chamado de pré-eclâmpsia. Se a paciente não tiver os cuidados médicos necessários, o problema pode se agravar e prejudicar a saúde da mãe e do bebê. Uma das causas pode ser genética (ou de família) podendo repetir em parentes. Nesta pesquisa, através dos resultados de algumas perguntas sobre sua família e alguns exames, poderá ser dada depois uma melhor orientação para você e seus parentes. O estudo não trará nenhuma despesa para você. Você pode auxiliar neste trabalho através de um pouco de sangue e com um pouco de urina (colhidos como qualquer exame de rotina). Em casos especiais, também com um pedacinho da placenta depois que ela estiver fora do útero e não tiver mais contato com o nenê. Todo esse material será usado para estudar a sua constituição genética através do DNA (mas não será utilizado para outros fins sem um novo consentimento).

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Francielle Marques Araujo/Ester Silveira Ramos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ RG nº _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições do Projeto de Pesquisa intitulado “**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA REGIÃO 11p15.5 NA PRÉ-ECLÂMPسيا**” que tem como pesquisadoras responsáveis a Srta. Francielle Marques Araujo e a Profa. Dra. Ester Silveira Ramos, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. 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 serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e de deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhado(a) e assistido(a) durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

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

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

APÊNDICE B - Questionário

DATA: __/__/__ I.G. : _____

Local do pré-natal:

Local do parto:

Identificação da paciente

4.1 Registro: _____

4.2 Nome: _____

4.3 Idade: _____ 4.4 Cor/Desc.: _____ 4.5 Estado civil: _____

4.6 Endereço: _____

4.7 Bairro/Cidade: _____ Fone: _____

5 Patologias associadas:

5.1 Fuma: Sim Não O quê: _____

Quantidade: _____ Traga: _____

Antecedentes obstétricos

6.1 GPA (C): _____ 6.2 IG: _____

6.3 Alterações fetais pregressas: _____

7. Gestação atual

7.1 Alterações no Ultra-som: _____

8 Alguma patologia durante a gestação ou perinatal: _____

9. Recém nascido

9.1 RN vivo: _____ 9.2 Tipo de parto: _____

9.3 Indicação: _____

9.4 Apgar: _____ 9.5 Peso: _____ 9.6 Estatura: _____

9.7 Peso da placenta: _____ IG no nascimento: _____

9.8 Data Nasc: _____ 9.9. Temp.(° C): _____

10. Método Anticoncepcional:

11. Mesmo parceiro:

12 Proteinúria: _____ PA: _____

Heredograma

APÊNDICE C - Grupos participantes do estudo

Grupo Controle

Caso	Id. Mat. (anos)	Peso RN (gr)	I. G. (sem. e dias)	Genótipo IGF2	Genótipo H19
1	34	2785	38s2d	AG	AA
2	21	2195	34s3d	GG	BB
3	31	2625	40s	GG	AB
4	24	2835	39s6d	GG	BB
5	30	795	25s9d	GG	AB
6	17	3055	38s6d	GG	AA
7	19	2875	39s4d	AG	AB
8	24	3030	36s1d	GG	BB
9	24	2590	41s4d	GG	AA
10	25	2765	37s5d	AG	AB
11	21	3770	39s1d	GG	AB
12	17	2720	41s2d	AG	AB
13	32	4255	40s2d	GG	AA
14	24	3710	40s5d	GG	AB
15	30	2690	37s3d	GG	AB
16	19	2730	36s1d	GG	AB
17	27	2665	41s	GG	AB
18	20	3020	35	GG	BB
19	28	2360	38s4d	AG	AB
20	21	3505	37s5d	GG	BB
21	29	3430	39s5d	GG	BB
22	30	2800	40s6d	GG	AB
23	32	4285	41s	AG	AB
24	27	NDP	NDP	AG	AB
25	20	3810	41s1d	GG	BB
26	21	3270	40s5d	AG	AA
27	22	2990	38s4d	GG	AA
28	28	3465	38s4d	GG	AB
29	22	2620	38s1d	GG	AB
30	41	3325	38s	AG	AB
31	24	2975	37s6d	GG	BB
32	16	2675	39s6d	GG	AA
33	28	3330	40s6d	AG	AB
34	19	3270	41s5d	AA	BB
35	33	3645	41s2d	AG	BB
36	21	2975	39s3d	AA	AB
37	21	2885	35s6d	AG	AB
38	28	2775	35s1d	GG	AA

39	28	3370	39s5d	GG	BB
40	31	2530	38s5d	AG	AB
41	22	3285	39s1d	GG	AB
42	28	3000	37s5d	GG	AB
43	34	NDP	NDP	GG	BB
44	20	2470	37s5d	GG	AB
45	34	3375	36s5d	GG	BB
46	17	2700	37s4d	GG	AB
47	14	3160	37s2d	GG	BB
48	20	3080	39s4d	GG	BB
49	16	3260	38s4d	GG	AB
50	32	3265	39s4d	AG	BB
51	23	2405	37s3d	AG	AA
52	21	4190	42s	AG	AB
53	31	2980	NDP	AG	X
54	19	2980	39s5d	GG	BB
55	19	3070	41s2d	AG	AB
56	32	3945	39s2d	AG	AB
57	23	3225	40s1d	AG	AB
58	39	3360	39s5d	AG	AB
59	30	125	38s	AG	AB
60	35	3000	41s3d	AG	AB
61	23	2440	35s3d	AG	AB
62	23	3240	NDP	AG	X
63	22	2090	32s	AA	AB
64	36	3080	40s	GG	AB
65	23	3405	35s1d	GG	AB
66	23	3240	39s2d	AG	AA
67	23	3445	39s5d	GG	AB
68	29	3770	41s1d	GG	AB
69	27	2050	34s1d	AG	AB
70	34	NDP	NDP	GG	AB
71	27	2235	38s4d	GG	AB
72	29	5030	38s4d	GG	AA
73	18	2410	33s2d	GG	AB
74	23	3280	40s4d	GG	AB
75	25	2365	36s	GG	AA
76	23	3230	38s	AG	AB
77	28	3880	40s2d	AG	AB
78	19	2070/2395	34s6d	GG	AB
79	27	NDP	NDP	AA	AB
80	25	3055	40s5d	AG	AB
81	19	3430	38s6d	GG	BB
82	25	3660	41s2d	GG	AB
83	23	3785	39s1d	GG	AB

84	48	NDP	NDP	AG	AB
85	24	2745	38s5d	GG	AB
86	29	3475	40s	AG	AA
87	23	2900	37s	AG	AB
88	30	NDP	NDP	GG	X
89	29	3550	NDP	GG	X
90	20	2860	39s5d	AG	BB
91	28	3430	42s	GG	AB
92	25	3815	41s6d	AA	AB
93	27	3240	41s6d	GG	AB
94	28	2345/2380	34s5d	GG	AA
95	34	3130	39s3d	GG	BB
96	32	3550	40s2d	GG	AA
97	25	2240	36s5d	GG	BB
98	32	NDP	NDP	AG	BB
99	29	2065	39s2d	GG	AB
100	27	3100	39s4d	AA	AB
101	33	3100	40s	GG	BB
102	25	3145	37s5d	GG	AB
103	19	3415	41s1d	GG	BB
104	35	3735	39s	AG	BB
105	20	3085	41s1d	GG	BB
106	36	3590	37s6d	GG	BB
107	36	2990	38s1d	AA	BB

(Id.Mat.) idade materna; (RN) recém-nascido; (gr) gramas; (I. G.) idade gestacional;
 (NDP) dados não disponíveis nos prontuários médicos; (X) sem resultado do genótipo

Grupo com Pré-Eclâmpsia/Eclâmpsia

Caso	Id. Mat. (anos)	Peso RN (gr)	I. G. (sem. e dias)	Genótipo IGF2	Genótipo H19
108	23	1400	29s6d	GG	AB
109	16	2200	40s4d	AG	AA
110	21	2320	35s2d	AG	AB
111	38	2545	34s4d	AG	AB
112	22	2750	37s2d	AG	AB
113	27	900	29s1d	GG	AA
114	23	3235	39s	GG	BB
115	18	2990	40s	GG	BB
116	30	1520	35s6d	GG	BB
117	26	1200	29s5d	GG	BB
118	24	2395	35s4d	GG	BB
119	28	1995	37s	GG	AB
120	42	815	28s3d	AG	AB
121	35	2660	37s6d	AG	AB
122	40	500	24s2d	GG	BB
123	23	410	24s2d	GG	AB
124	30	2570	40s2d	AG	AA
125	19	3200	39s6d	GG	AB
126	18	2975	37s4d	AG	AB
127	31	3120	37s6d	AG	AA
128	22	2735	37s5d	GG	AB
129	30	2825	39s4d	AA	AB
130	24	3225	37s5d	AG	AB
131	16	2265	37s2d	AG	AA
132	19	2935	39s6d	AG	BB
133	38	1600	33s5d	AG	BB
134	27	2915	37s	GG	AB
135	20	3300	40s5d	AG	AB
136	31	NDP	35s	GG	AB
137	22	685	27s6d	GG	AB
138	17	2420	38s5d	GG	BB
139	25	2725	37s	GG	AB
140	28	3120	38s	GG	BB
141	19	1855	34s	AG	AB
142	31	3145	36s3d	GG	AB
143	30	2540	36s2d	GG	BB
144	39	3415	37s	GG	AB
145	24	845	26s5d	GG	AB
146	15	3005	33s6d	GG	AB
147	16	1975	38s2d	AG	AB
148	22	1035	29s1d	GG	AB
149	32	2705	40s5d	AG	AB

150	32	2145	35s3d	GG	BB
151	38	2850	32s6d	AG	AB
152	31	3715	37s3d	AG	AB
153	20	865	28s4d	GG	BB
154	34	1175	34s	GG	BB
155	21	1010	29s2d	GG	AA
156	23	3600	39s	GG	AB
157	30	1450	32s2d	AG	AB
158	33	4255	41s3d	GG	AB
159	19	4240	41s6d	GG	AB
160	29	2705	39s1d	GG	AA
161	18	1535	31s2d	AG	AB
162	16	1920	32s1d	GG	BB

(Id.Mat.) idade materna; (RN) recém-nascido; (gr) gramas; (I. G.) idade gestacional;
 (NDP) dados não disponíveis nos prontuários médicos

Grupo com Hipertensão Gestacional

Caso	Id. Mat. (anos)	Peso RN (gr)	I. G. (sem. e dias)	Genótipo IGF2	Genótipo H19
163	29	3470	40s6d	AG	AB
164	16	2810	38s4d	GG	AB
165	30	1960	36s3d	GG	AB
166	22	NDP	NDP	GG	AB
167	24	NDP	NDP	GG	BB
168	21	2920	39s	AG	BB
169	36	2140	35s2d	AG	AB
170	21	4650	38s4d	AG	BB
171	17	3505	39s5d	GG	BB
172	19	2635	40s1d	AG	AB
173	18	3605	40s4d	GG	BB
174	33	4500	40s2d	GG	AB
175	41	2295	37s6d	AG	AB
176	28	3695	40s2d	GG	BB
177	19	3330	37s	AG	AB
178	33	3130	38s4d	GG	AB
179	20	3660	39s2d	GG	AB
180	28	3080	39s6d	GG	AB
181	17	2165	37s2d	AG	BB
182	26	2175	36s4d	GG	AA
183	28	3385	39s1d	GG	AB
184	31	3075	40s	AG	AB
185	26	3400	38s1d	GG	BB
186	36	2850	37s2d	GG	AB
187	29	3330	38s6d	GG	BB
188	26	4020	42s1d	GG	AB
189	34	2040	35s6d	GG	AB
190	25	2790	40s3d	AG	AB
191	24	3445	40s	GG	AA
192	21	3240	37s3d	GG	AA
193	36	3200	35s5d	GG	X
194	24	2245	35s	AG	AB
195	40	3550	40s5d	GG	BB
196	29	3805	40s6d	GG	AA
197	36	3060	39s6d	AG	AB
198	30	1980	37s4d	GG	BB
199	32	3690	33s4d	GG	AB
200	22	2610	37s1d	AA	AB
201	27	2785	37s1d	GG	AA
202	36	1400	32s1d	GG	AB

(Id.Mat.) idade materna; (RN) recém-nascido; (gr) gramas; (I. G.) idade gestacional; (NDP) dados não disponíveis nos prontuários médicos; (X) sem resultado do genótipo

Grupo com Hipertensão Arterial Crônica

Caso	Id. Mat. (anos)	Peso RN (gr)	I. G. (sem. e dias)	Genótipo <i>IGF2</i>	Genótipo <i>H19</i>
203	36	1155	31s	GG	BB
204	41	4345	38s4d	GG	AB
205	27	3355	37s5d	GG	BB
206	21	1670	32s4d	GG	BB
207	23	3155	36s4d	AG	AB
208	30	3000	39s	AG	BB
209	33	2740	36s6d	GG	BB
210	36	1405	31s6d	GG	BB
211	18	4175	38s6d	AG	BB
212	26	1595	33s	GG	AB
213	30	3445	38s2d	GG	AB
214	32	4035	37s5d	GG	AA
215	32	4155	38s3d	AA	AB
216	24	3240	39s4d	AG	BB
217	42	3100	38s6d	GG	BB
218	33	Natimorto	Natimorto	GG	BB
219	37	2025	37s2d	GG	AB
220	35	3635	41s	AG	AB
221	40	1875	36s2d	AG	BB
222	34	2505	38s1d	GG	AB
223	35	2945	36s4d	AA	AA
224	22	2870	39s3d	AA	AB
225	30	870	28s5d	GG	BB
226	38	2975	38s5d	AA	AB
227	26	3465	41s4d	AG	AB
228	36	3770	38s6d	GG	AB
229	27	3655	38s2d	AG	AB
230	27	3430	40s1d	AG	BB
231	26	NDP	NDP	GG	AB
232	24	3480	40s	GG	AB
233	23	2280	35s1d	GG	BB
234	33	3070	38s	GG	AB
235	33	3010	41s	AG	AA
236	27	1905	35s22d	AG	BB

(Id.Mat.) idade materna; (RN) recém-nascido; (gr) gramas; (I. G.) idade gestacional;
(NDP) dados não disponíveis nos prontuários médicos.

APÊNDICE D - Heredogramas

