



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO (rs10887800) DO GENE DA RENALASE
(*RNLS*) EM GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPSIA**

SOBRAL

2020

MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO (rs10887800) DO GENE DA RENALASE
(*RNLS*) EM GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPZIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - Campus Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças crônicas e câncer.

Orientador: Prof. Dr. José Juvenal Linhares

SOBRAL

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M888a Moura, Mara Suellem de Freitas.
Avaliação do polimorfismo (rs10887800) do gene da renalase (RNLS) em gestantes com pré-eclâmpsia /
Mara Suellem de Freitas Moura. – 2020.
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2020.
Orientação: Prof. Dr. José Juvenal Linhares.
1. Pré-eclâmpsia. 2. Gene da renalase. 3. Polimorfismo. 4. Pressão sanguínea. I. Título.

CDD 610

MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO (rs10887800) DO GENE DA RENALASE
(*RNLS*) EM GESTANTES COM PRÉ-ECLÂMPZIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - Campus Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de mestra em Ciências da Saúde. Área de concentração: Doenças crônicas e câncer.

Orientador: Prof. Dr. José Juvenal Linhares

Aprovada em: 30/05/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Juvenal Linhares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – Campus Sobral

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará (UFC) – Campus Sobral

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC) – Campus Sobral

A Deus, autor de tudo em minha vida, e a
minha família, base e fortaleza em todos os
percalços.

Obrigada pelo imensurável amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, idealizador e concretizador desse sonho, que com sua misericórdia e infinito amor foi me fazendo enxergar a obra que desejava realizar com esse trabalho, que vai além da cientificidade e alcança vidas evangelizadas e tocadas nesse processo. Obrigada, porque o Senhor me fizeste enxergar luz e ter fé mesmo diante de tantas intempéries! Obrigada, porque a tua mão conduziu tudo isso, me moldando e me fazendo crescer como pessoa! Obrigada, porque hoje os meus pés estão fincados sob o teu altar e o meu coração ancorado no céu já está.

A minha família, por esse amor incondicional e esponsal como o de Maria por Jesus, que a tudo se dispõe e a tudo deseja realizar, e assim vivem os meus sonhos comigo. Às minhas mães, **Francisca Dias de Freitas, Aldenora Dias Freitas, Maria Laís Dias de Freitas e Albina Vieira Sousa (in memorian)** por me ensinarem a ser quem sou e por serem verdadeiros instrumentos de Deus, guiando-me e sendo presença constante na minha vida. Ao meu pai, **Edilberto Leal de Moura**, que com exemplo de garra e determinação me fizeram perseverar. Ao meu primo, **Julimar Calisto de Freitas**, pelo apoio e cuidado de toda uma vida. Ao meu primo, **Pedro Dias de Freitas Júnior**, pelo cuidado de pai e pelos passos de fé que me incentivam a lutar. Ao meu irmão, **Lucas Benjamim de Freitas Moura**, pelo companheirismo diário e por acreditar mais em mim que eu mesma, ele a quem eu daria minha vida mil vezes.

Ao meu namorado, **Antônio de Pádua Rocha Nóbrega Neto**, que é verdadeiro sustento para mim, que anseia pelos planos de Deus ao meu lado e que com paciência me conduziu nesse processo, muitas vezes me guiando pelo braço. Obrigada por aspirar à santidade e desejar o céu comigo.

Aos meus amigos, sempre presentes, aqueles que tantas trocas de plantão fizeram para me ajudar, aqueles que me aguentam diariamente e fazem meus dias terem tanto sentido, aqueles que mesmo distante intercederam por essa conquista, aos meus irmãos da Comunidade Católica Shalom que se fazem uma verdadeira família. E em especial à **Nádia de Sousa Sales e Sávia Rene Cavalcante Batista**, que se fizeram tão cruciais nesse processo, passaram comigo por todas as dores e delícias desse tempo, muitas vezes esquecendo delas mesmas para me ajudarem!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Juvenal Linhares**, pela confiança, pela prontidão em sempre me ajudar, pelo seu entusiasmo com essa pesquisa que sempre renovava o meu desejo de concretizá-la, pela sua paciência, profissionalismo, humildade, simplicidade e calma

que me fizeram acreditar que tudo daria certo. Sua competência profissional e sua grandiosidade como ser humano são dádivas divinas. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos.

Ao **Laboratório de Fisiologia** da Universidade Federal do Ceará e o Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (**LBMD**) do Núcleo de Biologia Experimental (**NUBEX**) da **Universidade de Fortaleza (UNIFOR)**, por terem me recebido e me proporcionando auxílios e pela participação direta ou indireta na realização dessa pesquisa. Em especial, ao **André Antunes**, pela sua disponibilidade e grande contribuição.

Aos Professores da Comissão Examinadora da Qualificação, **Prof^a. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** e **Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva**, pela grandiosa contribuição e sugestões sábias.

Aos profissionais da **Maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (CE)**, que me auxiliaram e contribuíram grandemente para a coleta dos dados.

Ao professor **Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva**, pela paciência e solicitude nos processos estatísticos e por todo conhecimento repassado.

E por fim, ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará**, que me ensinaram numa aquisição grandiosa de conhecimentos e me possibilitaram contribuir com produção científica em busca de melhorias para a sociedade.

“ Percebi que a única coisa necessária era unir-me mais a Jesus e o resto me seria dado de acréscimo. ”

Santa Teresinha do Menino Jesus

RESUMO

Introdução: Apesar dos avanços na medicina obstétrica, a patogênese da pré-eclâmpsia (PE) permanece pouco compreendida, têm-se sugerido que esta resulta de um estado de hiperatividade simpática, estando as catecolaminas circulantes aumentadas nessa condição. Uma nova enzima, denominada renalase, foi identificada recentemente e apresenta ação no metabolismo de catecolaminas e redução da pressão sanguínea quando administrada *in vivo*. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a possível relação do polimorfismo (rs10887800) do gene da renalase (*RNLS*) nos mecanismos que controlam a patogênese da pré-eclâmpsia. **Material e Métodos:** Trata-se de um estudo transversal e quantitativo do tipo caso controle, constituído por 94 mulheres grávidas com pré-eclâmpsia (casos) e 97 mulheres grávidas normotensas (controles). Foi realizada aplicação de um formulário padronizado para coleta de dados demográficos e clínicos e também coleta de raspado bucal, em seguida extração do DNA e posterior realização de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para avaliação do polimorfismo genético (rs10887800) no gene da renalase (*RNLS*). **Resultados:** Houve diferença estatística significativa em termos de idade ($p= 0,034$), idade gestacional ($p= 0,013$) e IMC ($p= 0,010$) quando comparados os grupos PE e controle. Como esperado, as médias da PAS (PE $158,15 \pm 1,85$ vs controle $113,37 \pm 17,42$; $p= 0,013$) e da PAD (PE $102,19 \pm 1,37$ vs controle $74,02 \pm 0,86$; $p < 0,001$) apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos PE e controle. Em relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos, houve diferença significativa para os valores de plaquetas ($p= 0,017$) e ácido úrico ($p= 0,003$), comparando os grupos de PE leve e grave. Em termos de distribuição genotípica e frequência de alelos, não houve associação significativa do polimorfismo rs10887800 do gene RNLS com o desenvolvimento da PE e com a gravidade. No entanto, o genótipo GG associou-se a uma tendência de maior risco da doença (GG vs AG + AA: OR = 2.16; 0.97-4.86; $p = 0.05$). **Conclusão:** O polimorfismo rs10887800 do gene da renalase não pode ser considerado como um fator de predisposição para a suscetibilidade à PE, numa população no Nordeste do Brasil, e nem está associado à sua gravidade. Entretanto, esses achados não podem ser generalizados e recomenda-se a realização de pesquisas futuras em amostras de tamanho maior e mais abrangentes.

PALAVRAS-CHAVE: Pré-eclâmpsia; Gene da renalase; Polimorfismo; Pressão sanguínea.

ABSTRACT

Introduction: Despite advances in obstetric medicine, the pathogenesis of preeclampsia (PE) remains poorly understood, it has been suggested that it results from a state of sympathetic hyperactivity, with circulating catecholamines being increased in this condition. A new enzyme, called renalase, has recently been identified and exhibits action on catecholamine metabolism and blood pressure reduction when administered in vivo. Thus, the objective of this study was to evaluate the possible relation of the polymorphism (rs10887800) of the renalase gene (RNLS) in the mechanisms that control the pathogenesis of preeclampsia.

Material and Methods: This is a cross-sectional, quantitative, case-control study of 94 pregnant women with pre-eclampsia (cases) and 97 normotensive pregnant women (controls). A standardized form was used to collect demographic and clinical data, as well as the collection of oral scrapings, DNA extraction and subsequent real-time polymerase chain reaction (PCR) to evaluate the genetic polymorphism (rs10887800) in the renalase gene (RNLS).

Results: There was a significant statistical difference in terms of age ($p = 0.034$), gestational age ($p = 0.013$) and BMI ($p = 0.010$) when compared to the PE and control groups. As expected, the means of SBP (PE 158.15 ± 1.85 vs control 113.37 ± 17.42 , $p = 0.013$) and DBP (PE 102.19 ± 1.37 vs control $74.02 \pm 0, 86$, $p < 0.001$) presented a statistically significant difference between the PE and control sgroups. Regarding the biochemical and hematological parameters, there was a significant difference for the values of platelets ($p = 0.017$) and uric acid ($p = 0.003$), comparing the groups of mild and severe PE. In terms of genotypic distribution and frequency of alleles, there was no significant association of the rs10887800 polymorphism of the RNLS gene with the development of PE and with the severity. However, the GG genotype was associated with a trend of higher risk of the disease (GG vs AG + AA: OR = 2.16, 0.97-4.86, $p = 0.05$).

Conclusion: The rs10887800 polymorphism of the renalase gene can not be considered as a predisposing factor for susceptibility to PE in a population in northeastern Brazil, nor is it associated with its severity. However, these findings can not be generalized and it is recommended to carry out future research on larger and more extensive samples.

Keywords: Pre-eclampsia; Renalase; Polymorphism; Blood pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação do sFlt-1 interceptando os fatores angiogênicos	27
Figura 2. Aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos do grupo de mulheres gestantes sem pré-eclampsia e com pré-eclampsia 44

Tabela 2. Dados bioquímicos e hematológicos do grupo de mulheres gestantes com pré-eclampsia subdivididas pela gravidade: leve e grave 45

Tabela 3. Distribuição genotípica e frequência alélica do grupo de mulheres gestantes sem pré-eclampsia e mulheres gestantes com pré-eclampsia 46

Tabela 4. Distribuição genotípica e frequência alélica e sua relação com a gravidade da pré-eclampsia 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AT-1AA – Receptor de Angiotensina II do tipo I
- AVC – Acidente Vascular Cerebral
- DAC – Doença Arterial Coronariana
- DFM – Dilatação fluxomediada
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DRT – Doença Renal Terminal
- FAD – Flavina Adenina Dinocleotídeo
- FIK – Receptor tirosina cinase do VEGF
- Flt-1 – Receptor tirosina cinase-1 do VEGF
- HAS – Hipertensão arterial sistêmica
- Hb – Hemoglobina
- HCT – Hematócrito
- HELLP – Hemólise, aumento de enzimas hepáticas e plaquetopenia
- HIG – Hipertensão Induzida pela Gravidez
- HLA – Antígeno leucocitário humano
- HLA-C - Antígeno leucocitário humano C
- HLA-E - Antígeno leucocitário humano E
- HLA-G - Antígeno leucocitário humano G
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-6 – Interleucina-6
- INF-gama – Interferon gama
- ISSHP - Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez
- LDH – Desidrogenase láctica
- NHBPEPWG - National Blood Pressure Education Program Working Group
- NKd – Células Natural Killers decíduais
- PA – Pressão arterial
- PAD – Pressão arterial diastólica
- PAS – Pressão arterial sistólica
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PE – Pré-eclâmpsia
- PIGF - Fator de crescimento plaquetário
- PLT – Contagem de plaquetas

RNLS – gene da renalase
RNS - Espécies reativas de nitrogênio
ROS - Espécies reativas de oxigênio
sEndoglin – Endoglin solúvel
sFlt-1 - Receptor tirosina cinase-1 solúvel em fms
SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único
SRA – Sistema Renina Angiotensina
TEV – Trofoblastos extravilosos
TFG – Taxa de filtração glomerular
TGF- β 1 - Fator de crescimento tumoral- β 1
TGO - Transaminase glutâmico oxalacética
TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica
TNF – Fator de necrose tumoral
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular
WBC – Contagem de glóbulos brancos

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

>- Maior que

\geq - Maior ou igual

μ l- Microlitro

mg – Miligrama

mmHg – Milímetros de mercúrio

°C – Grau Celsius

g – Grama

rpm – Rotações por minuto

ng – Nanograma

β - Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Transtornos hipertensivos associados à gravidez	18
2.2	Pré-eclâmpsia	19
2.3	Manifestações clínicas e laboratoriais	21
2.4	Fisiopatologia da pré-eclâmpsia	23
2.4.1	<i>Adaptação placentária</i>	23
2.4.2	<i>Estresse oxidativo e resposta inflamatória</i>	25
2.4.3	<i>Disfunção endotelial</i>	26
2.4.4	<i>Atuação do Sistema Renina Angiotensina</i>	28
2.5	Polimorfismos genéticos na patogênese da pré-eclâmpsia	30
2.6	Renalase	31
2.6.1	<i>Renalase e Pré-eclâmpsia</i>	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	HIPÓTESE	37
5	OBJETIVOS	38
5.1	Geral	38
5.2	Específicos	38
6	MATERIAL E MÉTODOS	39
6.1	Sujeitos	39
6.2	Coleta dos dados e raspado bucal	40
6.3	Ensaio laboratorial	41
6.3.1	<i>Extração de DNA</i>	41
6.3.2	<i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)</i>	41
6.4	Análise estatística	42
6.5	Aspectos éticos da pesquisa	43
7	RESULTADOS	44
8	DISCUSSÃO	48
9	CONCLUSÃO	54
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
11	APÊNDICE	60

11.1	Apêndice A- Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	60
11.2	Apêndice B – Ficha de coleta de dados das mulheres do estudo	63
12	ANEXO	65
12.1	Anexo A - Parecer Consubstanciado do CEP	65

1 INTRODUÇÃO

A Pré-eclâmpisa (PE) constitui um dos distúrbios mais prevalentes na gravidez e corresponde a uma síndrome multissistêmica específica dessa condição, definida clinicamente por elevação da pressão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) e proteinúria que excede 300 mg/dia, ou presença de sinais de gravidade clínica e laboratorial, mesmo sem proteinúria, após a vigésima semana de gestação e desaparecendo após o puerpério (SHENOY; KANASAKI; KALLURI, 2010; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010). Afeta de 5 a 8% das grávidas, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade materno-fetal (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; SILVA et al., 2017).

Apesar do significado clínico da PE, o tratamento dessa desordem não mudou substancialmente, com o passar do tempo, uma vez que os mecanismos subjacentes à sua etiopatogenia permanecem pouco elucidados. Assim, um desafio na atualidade seria identificar biomarcadores que detectassem essa síndrome, antes mesmo do aparecimento de suas manifestações clínicas, favorecendo alternativas para a prevenção e tratamento desta condição (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019; YILMAZ et al., 2016).

Diversas etiologias têm sido propostas no desenvolvimento da PE, incluindo causas placentárias, imunológicas, genéticas e ambientais (CUNHA et al., 2011; HERTIG; LIERE, 2010; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010). Evidências recentes apontam que ela é resultante de uma hiperatividade simpática, estando os níveis de catecolaminas circulantes, como dopamina, noradrenalina e adrenalina, aumentados nessa condição (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019; YILMAZ et al., 2016).

A degradação de catecolaminas por meio de enzimas intracelulares, tais como catecol – O – metiltransferase, monoamina oxidase – A (MAO-A) e monoamina oxidase B (MAO – B), estão envolvidas na regulação da pressão arterial. Na última década, pesquisadores identificaram uma nova enzima monoamina oxidase, que corresponde a uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) dependente da amino oxidase, solúvel, que foi denominada de renalase (FATIMA et al., 2017; LV et al., 2016; KISELJAKOVIC et al.; 2016).

A renalase é expressa principalmente no rim sendo também encontrada no coração, intestino delgado, cérebro e músculo esquelético, e tem a função de metabolizar as catecolaminas e seus substratos, reduzindo a pressão sanguínea *in vivo*, suprimindo a contratilidade cardíaca e a frequência cardíaca, sem alterações compensatórias no tônus vascular periférico (BOOMSMA; TIPTON, 2007; DESIR et al., 2012; QUELHAS-SANTOS et al., 2014; SHI; WANG, 2015).

O gene que codifica a renalase é chamado de *RNLS* e localiza-se no cromossomo 10q23.33 sendo formado por 10 exons e 309.469 pares de bases (pb). Ela é constituída por 342 aminoácidos de comprimento, sendo formada por um domínio amino oxidase, uma região de ligação à FAD e um peptídeo de sinal (FATIMA et al., 2017; LV et al., 2016; KISELJAKOVIC et al.; 2016).

Estudos recentes têm sugerido que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) do gene da renalase (*RNLS*) podem estar associados a um maior risco de hipertensão arterial (LV et al., 2016; SHI; WANG, 2015; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010;). Especificamente, o polimorfismo rs10887800 do gene da renalase está associado com acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão, diabetes tipo 2, doença renal terminal (DRT), doença coronariana e hipertensão induzida pela gravidez (HIG) (FATIMA et al., 2017; LI et al., 2014; STEC, 2017; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016).

Este polimorfismo (rs10887800) está localizado no intron 6, perto da divisão exon/intron, na região funcional putativa, constituindo uma variante de intron que pode afetar o splicing alternativo do RNAm, agindo como potenciador ou regulador da expressão e sinalização do gene *RNLS* (BURACZYNSKA et al., 2011; FATIMA et al., 2017).

Com o avanço nos estudos nessa área, têm-se sugerido uma possível associação de polimorfismos no gene da renalase com os mecanismos da patogênese da PE, porém ainda há uma escassez de publicações à cerca desse assunto. A identificação de biomarcadores associados à fisiopatologia dessa condição possibilitaria a ampliação de estratégias terapêuticas para melhorar os resultados maternos e fetais. Assim, o objetivo do nosso estudo é avaliar a possível relação do polimorfismo (rs10887800) do gene da renalase (*RNLS*) nos mecanismos que controlam a patogênese da pré-eclâmpsia.

Para uma melhor compreensão da importância deste estudo, segue uma breve revisão de literatura relacionada aos mecanismos etiopatogênicos da PE e evidências de associação de polimorfismos do gene da renalase com diferentes patologias incluindo a PE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transtornos hipertensivos associados à gravidez

A gestação configura um fenômeno fisiológico que envolve alterações dinâmicas, do ponto de vista físico, social e emocional, necessárias para o desenvolvimento adequado da mãe e do feto, devendo então, ser vista como parte de uma experiência de vida saudável. Entretanto, trata-se de uma situação limítrofe, onde a preexistência de qualquer doença ou agravo aumenta a probabilidade de desenvolvimentos desfavoráveis nesse período, acarretando riscos para ambas as partes (BRITO et al., 2015; CARTY; DELLES; DOMINICZAK, 2008; CARTY; DELLES; DOMINICZAK, 2010).

Dentre estes agravos, os transtornos hipertensivos associados à gravidez são os mais frequentes, podendo afetar mais de 10% das gestações no Brasil (GATHIRAM; MOODLEY, 2016). Sua prevalência varia conforme a faixa etária, raça, obesidade e presença de patologias associadas, como diabetes e doença renal (ALVES, 2013; FOO et al., 2015; SOUSA; JÚNIOR, 2014).

Os estados hipertensos da gravidez foram classificados pelo Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas em três categorias principais: (1) hipertensão induzida pela gravidez (pré-eclâmpsia, eclâmpsia, síndrome de HELLP e hipertensão gestacional); (2) hipertensão crônica precedendo a gravidez; e (3) hipertensão crônica com pré-eclâmpsia sobreposta (CHÁVEZ; CAVALLI, 2016; DROST et al., 2010).

A pré-eclâmpsia é definida pela presença de hipertensão (pressão arterial sistólica (PAS) e/ou pressão arterial diastólica (PAD) igual ou superior a 140/90 mmHg) e proteinúria acima de 300 mg/24h, ou presença de sinais de gravidade clínica e laboratorial, mesmo sem proteinúria, após a vigésima semana de gestação e desaparecendo após o puerpério, podendo ser leve ou grave (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019; YILMAZ et al., 2016).

A eclâmpsia compreende a presença de crises tônico-clônicas generalizadas ou coma na mulher com qualquer quadro hipertensivo, não causado por epilepsia ou qualquer outra doença convulsiva, podendo ocorrer durante o parto e perdurar até duas semanas depois. A síndrome de HELLP (do inglês hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets, que significa hemólise, aumento de enzimas hepáticas e plaquetopenia) é caracterizada por um conjunto de sinais e sintomas associados à hemólise microangiopática, trombocitopenia e alterações nos testes de função hepática (BRITO et al., 2015; FERRAZZI et al., 2017; SÁNCHEZ; PONCE; BENÍTEZ, 2016).

A hipertensão gestacional, por sua vez, cursa com elevação pressórica (PAS ≥ 140 mmHg e/ou PAD ≥ 90 mmHg) ocorrendo na segunda metade da gravidez, em mulheres previamente normotensas, sem alterações na proteinúria. Em 20-50% das pacientes com hipertensão gestacional há progressão à pré-eclâmpsia (BRITO et al., 2015; FERRAZZI et al., 2017; SÁNCHEZ; PONCE; BENÍTEZ, 2016).

A hipertensão crônica complica aproximadamente 3% de todas as gestações e é definida como uma pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg que já existe antes da gestação ou surge antes da 20ª semana de gravidez. Há ainda casos de surgimento de pré-eclâmpsia em mulheres com hipertensão crônica, constituindo a forma sobreposta (ALVES, 2013; FERRAZZI et al., 2017; SOUSA; JÚNIOR, 2014).

2.2 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma desordem multissistêmica e de causa pouco compreendida, exclusiva para a gravidez humana. Atinge cerca de 5 a 8% das gestações em todo o mundo. Suas formas clínicas, o início do aparecimento de sintomas ao longo da gestação e a gravidade materno-fetal são variáveis. Conseqüentemente, acredita-se que se trata de um distúrbio de natureza multifatorial que apresenta em comum o surgimento ou agravamento da hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mm Hg) e excreção urinária de proteínas (300 mg por 24 horas), após a 20ª semana gestacional (PACHECO, 2015; TURNER, 2010).

Esse distúrbio pode se apresentar também na ausência de proteinúria, estando a hipertensão associada a alterações laboratoriais hematológicas, na função hepática e renal e manifestações clínicas de edema pulmonar, sintomas neurológicos ou visuais e disfunção uteroplacentária. Essa ampla definição reflete a diversidade na apresentação clínica da pré-eclâmpsia e sugere heterogeneidade na sua patogênese. (CHÁVEZ; CAVALLI, 2016; PACHECO, 2015).

Segundo os critérios estabelecidos pelo National Blood Pressure Education Program Working Group (NHBPEPWG), a pré-eclâmpsia pode ser clinicamente caracterizada nas formas leve e grave. Esta classificação tem sido amplamente utilizada por basear-se em critérios clínicos objetivos, refletindo seu prognóstico e orientando a condução da gestação que se acompanha desta importante causa de morbidade e mortalidade obstétrica (PACHECO, 2015; TURNER, 2010).

A pré-eclâmpsia leve tem sido historicamente caracterizada por hipertensão (PAS/PAD entre 140-160 / 90-110 mmHg) em duas medidas com intervalo de 4 a 6 horas e

proteinúria (≥ 300 mg) na amostra de urina em 24 horas ou com valor igual ou superior a 1+ no teste de fita. A forma grave envolve um ou mais dos seguintes critérios: PAS /PAD $\geq 160 / 110$ mmHg enquanto em repouso no leito; proteinúria (≥ 300 mg) na amostra de urina em 24 horas (podendo atingir a faixa nefrótica ou apresentar subvalores associados a outros sintomas de gravidade); oligúria súbita; distúrbios visuais, dor de cabeça, dor abdominal, níveis elevados de creatinina sérica e transaminases, trombocitopenia e restrição no crescimento fetal (REIS et al., 2010; TURNER, 2010).

A compreensão da pré-eclâmpsia como síndrome e sua diversidade de repercussões na gestante e conceito vêm formando um conceito mais moderno, baseado no momento do surgimento de suas manifestações, configurando-se como um melhor indicador de significância da doença. Este corresponde a uma distinção entre as formas precoce e tardia (REIS et al., 2010).

Há evidências de que a doença mais grave está associada ao início precoce, antes de 34 semanas de gestação, é menos frequente, porém é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade materna e fetal. Caracteriza-se por uma incompleta transformação das artérias espirais, resultando em hipoperfusão da placenta e reduzindo o suprimento de nutrientes ao feto, podendo indicar sinais de restrição de crescimento intrauterino e acarretar um prognóstico mais sombrio para a gestante e o conceito (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; REIS et al., 2010).

A pré-eclâmpsia tardia, com início a partir da 34ª semana gestacional, é a forma mais frequente e geralmente é associada a uma placentação adequada ou levemente comprometida. Caracteriza-se por ausência ou leve resistência ao fluxo nas artérias uterinas, menor comprometimento do crescimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; REIS et al., 2010).

Essa classificação sugere que a etiologia da doença parece variar de acordo com o tempo de apresentação, assim os mecanismos etiopatogênicos se iniciam em momentos diferentes da gestação. Desse modo, alguns marcadores fisiopatológicos são melhores preditores das formas de surgimento precoce, como por exemplo, os fatores antiangiogênicos (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; REIS et al., 2010).

Além disso, Valensise et al. (2008) constataram que a hemodinâmica materna também se distingue nas formas clínicas da PE. Eles avaliaram 1345 pacientes nulíparas identificadas como normotensas antes de 20-22 semanas de gestação. Quando estas foram avaliadas em 24 semanas de gestação, as pacientes diagnosticadas com doença precoce apresentaram maior resistência vascular total e menor débito cardíaco, quando comparadas às

pacientes de início tardio.

Diante disso, percebe-se que as manifestações clínicas e alterações laboratoriais desencadeadas pela PE são variáveis e estão relacionadas à gravidade da doença, sendo melhor explicadas em seguida.

2.3 Manifestações clínicas e laboratoriais

O aumento da pressão sanguínea desencadeado pela pré-eclâmpsia na gestação pode acarretar alterações na função de órgãos alvo e causar efeitos deletérios sobre diversos sistemas, principalmente vascular, hepático, renal e cerebral, suscitando sinais e sintomas maternos e resultados laboratoriais que anunciam o desenvolvimento de complicações relacionadas à alta morbimortalidade materna e perinatal (KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018; TURNER, 2010).

O envolvimento de múltiplos sistemas maternos caracteriza a forma grave da doença e pode provocar os seguintes sintomas: comprometimento da função renal, oligúria, edema pulmonar, convulsões, trombocitopenia, enzimas hepáticas anormais associadas a dor epigástrica ou no quadrante superior direito, ou persistentes sintomas graves do SNC (por exemplo, estado mental alterado, dores de cabeça, visão turva ou cegueira) (BRITO et al., 2015; REIS et al., 2010).

Durante uma gestação normal, o fluxo sanguíneo renal aumenta, levando a um aumento da taxa de filtração glomerular, que resulta em uma redução das concentrações séricas de ureia e creatinina, em média 9,0 e 0,5 mg/dL, respectivamente. Nas gestantes com PE, ao contrário, ocorre uma redução de cerca de 30% na taxa de filtração glomerular, em virtude da glomeruloendoteliase e do vasoespasma, resultando em aumento das concentrações séricas de creatinina, uréia e ácido úrico. Sugere-se ainda que o ácido úrico em concentrações séricas superiores ou iguais a 5,5 mg/dL é um importante marcador para detecção de PE, porém não é um bom preditor de suas complicações (MARTINEZ et al., 2014; PERAÇOLI; PARPINELLI, 2005).

Com relação à função hepática, cerca de 20 a 30% das pacientes com PE apresentam elevação nas concentrações das transaminases hepáticas, aspartato transaminase (AST) também chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (TGO) e alanina transaminase (ALT), também chamada de transaminase glutâmica pirúvica sérica (TGP), enquanto que as concentrações de bilirrubina raramente aumentam. Acredita-se que os níveis elevados das transaminases denotam a ocorrência de um dano hepático que, por sua vez,

promove um aumento nos níveis de desidrogenase láctica (LDH) (KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018; MARTINEZ et al., 2014).

Progressivamente com a evolução natural da doença e intensificação do quadro clínico, um largo espectro de situações podem surgir, mais comumente ocorre o desenvolvimento de formas graves, entre elas, a eclampsia e a síndrome de HELLP, que são responsáveis pelos resultados mais desfavoráveis (KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018; MARTINEZ et al., 2014; PERAÇOLI; PARPINELLI, 2005).

A eclampsia caracteriza-se pela manifestação de crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas e/ou coma, em gestantes com pré-eclâmpsia, na ausência de doenças neurológicas. Pode ocorrer durante a gestação, na evolução do trabalho de parto e no puerpério imediato. É comumente precedida pelos sinais e sintomas de eclâmpsia iminente, isto é, distúrbios do sistema nervoso central (cefaleia frontal/occipital, torpor, obnubilação e alterações do comportamento), visuais (escotomas, fosfenas, visão embaçada e até amaurose) e gástricos (náuseas, vômitos e dor no hipocôndrio direito ou no epigástrico) (BRITO et al., 2015; TURNER, 2010).

A causa exata das convulsões não é elucidada. Pressupõe-se que estejam relacionadas ao vasoespasm cerebral com isquemia local, a encefalopatia hipertensiva com hiperperfusão, o edema vasogênico e a lesão endotelial (KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018; PERAÇOLI; PARPINELLI, 2005).

Uma das formas mais graves de pré-eclâmpsia, agravando o prognóstico materno, é a síndrome de HELLP, um acrônimo utilizado para descrever a condição em que uma paciente com pré-eclâmpsia ou eclâmpsia cursa com hemólise (hemolysis), aumento das enzimas hepáticas (elevated liver enzymes) e plaquetopenia (low platelets) (BRITO et al., 2015; PERAÇOLI; PARPINELLI, 2005; TURNER, 2010).

A anemia hemolítica microangiopática é o marco da síndrome de HELLP. É atribuída à deformidade (esquizócitos) e destruição das hemácias na microcirculação, secundárias ao dano endotelial, com subsequente vasoespasm e deposição de fibrina nas paredes vasculares, que também conduzem à ativação, agregação e ao maior consumo periférico das plaquetas (plaquetopenia). Estas alterações são comuns à fisiopatologia da pré-eclâmpsia (BRITO et al., 2015; KAHHALE; FRANCISCO; ZUGAIB, 2018).

Dessa forma, tendo em vista a diversidade clínica e laboratorial que cursa com a PE, para uma real compreensão dessa condição torna-se necessário aprofundarmo-nos à cerca dos mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia.

2.4 Fisiopatologia da pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia é uma enfermidade específica da espécie humana e da gestação e sua etiologia permanece não elucidada. Apesar dos seus sinais clínicos serem aparentes após a vigésima semana de gestação, atualmente tem sido aceito que a patogênese dessa doença é estabelecida precocemente na fase da placentação, começando no primeiro trimestre da gravidez, sendo difícil identificar biomarcadores precoces, em virtude, principalmente, de razões de natureza ética, uma vez que é complicado realizar estudos na fase precoce da gestação, já que estes podem comprometer tanto a mãe como o feto. Além disso a gênese dessa patologia envolve mecanismos multifatoriais (GARCIA et al., 2010; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

A placenta tem sido identificada como um substrato anatômico etiopatogênico importante para a doença e não há conexão com o ambiente uterino, uma vez que pode se manifestar na ausência de embrião e em casos de gestações ectópicas com evolução além da 20ª semana, mostrando que o útero também não se faz necessário. Assim, o único tratamento efetivo parece consistir na interrupção da gravidez e remoção completa da placenta. Em muitos casos, esta medida precisa ser tomada prematuramente, visando garantir a vida da mãe, do bebê ou de ambos (OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010; PACHECO, 2015).

Nesse sentido, acredita-se que o inadequado desenvolvimento placentário seja a causa raiz dessa patologia, desencadeando revascularização uterina defeituosa, intensa resposta inflamatória e disfunção do endotélio vascular materno, mecanismos fisiopatológicos que serão descritos mais detalhadamente nos tópicos subsequentes (CHÁVEZ; CAVALLI, 2016; GARCIA et al., 2010).

2.4.1 Adaptação placentária

A placenta é formada por uma camada interna composta por células-tronco de citotrofoblasto mononucleares e uma externa que contém sinciciotrofoblastos multinucleados. No momento da placentação os citotrofoblastos formam os trofoblastos extravilosos (TEVs), que invadem a zona decidual e miometrial do útero, atingindo as artérias espiraladas miometriais já em torno de 6 a 8 semanas de gravidez, promovendo, nesse momento, verdadeira obstrução do fluxo sanguíneo que banha os espaços intervilosos. Essa forma de desenvolvimento permite que a gravidez se desenvolva inicialmente em um ambiente

hipóxico, protegendo as células fetais do excessivo aporte de oxigênio (ALPOIM et al., 2013; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

A medida que a gestação progride, os TEVs promovem uma remodelação da camada muscular das artérias espiraladas uterinas e, assumindo um fenótipo de células endoteliais, substituem a camada endotelial desses vasos, transformando um sistema vascular de alta resistência e baixo fluxo em um sistema de maior complacência, capaz de fornecer adequado suprimento sanguíneo útero-placentário ao longo da gravidez (GARCIA et al., 2010; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

No decurso da pré-eclâmpsia, a invasão trofoblástica sofre alterações, de modo que os TEVs não desempenham normalmente suas funções de invasão e remodelamento dos vasos uterinos, dessa forma, estes vasos apresentam menor diâmetro e conservam seu poder de vasoconstrição, desencadeando alterações no fluxo sanguíneo placentário. (GARCIA et al., 2010; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

O mecanismo exato para a invasão trofoblástica defeituosa não é conhecido e isso é dificultado pelo fato de a pré-eclâmpsia não ser diagnosticada senão após esse processo. Mas alguns fatores têm sido sugeridos, tais como: variações genéticas anormais, diferenciação defeituosa dos trofoblastos em conjunto com fatores extrínsecos, como fatores constitucionais maternos e alterações imunológicas, que são determinantes nesse sentido (GARCIA et al., 2010; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

O embrião representa um semienxerto para o organismo materno devido à presença da carga genética paterna, mas é a placenta que entra em contato direto com o sangue materno e deve, assim, ser tolerada por seu sistema imune. Vários fatores contribuem para essa tolerabilidade incluindo o fato das células trofoblásticas apresentarem características especiais quanto à expressão de moléculas do sistema HLA (do inglês Human Leukocitary Antigen, que significa antígeno leucocitário humano) (ALPOIM et al., 2013; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

Diferentemente da maioria das células do organismo, o trofoblasto expressa apenas moléculas HLA-G, HLA-C e HLA-E. Interações entre essas moléculas e populações distintas de leucócitos na interface materno-fetal, em especial com células natural killers deciduais (NKd) e macrófagos, devem ocorrer de forma harmônica para que seja criado um ambiente favorável à tolerância imunológica. Há ainda fenômenos de tolerância periférica, em que atuam células regulatórias que agem modulando a atividade de linfócitos T durante a gravidez (ALPOIM et al., 2013; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

Estima-se que na pré-eclâmpsia ocorre uma quebra de tolerância, na qual a interação do trofoblasto com os leucócitos decíduais gera, entre outras alterações, inadequada produção de citocinas e quimiocinas que tornam a interface materno-fetal imprópria para o desenvolvimento normal da gravidez. Além disso a invasão trofoblástica defeituosa promove placentação deficiente, resposta inflamatória e, conseqüentemente, lesão endotelial (ALPOIM et al., 2013; GARCIA et al., 2010; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

2.4.2 Estresse oxidativo e resposta inflamatória

A invasão trofoblástica deficiente implica mau controle da oxigenação do espaço interviloso na fase inicial da gravidez e na persistência das características primárias das artérias uterinas espiraladas, que mantêm sua elevada resistência, fazendo com que o sangue banhe as vilosidades coriônicas na forma de “jatos intermitentes” e de alta pressão. Dessa forma, a vasodilatação reduzida no final das artérias espiraladas resulta em uma maior velocidade do sangue no espaço interviloso, mas não reduz o volume de sangue (CHÁVEZ; CAVALLI, 2016; PACHECO, 2015).

Admite-se que a placenta não sofre cronicamente de hipóxia na PE, na verdade o suprimento irregular de sangue, com eventos de hipoperfusão e reperfusão, causados pelo fluxo intermitente no espaço interviloso das artérias espirais, constitui o dano placentário de maior importância na gênese dessa síndrome (ALPOIM et al., 2013; GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

Esse tipo de injúria é marcado por produção exagerada de ROS (do inglês reactive oxygen species, que significa espécies reativas de oxigênio) e RNS (do inglês reactive nitrogen species, que significa espécies reativas de nitrogênio) sempre que as moléculas de oxigênio são reintroduzidas no tecido após o momento isquêmico. Tanto ROS quanto RNS constituem moléculas de radicais livres geradas principalmente na mitocôndria celular (ALPOIM et al., 2013; CHÁVEZ; CAVALLI, 2016)

O tecido placentário, principalmente o sinciotrofoblasto, possui pouca capacidade antioxidativa. Diante disso, as alterações na maneira com que o sangue perfunde o espaço interviloso provocam o desenvolvimento do que se caracteriza como estresse oxidativo, induzindo a liberação, na circulação materna, de grande quantidade de material sincicial, fatores angiogênicos e debris. Ocorre, então, a ativação de leucócitos sistêmicos, que geram estímulos para maior adesão plaquetária, vasoconstrição e resposta inflamatória

generalizada, que é mediada principalmente por citocinas pró-inflamatórias como TNF (fator de necrose tumoral), INF-gama (interferon-gama) e IL-6 (interleucina-6) (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010; PACHECO, 2015;).

Assim a PE ocorre em duas fases. A primeira se instala nas primeiras 12 semanas de gestação, quando há diferenciação dos trofoblastos, invasão da decídua e remodelamento das artérias espiraladas de forma defeituosa. Isto resulta na entrada abrupta do sangue materno no espaço interviloso, danificando mecanicamente os sinciotrofoblastos, comprometendo a perfusão dos tecidos fetais (ALPOIM et al., 2013; GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

A segunda fase ocorre no segundo ou terceiro trimestres, como resultado da hipoperfusão e isquemia placentária. A placenta isquêmica libera citocinas e radicais livres do oxigênio que induzem a disfunção endotelial materna sistêmica e a resposta inflamatória excessiva, aflorando a sintomatologia identificada clinicamente (ALPOIM et al., 2013; GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

2.4.3 Disfunção endotelial

As micropartículas sinciciais que atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória da pré-eclâmpsia também são capazes de lesar diretamente o endotélio, sendo observadas características desse processo na fisiopatologia dessa síndrome, como elevada permeabilidade vascular, presença sérica de fatores relacionados à injúria endotelial como fibronectina, fator VIII e trombosmodulina, além de elevada reatividade vascular (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011; GATHIRAM; MOODLEY, 2016).

O endotélio vascular é uma enorme estrutura parácrina responsável por grande parte do controle do tônus vascular na árvore arterial do organismo humano. Nas gestantes, uma série coordenada de adaptações fisiológicas, implementadas ao longo das primeiras vinte semanas de gestação, promove o relaxamento vascular, sendo seu organismo programado para ser vasodilatado e hiperperfundido. Um processo bem regulado de perda celular e degradação da matriz extracelular é necessário para que se atinja o delicado equilíbrio entre a vasodilatação ideal e a manutenção da integridade vascular (BRANDÃO et al., 2012; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

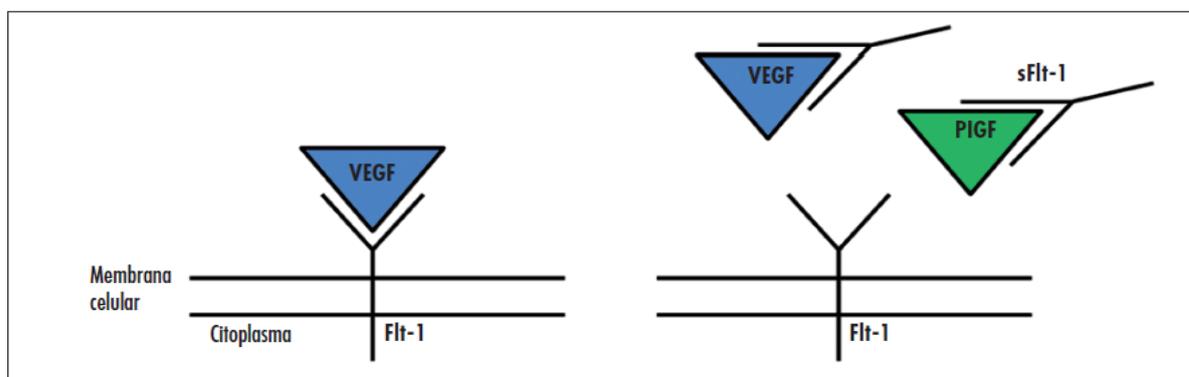
Em pacientes normotensas que não desenvolvem PE, o citotrofoblasto invade as artérias espiraladas, assumindo características de células endoteliais e diminuindo a

resistência vascular placentária. Caso esse processo seja deficiente, uma hipóxia tecidual gera um aumento na produção de substâncias antiangiogênicas. O desequilíbrio entre as substâncias angiogênicas e antiangiogênicas é um fator crucial para a propagação da lesão endotelial (CHÁVEZ; CAVALLI, 2016; PACHECO, 2015).

Os principais fatores angiogênicos que desempenham papéis fundamentais na manutenção da homeostase endotelial são VEGF (do inglês vasculo-endothelial growth, que significa fator de crescimento endotelial vascular), PlGF (do inglês placental growth factor, que significa fator de crescimento plaquetário) e TGF- β 1 (do inglês tissue growth factor, que significa fator de crescimento tumoral- β 1). O VEGF participa da manutenção endotelial de órgãos como rim, fígado e cérebro, sinalizando por meio de dois receptores, Flk-1 e Flt-1. Este último também tem como ligante o PlGF. O receptor para TGF- β 1 é constituído por um complexo formado por Alk5-T β RII-Endoglin (BRANDÃO; CABRAL; CABRAL, 2011; CHÁVEZ; CAVALLI, 2016).

O estresse oxidativo leva à produção placentária de grande quantidade de fatores antiangiogênicos como o sFlt-1 (do inglês soluble fms-like tyrosin) e a sEndoglin (do inglês soluble endoglin). O sFlt-1 é um receptor solúvel que se forma por splicing alternativo, levando à perda da porção transmembrana do Flt-1. Dessa forma, o sFlt-1 se liga às moléculas de VEGF e PlGF circulantes e impede que esses fatores angiogênicos se liguem aos seus receptores comuns na membrana celular (Figura 1) (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

Figura 1 – Ação do sFlt-1 interceptando os fatores angiogênicos. No primeiro desenho observa-se a ligação normal entre o VEGF e seu receptor na membrana celular. Em seguida, observa-se a interceptação dos fatores angiogênicos pelo sFlt-1, impedindo sua ação celular. VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; PlGF: fator de crescimento plaquetário; sFlt-1: soluble fms-like tyrosin.



Fonte: Oliveira, Karumanchi e Sass (2010).

Assim, a dosagem e a relação entre os fatores antiangiogênicos (sFlt-1 e sENG) associada à dosagem dos fatores pró-angiogênicos (VEGF e PlGF), seriam um promissor método de predição da PE, corroborando a ideia de que a injúria endotelial constitui o alvo central da patogênese dessa doença (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010). Porém, Porto et al. (2013) ao comparar o processo de placentação e a função endotelial de 74 gestantes de alto risco, por meio de dilatação fluxomediada (DFM) da artéria braquial e dopplerfluxometria de artérias uterinas, entre 16 e 20 semanas de gestação, constatou que a disfunção endotelial não precede cronologicamente as manifestações clínicas de PE.

2.4.4 Atuação do sistema renina angiotensina

Verdonk et al. (2014) realizaram uma revisão sobre o envolvimento do sistema renina angiotensina (SRA) na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Afirmaram que em gravidezes normais, particularmente nos estágios iniciais da gestação, há um aumento no fluxo sanguíneo materno e uma diminuição na resistência vascular periférica e para compensar a diminuição na pressão sanguínea, o SRA é ativado. Em contraste, na PE o fluxo sanguíneo intravascular e o débito cardíaco são reduzidos, enquanto a resistência vascular periférica é aumentada, assim a maioria dos componentes do SRA são regulados para baixo.

Acredita-se que a supressão da maioria dos componentes do SRA poderia levar a uma resposta aumentada dos receptores de angiotensina II do tipo I (AT-1AA) que ativariam a angiotensina II, podendo desempenhar um papel nos TEVs e na invasão das artérias espirais na gênese da PE (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; OLIVEIRA; KARUMANCHI; SASS, 2010).

Entretanto, a evidência do papel exato do SRA na PE é falha, uma vez que a maioria dos estudos foram realizados em animais e não foram detectados dados conclusivos que os níveis de AT-1AA estão realmente aumentados em humanos com PE (GATHIRAM; MOODLEY, 2016; VERDONK et al., 2014).

Assim, constata-se que a fisiopatologia da PE ainda não está bem elucidada, mas os mecanismos supracitados são alvos constantes de estudos, explicando a origem de algumas manifestações clínicas, como a HAS (hipertensão arterial sistêmica) e a proteinúria e estão resumidos na figura 2.

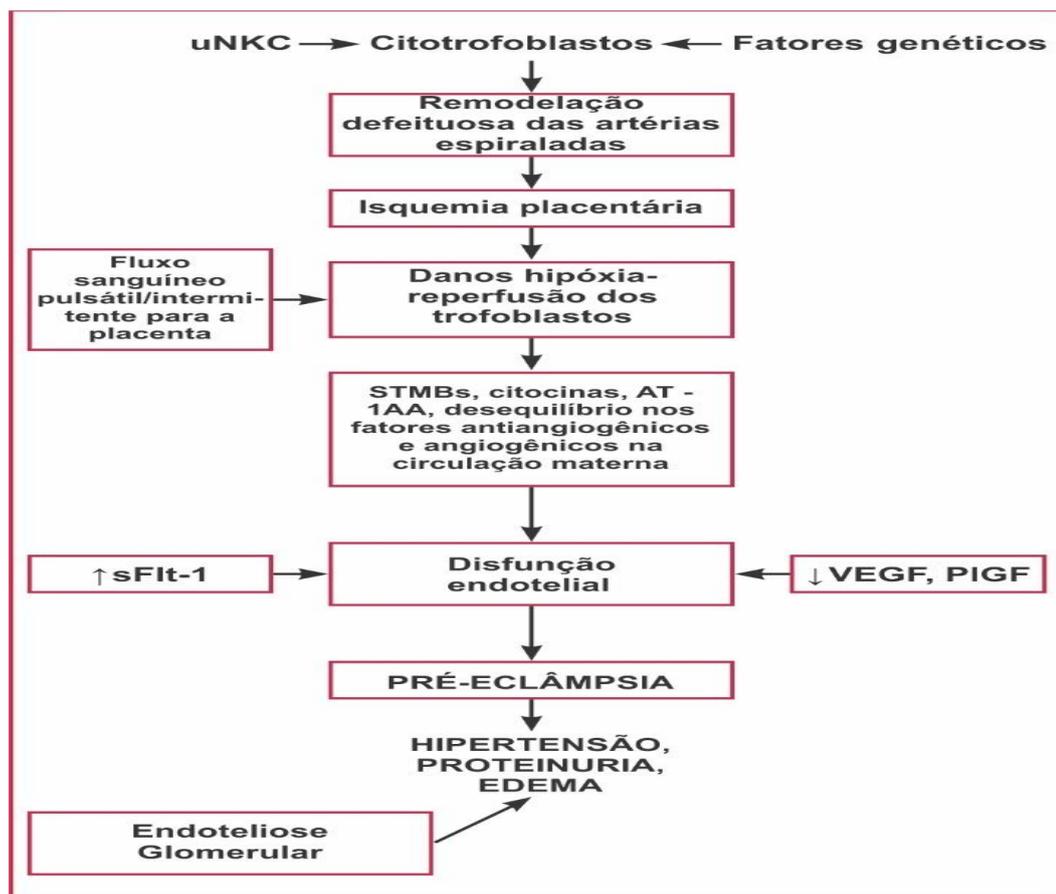
Na busca de identificar a real causa da PE, possíveis etiologias têm sido propostas, incluindo causas placentárias, imunológicas, genéticas e ambientais (CUNHA et al., 2011;

HERTIG; LIERE, 2010; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010). Do ponto de vista epidemiológico, muitos estudos têm indicado que a PE é uma doença associada a forte predisposição familiar, e que varia também de acordo com características geográficas, socioeconômicas e raciais da amostra analisada (CUNHA et al., 2011; PISSETI et al., 2014).

Para a maioria da população, parece representar uma desordem genética complexa e ocorre como resultado de numerosas variantes comuns em diferentes *loci* que, individualmente, têm pequeno efeito, mas coletivamente contribuem para a suscetibilidade à doença (HERTIG; LIERE, 2010; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

Dessa forma, o progresso na prevenção e no tratamento desta condição requer avanços na compreensão da fisiopatologia da doença em nível molecular. A descoberta de novos biomarcadores para detectar essa síndrome, antes das manifestações clínicas é uma proposta promissora, sendo que a genética pode contribuir com essas novas opções (HERTIG; LIERE, 2010; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

Figura 2. Aspectos da fisiopatologia da pré-eclâmpsia. VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; PlGF: Fator de crescimento plaquetário; sFlt-1: Receptor solúvel de tirosina cinase.



Fonte: Gathiram e Moodley (2016, com adaptações)

2.5 Polimorfismos genéticos na patogênese da pré-eclâmpsia

Em uma espécie, os cromossomos homólogos são bastantes similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (loci) pode haver variações na sequência do DNA, que podem ter frequência superior a 1% da população, caracterizando o que se denomina polimorfismo. Assim, os polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles, podendo influenciar diretamente sobre fatores de risco associados a doenças comuns (ROCHA et al., 2007; ROMERO et al., 2014)

Atualmente os genes mais pesquisados, para a PE, são aqueles que codificam fatores de coagulação, estresse oxidativo e substâncias vasoativas, bem como os envolvidos na função placentária e citocinas inflamatórias (ROMERO et al., 2014; KESHAVARZI et al., 2018).

Pissetti et al. (2014) ao tentar identificar a frequência do polimorfismo, rs1800896 (-1082 A/G), no gene IL-10, que codifica a interleucina 10 (que apresenta níveis séricos mais baixos em mulheres com PE), em 54 mulheres com PE e 172 gestantes saudáveis sugeriu a associação entre a presença do alelo G desse polimorfismo e a proteção contra o desenvolvimento da PE. Entretanto, mais estudos sobre a contribuição dessas variações e os mecanismos pelos quais afetam o risco de desenvolver PE ainda necessitam ser realizados.

Partindo do pressuposto que a PE está relacionada ao desequilíbrio de fatores angiogênicos circulantes, resultando em disfunção endotelial, alguns autores, por sua vez, têm se destinado a pesquisar polimorfismos em genes que codificam o VEGF, que tem grande importância nessa hipótese explicativa dessa patologia (CUNHA et al., 2011; ROMERO et al., 2014).

Nesse sentido, Romero et al. (2014) estudaram o polimorfismo +936 C/T no gene VEGF em 45 gestantes com PE e 49 controles saudáveis, e preliminarmente não encontraram associação entre os genótipos e os alelos do VEGF com pré-eclâmpsia. Em consonância, Cunha et al. (2011) não encontrou associação significativa do polimorfismo VEGF +936C/T com a PE, porém observou diferenças significativas para o polimorfismo VEGF -2578C/A entre os grupos, formados por 52 mulheres com PE e 28 saudáveis, sendo o alelo A mais frequente no controle, sugerindo a possibilidade da portadora do alelo A apresentar menor suscetibilidade para o desenvolvimento dessa síndrome.

Entretanto, a maioria desses estudos envolve amostras pequenas e pouco

representativas para avaliações significativas de polimorfismos genéticos, e os resultados têm-se demonstrado inconclusivos. Diante disso, estão sendo realizadas pesquisas buscando novos biomarcadores moleculares possivelmente envolvidos na gênese da PE (BAGCI et al. 2016; FATIMA et al., 2017; YILMAZ et al., 2016).

Recentemente, foi identificada uma nova flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) contendo hormônio, denominada renalase, que apresenta impacto na saúde cardiovascular e desponta como um novo alvo terapêutico para pacientes com hipertensão essencial (DESIR, 2009; FEDCHENKO et al., 2013; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016).

2.6 Renalase

A renalase é secretada no sangue pelos rins, embora também expressa no coração, músculo esquelético, cérebro e intestino delgado. Essa enzima, em condições basais, mostra-se inativa no plasma, sendo ativada por um aumento modesto na pressão arterial sanguínea (PAS) ou por excessos de catecolaminas (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019; YILMAZ et al., 2016).

Corresponde a uma monoamina oxidase solúvel com atividade significativa em relação às catecolaminas noradrenalina, adrenalina e dopamina, mas com pouca ou nenhuma atividade em relação a outras aminas, como serotonina, tiramina, benzilamina, metilamina e espermidina (BOOMSMA; TIPTON, 2007; DESIR et al., 2012; SHI; WANG, 2015).

Os mecanismos moleculares que medeiam a ativação da renalase *in vivo* ainda não são conhecidos. A possibilidade é que o aumento das catecolaminas possa causar alteração na sua conformação, com a dissociação subsequente de um inibidor ou ligação de um ativador circulante. É provável que ela não só degrade catecolaminas, mas também metabolize substratos adicionais, que podem ser relevantes para sua função cardioprotetora (ABDALLAH; SABRY, 2013; BURACZYNSKA et al., 2011; DESIR, 2011).

O gene que codifica essa enzima é chamado de *RNLS* e localiza-se no cromossomo 10q23.33 sendo formado por 10 exons e 309.469 pares de bases (pb). É constituída por 342 aminoácidos de comprimento, sendo formada por um domínio amino oxidase, uma região de ligação à flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um peptídeo de sinal (FATIMA et al., 2017; LV et al., 2016; KISELJAKOVIC et al.; 2016).

Estudos recentes têm demonstrado a associação de polimorfismos no gene dessa flavoproteína com diferentes doenças relacionadas à disfunção da renalase e, portanto, a distúrbios no metabolismo de catecolaminas, como a hipertensão (LV et al., 2016;

KISELJAKOVIC et al.; 2016; SHI; WANG, 2015; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016). Zhao et al. (2007) detectaram a associação de dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (rs2576178 GG e rs2296545 CC) do gene da renalase com hipertensão essencial a partir da análise de 2586 indivíduos chineses (1317 casos hipertensos e 1269 controles normotensos). Por sua vez, Shi e Wang (2015), a partir de uma metanálise, não encontraram associação do polimorfismo (rs2296545) do gene da renalase com o risco de hipertensão arterial.

Buraczynska et al. (2011) ao investigar o envolvimento de três polimorfismos do gene da renalase na hipertensão em 892 pacientes com diabetes tipo 2, averiguaram que o alelo C do polimorfismo (rs2296545) está associado à hipertensão nos pacientes com essa disfunção metabólica. Constataram ainda uma forte associação do polimorfismo (rs10887800) com acidente vascular cerebral em pacientes com e sem diabetes. O alelo G deste polimorfismo pode ser útil na identificação de diabetes em pacientes com risco aumentado de acidente vascular cerebral.

Li et al. (2014), por sua vez, constataram que o polimorfismo rs10887800 no gene *RNLS* está intimamente associado com aterosclerose cerebral intracraniana grave e estenose vascular em pacientes chineses com AVC isquêmico, denotando uma predição de severidade da doença.

Estima-se que anormalidades na via da renalase contribuem também para o aumento de riscos cardiovasculares em pacientes com doença renal crônica, uma vez que seus níveis estão marcadamente reduzidos nessa condição clínica (DESIR, 2009; DESIR; PEIXOTO, 2013; KISELJAKOVIC et al.; 2016). Stec et al. (2012) identificaram uma significativa diferença na frequência dos alelos G dos polimorfismos rs2576178 e rs10887800 do gene *RNLS*, em pacientes poloneses com doença renal terminal, fazendo terapia de substituição renal, com e sem hipertensão arterial. Stec (2017) detectou que a variante polimórfica rs10887800 do gene *RNLS* influencia o nível de renalase circulante em pacientes submetidos a hemodiálise e, portanto, elucidada a relevância potencialmente funcional deste polimorfismo nessa população.

Stec, Ksiazek e Buraczynska (2016) averiguaram a associação de dois SNPs no gene da renalase (rs10887800 e rs2576178) e o risco de doença arterial coronariana (DAC) em 309 pacientes com insuficiência renal crônica submetidos a hemodiálise, constatando correlação positiva apenas com o polimorfismo rs10887800, além disso os pacientes com genótipo GG e alelo G apresentaram maior suscetibilidade à DAC. Em consonância, Kiseljakovic et al. (2016) não encontraram associação do polimorfismo rs2576178 com hipertensão arterial em

pacientes em hemodiálise na população da Bósnia e Herzegovina.

Desir et al. (2007) constataram ainda uma redução do dano miocárdico durante a isquemia aguda em modelos de corações de ratos, com injúria renal, perfundidos com renalase. Corroborando ao pressuposto da função cardioprotetora dessa amino oxidase. Li et al. (2014) detectaram que o alelo A do polimorfismo rs2576178 do gene RNLS pode ser um fator predisponente da doença arterial coronariana em pacientes hipertensos. E Baranowska et al. (2017) atestaram uma associação significativa da variante Glu37Asp do polimorfismo funcional rs2296545 do gene da renalase e a hipertrofia ventricular esquerda em uma grande coorte de pacientes do sexo feminino com estenose aórtica, sugerindo que a renalase desempenha um papel na resposta hipertrófica à sobrecarga de pressão.

Ao investigar a possibilidade de influência da renalase na etiologia da hipertensão induzida pela gravidez (HIG), Elsetohy et al. (2014) avaliaram 52 mulheres egípcias com HIG e 50 controles normotensas e obtiveram diferenças significativas na distribuição dos genótipos de rs2576178 e rs10887800 entre os grupos, constatando que esses polimorfismos de *RNLS* supracitados não apenas estão associados à etiologia da HIG, mas também podem ser avaliados como preditores dessa patologia.

2.6.1 Renalase e pré-eclâmpsia

Há evidências crescentes de que as funções da renalase podem ser relevantes para a patogênese de doenças humanas comuns, como: hipertensão, acidente vascular cerebral, diabetes, doença renal terminal, doença coronariana e hipertensão induzida pela gravidez (FATIMA et al., 2017; LI et al., 2014; STEC, 2017; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016). A descoberta dessa nova flavoproteína que regula a pressão arterial e a função cardiovascular, por meio da modulação de catecolaminas, tem sugerido uma nova alternativa de explicação da gênese da pré-eclâmpsia (DESIR, 2009; QUELHAS-SANTOS et al., 2014).

Diante dos resultados encontrados com os estudos experimentais mais recentes pressupõe-se que eclâmpsia e PE são estados de hiperatividade simpática. Dessa forma, tanto as atividades simpáticas das suprarrenais como as do sistema nervoso simpático estão aumentadas em doentes com PE, assim como também há um aumento na concentração de catecolaminas nessas enfermidades, incluindo a epinefrina. Correlacionando-se, assim, o provável aumento do nível de epinefrina no plasma com o aumento da pressão arterial (PA) no desenvolvimento dessa patologia (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019; YILMAZ

et al., 2016).

Dessa forma, o metabolismo das catecolaminas e seus substratos, mediado pela nova flavina adenina dinucleotídeo dependente de amino-oxidase, a renalase, parece estar fortemente associada à regulação da pressão arterial nas gestantes acometidas por essa síndrome (BAGCI et al., 2016; DESIR et al., 2012; QUELHAS-SANTOS et al., 2014).

Yilmaz et al. (2016) avaliaram as concentrações plasmáticas de renalase num total de 120 mulheres (40 mulheres com pré-eclâmpsia, 40 grávidas normotensas e 40 mulheres não grávidas saudáveis) e sua associação com os níveis pressóricos e taxa de filtração glomerular (TFG). Demonstraram que os níveis de renalase são elevados em mulheres grávidas em comparação com indivíduos normais. Além disso, constataram baixos níveis dessa enzima em gestantes com PE e foram correlacionados inversamente com os níveis pressóricos e positivamente com a taxa de filtração glomerular, resultando em proteinúria.

Em consonância, Bagci et al. (2016) investigaram dois polimorfismos do gene *RNLS* (rs2576178 e rs10887800), localizados nas regiões funcionais putativas, em um grupo de 110 mulheres com PE e 102 controles grávidas normotensas na Turquia. Apenas o polimorfismo rs10881800 revelou diferenças estatisticamente significativas em termos de distribuição genotípica e frequências alélicas entre pacientes pré-eclâmpticos e controles, estando os genótipos GG e alelo G associados a um impacto aditivo na pressão sanguínea nessa condição, podendo contribuir para o desenvolvimento e manutenção da PE.

Teimoori et al. (2019), por sua vez, ao avaliar a relação destes mesmos polimorfismos do gene da renalase com a PE, em um grupo de mulheres no sudeste do Irã, constataram associação somente do polimorfismo rs10887800 e apenas com a forma grave da PE. O efeito da combinação destes polimorfismos (rs2576178 e rs10887800) denotaram ainda uma associação do genótipo GG e alelo G com um maior risco de PE.

3 JUSTIFICATIVA

Diante da necessidade da compreensão da fisiopatologia da PE para um diagnóstico mais precoce e intervenção adequada, alguns estudiosos, ao investigarem mecanismos etiopatogênicos subjacentes à sua gênese, tem indicado que essa condição apresenta forte predisposição familiar e que varia também com características geográficas, socioeconômicas e raciais da amostra analisada, sugerindo que o componente genético pode contribuir para a suscetibilidade à doença (CUNHA et al., 2011; PISSETI et al., 2014)

Dessa forma, avanços na compreensão da fisiopatologia da doença em nível molecular, a partir da descoberta de novos biomarcadores para detectar essa síndrome, antes das manifestações clínicas, tem sido uma proposta promissora, de modo que a genética pode contribuir com essas novas opções, uma vez que, vários estudos têm procurado uma possível associação de polimorfismos de genes com a etiopatogenia da PE (HERTIG; LIERE, 2010; YOUNG; LEVINE; KARUMANCHI, 2010).

As pesquisas mais recentes têm apontado que a PE está relacionada a um estado de hiperatividade simpática, e que a degradação de catecolaminas por meio da renalase, uma nova amino oxidase recém descoberta, estaria relacionada ao mecanismo de controle da PA nessa condição. Há evidências crescentes que polimorfismos genéticos no gene *RNLS*, que codifica essa enzima, estão associados a patogênese de várias doenças, tais como: hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, diabetes, doença renal terminal, doença coronariana e hipertensão induzida pela gravidez (FATIMA et al., 2017; LI et al., 2014; STEC, 2017; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016).

O polimorfismo (rs10887800) do gene *RNLS* está localizado no intron 6, perto da divisão exon/intron, na região funcional putativa, constituindo uma variante de intron que pode afetar o splicing alternativo do RNAm, agindo como potenciador ou regulador da expressão e sinalização desse gene, sendo um dos mais promissores e, portanto, o alvo do nosso estudo. (BURACZYNSKA et al., 2011; FATIMA et al., 2017). Além disso, já foi encontrada previamente associação desse polimorfismo com a PE em gestantes da Turquia e do Irã. (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019).

Entretanto, ainda há uma escassez de publicações investigando a associação de polimorfismos do gene *RNLS* com os mecanismos da patogênese da PE e uma ausência de trabalhos relevantes em populações da América do Sul sobre o tema, isso constitui o incentivo à realização dessa pesquisa em mulheres brasileiras (BAGCI et al., 2016; TEIMOORI et al., 2019).

Caso identifique-se uma associação significativa de algum genótipo específico deste polimorfismo em mulheres com PE, este poderia ser considerado um novo biomarcador genético que traria melhores esclarecimentos frente às condutas com mulheres gestantes, possibilitando modificar a evolução da doença e melhorar o prognóstico materno e perinatal, reduzindo as altas taxas de mortalidade nessa população, o que traria impacto na situação socioeconômica do Brasil.

4 HIPÓTESE

A ocorrência de uma associação significativa de algum genótipo específico do polimorfismo do gene da renalase (*RNLS*) em mulheres com pré-eclâmpsia pode ser considerado como um biomarcador genético na patogênese dessa condição, possibilitando a identificação da suscetibilidade à doença e uma detecção mais precoce, antes mesmo das manifestações clínicas.

Dado o papel cardioprotetor da renalase em condições associadas ao aumento do tônus simpático, atuando na regulação da PA por meio da degradação de catecolaminas, sugere-se uma relevância fisiopatológica dessa enzima no desenvolvimento da PE, podendo ser considerada uma substância com potencial utilidade diagnóstica e terapêutica.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

- Avaliar a possível relação do polimorfismo (rs10887800) do gene da renalase (*RNLS*) nos mecanismos que controlam a patogênese da pré-eclâmpsia.

5.2 Específicos

- Relacionar os parâmetros demográficos das pacientes com pré-eclâmpsia e controles saudáveis, incluindo a pressão arterial;
- Comparar os dados bioquímicos e hematológicos nas pacientes com pré-eclâmpsia leve e grave;
- Identificar a relação entre o polimorfismo (rs10887800) do gene da renalase (*RNLS*) com a gravidade da pré-eclâmpsia.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Sujeitos

Este estudo transversal e quantitativo do tipo caso controle foi constituído por 94 mulheres grávidas com pré-eclâmpsia (casos) e 97 mulheres grávidas normotensas (controles). Todas as pacientes foram admitidas na Maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Sobral. O diagnóstico de pré-eclâmpsia foi determinado de acordo com a Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez (ISSHP) (BROWN et al., 2001).

Os seguintes critérios foram utilizados para o diagnóstico de PE: pressão arterial sistólica (PAS) e pressão sanguínea diastólica (PAD) igual ou superior a 140/90 mmHg, pelo menos, em duas medições, no mínimo com 4 horas de intervalo, e a proteinúria acima de 300 mg por 24 horas. O grupo controle foi recrutado a partir do mesmo centro sendo constituído por mulheres grávidas voluntárias normotensas.

Os critérios de inclusão das gestantes com PE (casos) foram: idade da paciente ≥ 18 anos; idade gestacional igual ou superior a 20 semanas; pressão arterial sistólica (PAS) e pressão sanguínea diastólica (PAD) igual ou superior a 140/90 mmHg, pelo menos, em duas medições, no mínimo com 4 horas de intervalo; proteinúria acima de 300 mg por 24 horas, em amostras isoladas, ou com valor igual ou superior a 1+ pelo método semi-quantitativo de fita, conforme o protocolo clínico adotado na maternidade. Foram incluídas ainda as formas graves de PE, mesmo na ausência de proteinúria.

Para o grupo das gestantes normotensas (controles) os critérios de inclusão foram: idade da paciente ≥ 18 anos; estar no terceiro trimestre de gestação; não apresentar história de hipertensão ou PE; pressão sistólica/diastólica $\leq 120/80$ mmHg.

Os critérios de exclusão, comuns aos dois grupos foram: gestação múltipla; presença de doenças intercorrentes como distúrbios de coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas e câncer; hipertensão crônica e gestacional; diabetes mellitus pregressa e gestacional; proteinúria isolada; trombocitopenia; níveis elevados de transaminases sem hipertensão; doenças crônicas e inflamatórias maternas; colestase intrahepática da gravidez, hepatite e natimorto. Somente no grupo controle foram também excluídas pacientes com história pregressa de pré-eclâmpsia.

O tamanho da amostra foi definido com base em resultados preexistentes que encontraram associação significativa de polimorfismos específicos do gene RNLS com

diversas patologias, inclusive a PE (BAGCI et al., 2016; FATIMA et al., 2017; KISELJAKOVIC et al., 2016; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016).

As pacientes com PE incluídas na pesquisa foram categorizadas em dois grupos com base na gravidade da doença, ou seja, PE grave, definida quando apresentar um ou mais dos seguintes critérios: PAS /PAD: 160 / 110 mmHg medida em duas ocasiões com um intervalo de pelo menos quatro horas, e ter proteinúria (≥ 300 mg) na amostra de urina em 24 horas (podendo atingir a faixa nefrótica ou apresentar subvalores associados a outros sintomas de gravidade), distúrbios visuais, dor de cabeça, dor abdominal, níveis elevados de creatinina sérica e transaminases, trombocitopenia, restrição crescimento fetal (REIS et al., 2010; TURNER, 2010).

Foi considerada como PE leve quando PAS / PAD estivesse entre 140-160 / 90-110 mmHg e com proteinúria (≥ 3 g) na amostra de urina em 24 horas ou com valor igual ou superior a 1+ no teste de fita (REIS et al., 2010; TURNER, 2010).

6.2 Coleta dos dados e raspado bucal

A abordagem das pacientes foi realizada na enfermaria de alto risco da Maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (CE), na beira do leito, mediante esclarecimentos sobre o conteúdo e objetivo da pesquisa e sem prejuízos à assistência, no período de Junho/2018 a Fevereiro de 2019, mediante assinatura de termo de consentimento (**apêndice A**) pelas pacientes envolvidas no estudo, conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, com o número de CAAE: 86263417.2.0000.5054, conforme as normas estabelecidas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (**anexo A**).

Para a coleta dos dados demográficos e clínicos foi utilizado um formulário padronizado (**apêndice B**), permitindo identificar parâmetros como: idade materna, idade gestacional, PAS e PAD, índice de massa corporal (IMC), história anterior de PE e história familiar de PE em ambos os grupos. Os dados de hematócrito (HCT), hemoglobina (Hb), creatinina, uréia, ácido úrico, contagem de glóbulos brancos (WBC), contagem de plaquetas (PLT), TGO, TGP, desidrogenase lática (LDH) e teste da fita urinária foram obtidos pelos resultados dos testes laboratoriais de rotina que constavam nos prontuários e usados para avaliar a gravidade da doença no grupo das pacientes que apresentavam PE.

Para obtenção do DNA genômico e avaliação do polimorfismo rs10887800 do gene *RNLS* da renalase foram colhidas amostras de raspado bucal, que foram armazenadas a –

80°C, até posterior avaliação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

6.3 Ensaio laboratorial

O ensaio laboratorial do estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) do Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR).

6.3.1 Extração de DNA

As amostras dos raspados bucais obtidas foram armazenadas a -80°C até posterior extração de DNA genômico. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit DNA Extract All Reagents (Applied Biosciences), segundo protocolo do fabricante. Em um tubo de 1,5 ml misturou-se 50 μL de saliva com 50 μL de tampão de lise. As amostras foram aquecidas a 95°C por 3 minutos e em um bloco pré-aquecido. Em seguida as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 1 minuto e adicionou-se 50 μL de solução tampão estabilizante. O material foi centrifugado por 1 minuto a 10.000 g a temperatura ambiente e em seguida a concentração de DNA em cada amostra foi quantificada utilizando-se o kit Qubit dsDNA Assays Broad Range (Promega). O DNA assim obtido e quantificado foi genotipado utilizando a técnica de PCR em tempo real.

6.3.2 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O método de qPCR foi usado para a determinação do polimorfismo (rs10887800) do gene da renalase (*RNLS*), por meio de um equipamento que associa um termociclador a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utilizou fluoróforos do tipo *TaqMan*[®], que correspondem a sondas de hibridização utilizadas para detectar sequências específicas no DNA amplificado na PCR.

Para as PCR de genotipagem utilizou-se placas de 96 poços em um volume total de 10 μL /poço. Cada reação foi preparada contendo 5 μl TaqMan GTXpress Mix (2x) (Thermo Fisher), 0,25 μl TaqMan SNP Genotyping Assay (40x) (Thermo Scientific), 2 μl DNA genômico a 1,5 ng/ μl , e 2,75 μl H₂O ultra pura. Os ciclos térmicos foram de 95°C por 20

segundos para ativação da polimerase e 40 ciclos de: desnaturação a 95°C por 3 segundos e anelamento/ extensão a 60°C por 90 segundos. O reagente TaqMan GTXpress Mix é composto por AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, UP, dNTPs, Tracking Dye e ROX™ dye. O reagente TaqMan SNP Genotyping Assay (rs10887800) é composto por um par de iniciadores (primers) não marcados (concentração final de reação 900 nM) e as sondas fluorescentes: Applied Biosystems™ VIC™ dye – MGB para o alelo A e Applied Biosystems™ FAM™ dye – MGB para o alelo G (concentração final de reação 200 nM). As sequências de primers utilizados para amplificar os fragmentos de DNA foram publicados por Bagci et al. (2016): 5'-CAGGAAAGAAAGAGTTGACAT -3' (Sense) e 5'- AAGTTGTTCCAGCTACTGT -3' (Antisense). O número genbank do gene da renalase é Gene ID:55328.

Após o preparo do *mix* de reação e da placa com as amostras específicas, estas foram pré-lidas em um instrumento de PCR em Tempo Real StepOnePlus (Applied Biosystems). Após a pré-leitura, foram realizados os ciclos termais para amplificação das amostras de DNA para a genotipagem das pacientes. Ao final foi realizada uma pós-leitura (da qual foram descontados os valores iniciais de fluorescência em cada amostra), que foi analisada através do StepOne™ Software v. 2.3 para a discriminação alélica.

A distribuição genotípica envolveu 03 formas de variantes: homozigoto (AA), heterozigoto (AG) e homozigoto (GG). Cada genótipo foi avaliado sob modelos de hereditariedade genética (dominantes, recessivos e codominantes).

6.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SigmaPlot® versão 11.0 (SYSTAT. Software Inc.). Foi realizado teste de Shapiro-Wilk para analisar distribuição normal dos dados. Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M) ou mediana com auxílio do Teste t (paramétricos) ou Mann-Whitney (não paramétricos), ambos de amostras independentes, para comparar os valores de parâmetros demográficos entre os grupos pré-eclâmptico e controle, e parâmetros bioquímicos e hematológicos de mulheres com PE leve e grave.

O Teste X^2 de Pearson ou Teste exato de Fisher foi realizado para comparar a distribuição de genótipos e frequência de alelos em todos os grupos. Modelos de regressão logística foram utilizados para avaliar a associação entre os genótipos e a PE.

A abordagem do risco relativo foi feita pela avaliação do “*odds ratio*” (OR) por regressão logística contemplando um intervalo de confiança (IC) de 95% de certeza. Um valor

de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significante.

6.5 Aspectos éticos da pesquisa

O cuidado ético fundamental do estudo consistiu em manter em sigilo o nome das mulheres envolvidas na pesquisa. Para tanto, cada caso foi identificado no instrumento de coleta de dados, apenas pelo número do prontuário, iniciais do nome e número do caso da pesquisa. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará, com o número de CAAE: 86263417.2.0000.5054, conforme as normas estabelecidas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (**anexo A**).

Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, sendo informados dos riscos e benefícios do estudo. O manejo do material biológico foi assistido pela resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011 e foi estritamente utilizado apenas para avaliação genômica que concerne o objetivo deste estudo.

7 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo um total de 191 mulheres, sendo 94 gestantes com pré-eclâmpsia e 97 gestantes saudáveis, que foram genotipadas para o polimorfismo rs10887800 do gene *RNLS* da renalase. Os parâmetros demográficos e clínicos dos sujeitos do estudo estão resumidos na tabela 1. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre pacientes com PE e controle em termos de idade materna, idade gestacional e índice de massa corporal. Como esperado, as médias da pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente mais elevadas em mulheres com PE quando comparadas ao grupo controle ($p=0,013$ e $p=0,001$, respectivamente). O mesmo não ocorreu com as demais variáveis analisadas.

Tabela 1: Dados demográficos do grupo de mulheres gestantes sem pré-eclâmpsia e com pré-eclâmpsia.

VARIÁVEIS	Controle (n =97)	Caso PE (n =94)	p valor
Idade materna	25.38 ± 0.65	27.31 ± 0.63	0.034*
Idade gestacional	34.76 ± 0.37	33.45 ± 0.36	0.013*
Índice de massa corporal	28.61 ± 0.55	30.81 ± 0.64	0.010*
Pressão arterial sistólica	113.37 ± 17.42	158.15 ± 1.85	0.013*
Pressão arterial diastólica	74.02 ± 0.86	102.19 ± 1.37	0.001*
Gestações (Nº)	02	02	0.861
Paridades (Nº)	01	01	0.920
História familiar de PE S/N	13.04%/ 86.96%	34.83%/ 65.17%	-
História pregressa de PE S/N	0 % / 100 %	22.47 % / 77.53%	-

Fonte: elaborada pelo autor.

Os valores são dados como média ± erro padrão da média para idade materna, idade gestacional, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica e diastólica. E mediana para número de gestações e paridades. * ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste *t* student / Mann-Whitney).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos do grupo de pacientes com PE foram apresentados na tabela 2 e discriminados conforme a gravidade da doença. Houve diferença

estatisticamente significativa nos valores de plaquetas e na quantificação de ácido úrico entre o grupo de gestantes com pré-eclampsia grave quando comparados com o grupo de gestantes com pré-eclampsia leve ($p = 0,017$; $p = 0,003$, respectivamente). Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os demais parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados.

Tabela 2: Dados bioquímicos e hematológicos do grupo de mulheres gestantes com pré-eclampsia subdivididas pela gravidade: leve e grave.

VARIÁVEIS	Pré-eclampsia leve (n =14)	Pré-eclampsia grave (n =80)	p valor
Glóbulos brancos	11133,57 ± 909,26	11126,85 ± 346,49	0.994
Plaquetas	386642,86 ± 158642,68	217758,67 ± 7686,10	0.017*
HM	4,20 ± 0,29	4,19 ± 0,06	0.950
HB	12,51 ± 0,56	11,98 ± 0,23	0.354
HT	35,27 ± 0,82	35,53 ± 0,62	0.861
Creatinina	0.72 ± 0.03	0,80 ± 0,03	0.213
Ureia	18.29 ± 1.50	23,97± 1,20	0.050
Ácido Úrico	3.99 ± 0.30	5,32 ± 0,18	0.003*
HDL	486.86 ± 36.81	644,76 ± 55,31	0.218
TGO	23.71 ± 1.78	41,50 ± 6,18	0.220
TGP	14.43 ± 1.09	30,31 ± 4,41	0.126

Fonte: elaborada pelo autor.

Os valores são dados como média ± erro padrão da média. * ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo pré-eclampsia leve. (Teste *t* student). HM: Hemácias; HB: Hemoglobina; HT: Hematócrito; HDL: Desidrogenase láctica; TGO: Transaminase glutâmica oxalacética sérica; TGP: Transaminase glutâmica pirúvica sérica.

A distribuição genotípica e frequência alélica do polimorfismo rs10887800 em gestantes com PE e controles foram demonstradas na tabela 3. A distribuição de genótipos de rs10887800 foi encontrada como 28 (28,9%), 44 (45,4%) e 25 (27,7%) para AA, AG e GG, respectivamente no grupo controle e 27 (28,7%), 54 (57,4%) e 13 (13,9%) para AA, AG e GG,

respectivamente no grupo de mulheres com PE. Não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de distribuição de genótipos do polimorfismo rs10887800 entre mulheres do grupo controle e grupo pré-eclâmptico. No entanto, o genótipo GG do polimorfismo rs10887800 foi associado a uma tendência de maior risco de PE quando comparado com os controles (GG vs AG + AA: OR = 2.16; 0.97-4.86; p = 0.05).

As frequências dos alelos A e G do polimorfismo em estudo para o grupo controle foram 72 (51,1%) e 69 (48,9%), respectivamente, e para as pacientes com PE foram 81 (54,7%) e 67 (45,3%), respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de frequências alélicas entre mulheres do grupo controle e grupo pré-eclâmptico (G vs A: OR = 1.16; 0.71-1.89; p = 0.61).

Tabela 3: Distribuição genotípica e frequência alélica do grupo de mulheres gestantes sem pré-eclampsia e mulheres gestantes com pré-eclampsia.

Polimorfismo	Controle (n =97)	Caso PE (n =94)	OR (IC 95%)/ p valor
<i>Genótipos (rs10887800)</i>			
AA	28 (28.9)	27 (28.7)	(AA vs AG + GG: OR = 1.01; 0.51-1.98; p = 0.89)
AG	44 (45.4)	54 (57.4)	(AG vs AA + GG: OR = 0.61; 0.33-1.13; p = 0.12)
GG	25 (27.7)	13 (13.9)	(GG vs AG + AA: OR = 2.16; 0.97-4.86; p = 0.05)
<i>Alelos (rs10887800)</i>			
A	72 (51,1%)	81 (54,7%)	(G vs A: OR = 1.16; 0.71-1.89; p = 0.61)
G	69 (48,9%)	67 (45,3%)	

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem, conforme apropriado.

OR = odds ratio; vs: versus.

O odds ratio (OR) foi dado com intervalo de confiança de 95% (ICs).

As gestantes com PE foram subdivididas conforme a gravidade da doença, sendo 80 pacientes com PE grave e 14 com PE leve, estas foram avaliadas quanto a distribuição genotípica e frequência alélica para investigar associação do polimorfismo em análise com a gravidade de PE. Na tabela 4 foram descritas a distribuição de genótipos e frequência de alelos nos grupos de PE grave e leve.

No grupo leve, a distribuição de genótipos de rs10887800 foi de 4 (28,6%), 8

(57,1%) e 2 (14,3%) para AA, AG e GG, respectivamente. Por sua vez, no grupo grave a distribuição genotípica foi encontrada como 23 (28,7%), 46 (57,5%) e 11 (13,7%) para AA, AG e GG, respectivamente. Em termos de gravidade da doença não houve diferenças estatisticamente significativas quanto à distribuição de genótipos nos grupos de PE leve e grave.

As frequências dos alelos A e G de rs10887800 para as pacientes com PE leve foram 12 (54,5%) e 10 (45,5%), respectivamente, e para as pacientes com PE grave foram 69 (54,8%) e 57 (45,2%), respectivamente. Não houve diferenças estatisticamente significativas em termos de frequências alélicas quanto a gravidade da doença (G vs A: OR =0.99; 0.37-2.70; p = 0.83).

Tabela 4: Distribuição genotípica e frequência alélica e sua relação com a gravidade da pré-eclâmpsia.

Polimorfismo	PE grave (n =80)	PE leve (n =14)	OR (IC 95%)/ p valor
<i>Genótipos (rs10887800)</i>			
AA	23 (28.7)	04 (28.6)	(AA vs AG + GG: OR = 1.01; 0.25-4.29; p = 0.75)
AG	46 (57.5)	08 (57.1)	(AG vs AA + GG: OR = 1.01; 0.28-3.63; p = 0.78)
GG	11 (13.7)	02 (14.3)	(GG vs AG + AA: OR = 0.96; 0.16-7.13; p = 0.71)
<i>Alelos (rs10887800)</i>			
A	69 (54,8%)	12 (54,5%)	(G vs A: OR =0.99; 0.37-2.70; p = 0.83)
G	57 (45,2%)	10 (45,5%)	

Fonte: elaborada pelo autor.

Os dados foram apresentados como número de sujeitos e porcentagem, conforme apropriado.

OR = odds ratio; vs: versus.

O odds ratio (OR) foi dado com intervalo de confiança de 95% (CLs).

8 DISCUSSÃO

O presente estudo enfoca a relevância da função cardioprotetora da renalase e explora, pela primeira vez, a possível associação de seu polimorfismo gênico com os mecanismos que medeiam a patogênese da pré-eclâmpsia, em uma população brasileira. Foram estudadas 191 mulheres, sendo 94 gestantes com PE e 97 gestantes normotensas, que foram genotipadas para o polimorfismo rs10887800 do gene *RNLS* da renalase.

Na caracterização demográfica dessas pacientes, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos caso (gestantes com PE) e controle (gestantes normotensas), em termos de idade materna, idade gestacional e IMC. Nesses casos, as evidências apontam como justificativa a contribuição da epigenética nesse cenário. Assim, Burton et al. (2019), através de uma revisão da literatura, constataram que esses mesmos fatores podem ser considerados preditores da PE, sendo o $IMC > 30$, idade materna > 40 anos e os menores valores de IG indicativos de maior propensão à PE. Em consonância, Belay e Wudad (2019) identificaram também que gestantes com idade menor que 24 anos eram menos propensas a ocorrência da doença do que aquelas com idade maior que 35 anos, corroborando assim com os resultados do estudo em questão.

Conforme previsto, nossos resultados denotaram que as médias da pressão arterial sistólica e diastólica foram significativamente mais elevadas em mulheres com PE quando comparadas ao grupo controle ($p=0,013$ e $p=0,001$, respectivamente), similarmente aos achados de Bagci et al. (2016) e Teimoori et al. (2019), estudos recentes que também compararam os valores de PA em grávidas com PE e controles normotensas. Isso porque as alterações na pressão arterial sistêmica demonstram ser inerentes aos mecanismos etiopatogênicos da doença.

A PE gera complicações maternas que podem aumentar o risco de uma doença cardiovascular posteriormente e promover danos fatais, incluindo aborto, baixo peso ao nascer do concepto, restrição de crescimento intrauterino e nascimento prematuro. Além de favorecer uma variedade de problemas, tais como complicações hematológicas, comprometimento da função renal e hepática, sintomas neurológicos, doenças metabólicas, nutricionais e endócrinas (BRITO et al., 2015; FERRAZZI et al., 2017).

Dessa forma, com base nos critérios clínicos supracitados, pode-se distinguir duas formas da doença, a leve e a grave. Em nossos estudos, analisamos os achados laboratoriais das pacientes com PE e os relacionamos com a gravidade da doença. Os valores de plaquetas e a quantificação de ácido úrico demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre

os grupos de gestantes com PE grave e leve, estando os primeiros em menor número e esses últimos mais elevados nas pacientes com PE grave, respectivamente ($p = 0,017$; $p = 0,003$, respectivamente).

Os índices aumentados de ácido úrico nas gestantes com PE possivelmente estão relacionados à redução na taxa de filtração glomerular que promove uma depuração renal prejudicada, sendo este considerado um importante marcador do diagnóstico precoce de PE e também da sua gravidade, podendo se correlacionar aos desfechos maternos e perinatais. Assim, Le et al. (2109), a partir de um estudo de coorte envolvendo 205 mulheres no Vietnã com PE e categorizadas em dois grupos em termos de gravidade (leve e grave), constataram que o ácido úrico, além de importante marcador de início e gravidade da doença, comportou-se como bom preditor de complicações neonatais, resultando em aumento do risco de parto prematuro, baixo índice de Apgar, restrição de crescimento intrauterino e morte neonatal.

A plaquetopenia, por sua vez, resulta do dano endotelial próprio da doença, que acarreta maior consumo desses componentes sanguíneos, podendo associar-se à sua gravidade. Assim, Rebahi et al. (2018), em uma pesquisa numa Unidade de Terapia Intensiva Obstétrica no Marrocos, com pacientes portadoras de PE, revelaram a relação de alguns fatores de risco que favorecem a progressão da gravidade da doença, dentre eles a trombocitopenia.

Dessa forma, dada a diversidade clínica dessa patologia sugere-se uma heterogeneidade na sua patogênese. A descoberta recente de uma nova monoamino oxidase solúvel, chamada de renalase, que apresenta papel importante na degradação de catecolaminas na circulação e, subsequentemente, uma diminuição da pressão arterial, tem sugerido uma nova alternativa de explicação da gênese da PE (STEC, 2017; STEC; KSIAZEK; BURACZYNSKA, 2016).

Evidências atuais demonstraram que há um aumento na concentração de catecolaminas nesse distúrbio, principalmente a adrenalina, estando, dessa forma, as atividades simpáticas aumentadas e sugerindo que isso explicaria o aumento da PA nessa enfermidade (BAGCI et al., 2016; YILMAZ et al., 2016)

Assim, a renalase pode estar relacionada ao controle da PA nas gestantes acometidas por essa síndrome, através do metabolismo das catecolaminas e seus substratos, ressaltando o seu relevante papel na regulação da função cardiovascular. A associação dessa enzima com hipertensão, isquemia do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, lesão renal aguda, disfunção cardíaca e diabetes tem sido reportada largamente, mas ainda há escassez de estudos que a correlacionem com a PE (FAVA et al., 2012; LV et al., 2016; REZK et al.,

2014).

Desir et al. (2012), em um estudo realizado com ratos sujeitos a nefrectomia subtotal (5/6 Nx) e que desenvolvem hipertensão arterial e doença renal terminal, constataram que uma única dose de renalase recombinante (1,3mg/Kg), administrada por via subcutânea, diminuiu a PAS e PAD, promovendo efeitos equivalentes a 5mg/Kg de enalapril.

Ao avaliar o efeito a longo prazo da renalase recombinante, Baraka e El Ghotny (2012) mostraram que os ratos que a receberam diariamente durante 04 semanas tiveram redução significativa na noradrenalina no plasma, pressão arterial média, hipertrofia do ventrículo esquerdo e fibrose cardíaca.

Estima-se que a renalase tem um potente efeito hipotensor e que esse seja mediado pela sua capacidade de metabolizar catecolaminas na circulação, principalmente a adrenalina, seu principal substrato fisiológico. Sugerindo que em condições que cursam com hipertensão arterial seus níveis estejam marcadamente diminuídos (DESIR, 2009; FAVA et al., 2012).

Nesse sentido, Yilmaz et al. (2016), constataram baixos níveis de renalase em gestantes com PE e os correlacionou com elevação da PA e lesão renal, apresentados por proteinúria e baixos níveis de taxa de filtração glomerular. Em conformidade, Rezk et al. (2014) encontraram níveis mais elevados de adrenalina em pacientes egípcios com doença renal crônica e hipertensão, por provável diminuição dos níveis de renalase nessas condições clínicas.

Os estudos mais recentes têm se concentrando em investigar o papel de polimorfismos do gene da renalase, que podem alterar seu mecanismo de ativação e assim sua função cardioprotetora e sua associação com doenças que cursam com alterações no metabolismo de catecolaminas, dentre eles os mais comumente estudados são: rs10887800, rs2576178 e rs2296545.

Zhang et al. (2015) realizaram um sequenciamento de alta produtividade para identificar genes específicos e polimorfismos relacionados que mostraram tendência à predisposição ao AVC isquêmico em 743 pacientes com a doença, na China. Encontraram uma alta relação comparativa da renalase com AVC isquêmico, através dos polimorfismos rs10887800, rs2576178 e rs2296545, proporcionando uma evidência de que essa enzima é um ponto chave na fisiologia vascular cerebral.

Em concordância, Zhao et al. (2007) identificaram a associação das variantes genéticas do gene da renalase rs2576178 e rs2296545 com a susceptibilidade à hipertensão essencial, em um total de 2586 sujeitos no norte da China.

O polimorfismo rs10887800 do gene *RNLS* é o alvo do presente estudo e já foi

reportada sua associação com diversas patologias como AVC, hipertensão arterial e induzida pela gravidez, diabetes tipo 2 e gestacional, doença renal crônica e doenças cardíacas. Esse polimorfismo está localizado perto da fronteira exon/íntron numa região funcional putativa que pode afetar o splicing alternativo do RNA mensageiro e atuar como um potenciador ou regulador da expressão e sinalização gênica. Ele também pode ter papel potencial no gatilho de várias doenças e parece ser um passo adiante em fatores de sondagem que podem interagir entre doenças poligênicas multifatoriais (AKBARI et al., 2018; FÁTIMA et al., 2017; STEC, 2017).

Li et al. (2014) investigaram as correlações entre os polimorfismos do gene da renalase (rs10887800, rs2576178 e rs2296545) e gravidade da estenose aterosclerótica cerebral vascular intracraniana, em 212 pacientes com AVC isquêmico comparados com 244 controles saudáveis, numa população do norte da China e encontraram associação do genótipo GG e alelo G apenas do polimorfismo rs10887800 com a severidade da doença. Stec et al. (2012), analisaram a potencial associação dos polimorfismos rs10887800 e rs2576178 com HAS, em pacientes caucasianos de origem polaca com doença renal terminal e identificaram associação do alelo G de ambos os polimorfismos com risco aumentado de HAS.

O presente estudo não identificou diferenças estatisticamente significativas em termos de distribuição de genótipos e frequências alélicas do polimorfismo rs10887800 entre mulheres do grupo controle e grupo pré-eclâmptico. No entanto, o genótipo GG foi associado a uma tendência de maior risco de PE quando comparado com os controles (GG vs AG + AA: OR = 2.16; 0.97-4.86; p = 0.05).

Por sua vez, Bagci et al. (2016) constataram associação significativa do genótipo GG e alelo G do polimorfismo rs10887800 com a PE e com a gravidade da doença, em um estudo composto por 110 gestantes com PE e 102 controles saudáveis, numa população na Turquia. O alelo G aumentou o risco da doença em 1,66 vezes e revelou um impacto aditivo na pressão sanguínea nas pacientes com PE. Elsetohy et al. (2014) encontraram associação do genótipo AG do polimorfismo rs10887800 e do genótipo GG do polimorfismo rs2576178 com a hipertensão induzida pela gravidez, em um grupo de pacientes egípcias, constatando que esses polimorfismos além de serem associados à etiologia da HIG poderiam também ser avaliados como preditores.

O estudo mais recentemente publicado que avalia a relação entre os polimorfismos rs2576178 e rs10881800 e a suscetibilidade à PE, em grávidas na região sudeste do Irã, foi idealizado por Teimoori et al. (2019). Isoladamente, esses polimorfismos não foram associados à PE, apenas o efeito da combinação deles denotou associação do genótipo GG e

alelo G com maior risco de PE.

Stec, Ksiazek e Buraczynska (2016) avaliaram 309 pacientes hemodialisados (107 com DAC e 202 sem DAC) na Polônia e verificaram que apenas após ajustes estatísticos o genótipo GG do polimorfismo rs10887800 associou-se a um maior risco de DAC, sob os modelos genéticos dominantes e recessivos.

Em contrapartida, Akbari et al. (2018) não encontraram diferenças significativas no risco ou efeito protetor do polimorfismo rs10887800 com a HAS e/ou DAC, afastando a hipótese de que este polimorfismo poderia representar um fator de predisposição para essas patologias em uma população no sudeste do Irã.

Fatima et al. (2017) encontraram uma modesta associação do polimorfismo rs10887800 com a diabetes gestacional, em um estudo realizado no Paquistão, com uma amostra de 198 pacientes, sendo 99 com a doença e 99 controles saudáveis e todos eram normotensos. No entanto, após ajustes estatísticos para idade, IMC e porcentagem de gordura corporal, o efeito do polimorfismo supracitado tornou-se protetor, sugerindo que essa variante genética produz seu efeito uma vez que os fatores ambientais levam a um ambiente fisiopatológico favorável a diabetes gestacional. Dessa forma, constataram que o alelo G estaria ligado apenas à predisposição ao desenvolvimento de fenótipos de síndrome metabólica em um futuro próximo.

Alguns estudos envolvendo esse e outros polimorfismos do gene *RNLS* da renalase não identificaram associação do alelo G e genótipo GG com o risco de doença em uma variedade de condições clínicas. Stec (2017), por exemplo, observaram uma associação do polimorfismo rs10887800 com os níveis de renalase, em pacientes hemodialisados, encontrando um menor nível dessa amino oxidase nos pacientes com genótipo AA em comparação com os portadores de AG e GG.

Li et al. (2015), verificaram que o alelo A do polimorfismo rs2576178 pode ser um fator de suscetibilidade de doença coronariana em pacientes hipertensos, enquanto, o alelo G esteve associado a um fator de proteção. Perceberam ainda, que o alelo C do polimorfismo rs2296545 foi associado a predisposição à HAS. Corroborando esses achados, Lv et al. (2016), por meio de uma meta-análise, constataram uma associação significativa do alelo C do polimorfismo rs2296545 com o risco de HAS, em todos os modelos genéticos, de modo que esse alelo conferiu um risco maior de HAS em relação ao alelo G, assim como também o genótipo CC esteve associado a um maior risco de HAS quando comparado ao genótipo GG.

Em uma coorte prospectiva, Farzaneh-Far et al. (2010) verificaram ainda, uma associação do genótipo CC e alelo C da variante Glu37Asp do polimorfismo rs2296545 com

aumento nas probabilidades de hipertrofia cardíaca, disfunção e isquemia e capacidade pobre de exercício, em indivíduos com DAC e função renal normal.

Diante dos resultados controversos reportados por esses achados de associação do polimorfismo gênico da renalase com várias patologias, nossos resultados não identificaram associação significativa da variante genética rs10887800 com o desenvolvimento de PE, apesar de uma tendência ao aumento do risco da doença, e também não constataram associação com a gravidade da doença, não identificando diferenças estatisticamente significativas quanto à distribuição de genótipos e frequências alélicas nos grupos de PE leve e grave. Isso contrasta com os resultados de Bagci et al. (2016) e Teimoori et al. (2019), que encontraram associação do genótipo GG desse polimorfismo com maior risco de PE grave.

A discrepância entre nossos achados e outros estudos pode estar relacionada a heterogeneidade genética das populações, podendo o efeito do polimorfismo ser diferente nas várias populações estudadas e ser afetado pelas variações geográficas e fatores epigenéticos. Além disso, esse é o primeiro estudo realizado no Brasil com intuito de investigar a associação de variantes gênicas dessa enzima na patogênese da PE, dificultando a comparação dos nossos resultados com dados preexistentes. Sem contar, que nosso país apresenta uma população bastante miscigenada, o que pode requerer estudos com amostra populacional que contemple as várias raças existentes aqui e nos concentramos apenas na população do Nordeste.

Uma variedade de evidências reportaram a associação de polimorfismos do gene *RNLS* com diversas condições clínicas, entretanto, o mecanismo subjacente pelo qual eles afetam a hipertensão e, subsequentemente, o desenvolvimento de PE não é claro. No entanto, sugere-se que eles poderiam atuar por alteração do nível de expressão ou atividade da enzima renalase. Assim, a avaliação da atividade e dos níveis de renalase e catecolaminas no plasma, principalmente adrenalina, e a possível associação destes com os polimorfismos do gene que codifica essa enzima, permitiriam a identificação de resultados mais valiosos.

Apesar dos resultados conflitantes, nosso estudo desponta como uma promissora alternativa para identificação de marcadores genéticos nos mecanismos que medeiam a patogênese da PE e que ainda são tão incertos, estimulando a realização de pesquisas futuras com amostras maiores e mais abrangentes à cerca da contribuição da renalase nesse processo.

9 CONCLUSÃO

Em conclusão, esse estudo realizado com o intuito de averiguar a associação do polimorfismo rs10887800 do gene da renalase em gestantes com PE, sugeriu pela primeira vez que esse polimorfismo supracitado não pode ser considerado como um fator de predisposição para a suscetibilidade à PE, numa população no Nordeste do Brasil, e nem está associado à sua gravidade. Entretanto, nossos resultados não podem ser generalizados, uma vez que houve uma tendência ao aumento de risco para a doença nas gestantes que apresentaram genótipo GG.

Sendo assim, nossos dados podem abrir portas para novas discussões a respeito desse cenário e a realização de pesquisas futuras com amostras de tamanho maior poderiam revelar um efeito mais conciso dos polimorfismos da renalase na gênese da PE.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, E.; SABRY, D. Renalase gene polymorphisms in end-stage renal disease patients: An Egyptian study. **J Am Sci**, v. 9, n. 1, p. 346-9, 2013.

AKBARI, H. et al. Atorvastatin and losartan may upregulate renalase activity in hypertension but not coronary artery diseases: The role of gene polymorphism. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 6, p. 9159-9171, 2019.

ALPOIM, P. N. et al. Pré-eclâmpsia: o que há de anômalo na placentação? **Femina**, v. 41, n. 2, 2013.

ALVES, E. A. Emergências Hipertensivas na Gravidez. **Rev Bras Hipertens**, v. 20, n. 4, p. 173-179, 2013.

BAGCI, B. et al. Renalase gene polymorphism is associated with increased blood pressure in preeclampsia. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, v. 6, n. 2, p. 115-120, 2016.

BARAKA, A.; EL GHOTNY, S. Cardioprotective effect of renalase in 5/6 nephrectomized rats. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 17, n. 4, p. 412-416, 2012.

BARANOWSKA, E. O. et al. Functional polymorphism of the renalase gene is associated with cardiac hypertrophy in female patients with aortic stenosis. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. 1-14, 2017.

BELAY, A. S.; WUDAD, T. Prevalence and associated factors of pre-eclampsia among pregnant women attending anti-natal care at Mettu Karl referral hospital, Ethiopia: cross-sectional study. **Clinical hypertension**, v. 25, n. 1, p. 14, 2019.

BOOMSMA, F.; TIPTON, K. F. Renalase, a catecholamine-metabolising enzyme? **Journal of neural transmission**, v. 114, n. 6, p. 775, 2007.

BRANDÃO, A. H. F.; CABRAL, M. A.; CABRAL, A. C. V. O endotélio vascular e seu papel-chave na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. **Femina**, v. 39, n. 4, p. 217-221, 2011.

BRANDÃO, A. H. F. et al. Função endotelial, perfusão uterina e fluxo central em gestações complicadas por Pré-Eclâmpsia. **Arq Bras Cardiol**, v. 99, n. 4, p. 931-935, 2012.

BRITO, K. K. G. et al. The prevalence of hypertensive syndromes particular of pregnancy (GHS). **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v. 7, n. 3, p. 2717-2725, 2015.

BROWN, M. A. et al. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). **Hypertens Pregnancy**, v. 20, n. 1, p. 9-14, 2001.

BURACZYNSKA, M. et al. Renalase gene polymorphisms in patients with type 2 diabetes, hypertension and stroke. **Neuromolecular medicine**, v. 13, n. 4, p. 321-327, 2011.

BURTON, G. J. et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **Bmj**, v. 366, p. l2381, 2019.

CARTY, D. M.; DELLES, C.; DOMINICZAK, A. F. Novel biomarkers for predicting preeclampsia. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 18, n. 5, p. 186-194, 2008.

CARTY, D. M.; DELLES, C.; DOMINICZAK, A. F. Preeclampsia and future maternal health. **Journal of hypertension**, v. 28, n. 7, p. 1349-1355, 2010.

CHÁVEZ, J. A. D.; CAVALLI, R. C. Preeclampsia: vascular pathophysiological mechanism and the basis for early diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 38, n. 8, p. 369-372, 2016.

CUNHA, V. M. P. et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in pre-eclampsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 33, n. 7, p. 158-163, 2011.

DESIR, G. V. Regulation of blood pressure and cardiovascular function by renalase. **Kidney international**, v. 76, n. 4, p. 366-370, 2009.

DESIR, G. V. Role of renalase in the regulation of blood pressure and the renal dopamine system. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 20, n. 1, p. 31-36, 2011.

DESIR, G. V. et al. Downregulation of cardiac renalase expression in CKD, and protective effect of renalase in acute coronary syndrome. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 149A, 2007.

DESIR, G. V. et al. Renalase lowers ambulatory blood pressure by metabolizing circulating adrenaline. **Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease**, v. 1, n. 4, 2012.

DESIR, G. V.; PEIXOTO, A. J. Renalase in hypertension and kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, n. 1, p. 22-28, 2013.

DROST, J. T. et al. Preeclampsia as a female-specific risk factor for chronic hypertension. **Maturitas**, v. 67, n. 4, p. 321-326, 2010.

ELSETOHY, K. A. et al. Are renalase rs2576178 and rs10887800 polymorphisms associated with pregnancy induced hypertension? **Mother and child**, v. 2, p. 3, 2014.

FARZANEH-FAR, R. et al. A functional polymorphism in renalase (Glu37Asp) is associated with cardiac hypertrophy, dysfunction, and ischemia: data from the heart and soul study. **PLoS One**, v. 5, n. 10, p. e13496, 2010.

FATIMA, S. S. et al. Polymorphism of the renalase gene in gestational diabetes mellitus. **Endocrine**, v. 55, n. 1, p. 124-129, 2017.

FAVA, C. et al. The Renalase Asp37Glu polymorphism is not associated with hypertension and cardiovascular events in an urban-based prospective cohort: the Malmö Diet and cancer

study. **BMC medical genetics**, v. 13, n. 1, p. 57, 2012.

FEDCHENKO, V. et al. Renalase mRNA levels in the brain, heart, and kidneys of spontaneously hypertensive rats with moderate and high hypertension. **Medical science monitor basic research**, v. 19, p. 267, 2013.

FERRAZZI, E. et al. Maternal hemodynamics: a method to classify hypertensive disorders of pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 218, n. 1, p. 124, 2017.

FOO, L. et al. Hypertension in pregnancy: natural history and treatment options. **Current hypertension reports**, v. 17, n. 5, p. 36, 2015.

GARCIA, S. L. et al. Fisiopatologia da pré-eclâmpsia. **Rev Bras Med**, v. 67, n. 1, p. 14-20, 2010.

GATHIRAM, P.; MOODLEY, J. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. **Cardiovascular journal of Africa**, v. 27, n. 2, p. 71, 2016.

HERNÁNDEZ-VALENCIA, M. et al. Catecholamines level variation during pregnancy in women with diabetes and preeclampsia. **Ginecologia y obstetricia de Mexico**, v. 75, n. 08, p. 454-458, 2007.

HERTIG, A.; LIERE, P. New markers in preeclampsia. **Clinica chimica acta**, v. 411, n. 21-22, p. 1591-1595, 2010.

KAHHALE, S.; FRANCISCO, R. P. V.; ZUGAIB, M. Pré-eclâmpsia. **Revista de Medicina**, v. 97, n. 2, p. 226-234, 2018.

KESHAVARZI, F. et al. Association of the placental VEGF promoter polymorphisms and VEGF mRNA expression with preeclampsia. **Clinical and Experimental Hypertension**, p. 1-6, 2018.

KISELJAKOVIC, E. et al. Renalase gene rs2576178 polymorphism in hemodialysis patients: study in bosnia and herzegovina. **Medical archives**, v. 70, n. 1, p. 31-34, 2016.

LE, T. M. et al. Maternal serum uric acid concentration and pregnancy outcomes in women with pre-eclampsia/eclampsia. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 144, n. 1, p. 21-26, 2019.

LI, X. et al. Association of imaging classification of intracranial cerebral atherosclerotic vascular stenosis in ischemic stroke and renalase gene polymorphisms. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 52, n. 4, p. 461-466, 2014.

LI, X. et al. Renalase gene polymorphism in patients with hypertension and concomitant coronary heart disease. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 39, n. 1, p. 9-16, 2015.

LV, Y-B et al. Association of Renalase SNPs rs2296545 and rs2576178 with the risk of hypertension: a meta-analysis. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. 1-14, 2016.

MARTINEZ, N. F. et al. Características clínicas e laboratoriais de gestantes com pré-

eclâmpsia versus hipertensão gestacional. **Revista Brasileira De Ginecologia E Obstetrícia**, p. 461-466, 2014.

OLIVEIRA, L. G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 12, p. 609-616, 2010.

PACHECO, J. La preeclampsia: un problema intrincado. **Diagnóstico**, v. 54, n. 4, p. 193-198, 2015.

PERAÇOLI, J. C.; PARPINELLI, M. A. Síndromes hipertensivas da gestação: identificação de casos graves. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, p. 627-634, 2005.

PISSETTI, C. W. et al. Papel protetor do alelo G do polimorfismo no gene Interleucina 10 (-1082G/A) contra o desenvolvimento de pré-eclâmpsia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 10, p. 456-460, 2014.

PORTO, L. B. et al. Função endotelial e perfusão uterina e em gestações subsequentemente complicadas por pré-eclâmpsia. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 23, n. 3, p. 318-322, 2013.

QUELHAS-SANTOS, J. et al. Renalase regulates peripheral and central dopaminergic activities. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 308, n. 2, p. F84-F91, 2014.

REBAHI, H. et al. Risk factors for eclampsia in pregnant women with preeclampsia and positive neurosensory signs. **Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 15, n. 4, p. 227, 2018.

REIS, Z. S. N et al. Pré-eclâmpsia precoce e tardia: uma classificação mais adequada para o prognóstico materno e perinatal? **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 32, n. 12, p. 584-90, 2010.

REZK, N. A. et al. Renalase gene polymorphism and epinephrine level in chronic kidney disease. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 2309-2317, 2015.

ROCHA, A. P. et al. Polimorfismos genéticos: implicações na patogenêse do carcinoma medular de tireóide. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, v. 51, n. 5, p. 723-730, 2007.

ROMERO, J. P. et al. Polimorfismo en el gen del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y su asociación con la preeclampsia. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 75, n. 2, p. 119-123, 2014.

SÁNCHEZ, A. Z. A.; PONCE, V. A. A.; BENÍTEZ, F. D. M. Caracterización de las pacientes con síndrome HELLP. **Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología**, v. 42, n. 4, p. 443-450, 2016.

SHENOY, V.; KANASAKI, K.; KALLURI, R. Pre-eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 9, p. 529-536, 2010.

SHI, W-B; WANG, H-Y. The association study on renalase polymorphism and hypertension: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 6, p. 9505, 2015.

SILVA, P. L. N. et al. Cuidados pré-natais e puerperais às gestantes de um centro de saúde de Minas Gerais quanto ao risco de pré-eclâmpsia: aspectos clínicos, nutricionais e terapêuticos. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 346-351, 2017.

SOUSA, M. G.; JÚNIOR, O. P. Emergências hipertensivas: epidemiologia, definição e classificação. **Rev Bras Hipertensão**, v. 21, n. 3, p. 134-139, 2014.

STEC, A. Rs10887800 renalase gene polymorphism influences the level of circulating renalase in patients undergoing hemodialysis but not in healthy controls. **BMC nephrology**, v. 18, n. 1, p. 118, 2017.

STEC, A. et al. Polymorphism of the renalase gene in end-stage renal disease patients affected by hypertension. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 11, p. 4162-4166, 2012.

STEC, A.; KSIAZEK, A.; BURACZYNSKA, M. Rs10887800 renalase gene polymorphism is associated with an increased risk of coronary artery disease in hemodialyzed patients. **International urology and nephrology**, v. 48, n. 6, p. 871-876, 2016.

TEIMOORI, B. et al. Renalase rs10887800 polymorphism is associated with severe pre-eclampsia in southeast Iranian women. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 3277-3285, 2019.

TURNER, J. A. Diagnosis and management of pre-eclampsia: an update. **International journal of women's health**, v. 2, p. 327, 2010.

VALENSISE, H. et al. Early and late preeclampsia: Two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 873-880, 2008.

VERDONK, K. et al. The renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. **Clinical Science**, v. 126, n. 8, p. 537-544, 2014.

YILMAZ, Z. V. et al. A novel marker in pregnant with preeclampsia: renalase. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 30, n. 7, p. 808-813, 2017.

YOUNG, B. C.; LEVINE, R. J.; KARUMANCHI, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 5, p. 173-192, 2010.

ZHANG, Z. et al. Pooled genetic analysis reveals an association of snps of only a few genes with risk predisposition to ischemic stroke in a Chinese population. **IUBMB life**, v. 67, n. 3, p. 170-174, 2015.

ZHAO, Q. et al. Renalase gene is a novel susceptibility gene for essential hypertension: a two-stage association study in northern Han Chinese population. **Journal of Molecular Medicine**, v. 85, n. 8, p. 877-885, 2007.

11 APÊNDICE

11.1 Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado por Mara Suellem de Freitas Moura como participante de uma pesquisa, onde não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Este projeto pretende estudar o que acontece com as concentrações de uma determinada substância importante para o controle da pressão sanguínea ao longo de sua gravidez, chamada de Renalase. Será realizado na enfermaria de alto risco da Maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (CE), na beira do leito, a coleta dos dados terá duração de 40 minutos, aproximadamente.

Será realizada a aplicação de um questionário com dados referentes à sua saúde e gravidez, em seguida será coletada uma amostra de sua saliva, de maneira simples e não dolorosa, sendo o material armazenado em tubos e guardado para posterior análise genética em Freezer a -80° . O material coletado será enviado ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, Curso de Medicina.

Este material será utilizado para realizar as medidas dessa determinada substância importante na regulação da pressão sanguínea durante a gestação. Este estudo não comprometerá em nada a conduta médica e os procedimentos comuns realizados durante sua gestação.

Não há benefício direto para você, pois se trata de estudo experimental testando a hipótese de que uma alteração genética nas concentrações dessa substância poderá estar relacionada com a pré-eclâmpsia e que possa vir a ser úteis como medida de prevenção primária dessa doença. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.

Não haverá riscos diretos para você, nem para seu bebê, o risco que pode acontecer refere-se a perda de sigilo dos seus dados envolvidos na pesquisa. Qualquer dado que possa ser publicado posteriormente em revistas científicas, não revelará a sua identidade. Entretanto, órgãos governamentais ligados à saúde podem solicitar informações a respeito da pesquisa e identidade dos participantes nela envolvidos.

Você pode retirar o seu consentimento para participar deste estudo a qualquer momento, inclusive sem justificativas e sem qualquer prejuízo à continuidade de seu

tratamento na Instituição. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que será submetida.

A sua participação na pesquisa não lhe acarretará despesas e também não lhe oferecerá nenhum tipo de pagamento.

A sua contribuição será de grande valia para o desenvolvimento e progresso das pesquisas em pacientes com pré-eclâmpsia.

OBSERVAÇÃO: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a pós-graduanda Mara Suellem de Freitas Moura que pode ser encontrada na Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde (telefone 88-999303703).

Endereço da responsável pela pesquisa:

Nome: Mara Suellem de Freitas Moura

Instituição: Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral

Endereço: Rua Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 100 – Derby

Telefones para contato: (88) 999303703

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, ____ anos, RG: _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante dessa pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e

recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram asseguradas e acima relacionadas. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do referido projeto, podendo retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Sobral, ____/____/____

Nome do participante da pesquisa: _____

Data: _____ Assinatura: _____

Nome do pesquisador: _____

Data: _____ Assinatura: _____

Nome da testemunha: _____

Data: _____ Assinatura: _____

Nome do profissional que aplicou o TCLE: _____

Data: _____ Assinatura: _____

11.2 Apêndice B – Ficha de coleta de dados das mulheres do estudo

QUESTIONÁRIO APLICADO ÀS PACIENTES

DATA: ___/___/___ **Nº. do Protocolo:** _____

GRUPO 01 ()

GRUPO 02 ()

Diagnóstico de pré-eclâmpsia dado em: ___/___/___

Médico responsável: _____

Identificação:

Nome: _____ Idade: _____

Data de nascimento: ___/___/___

Estado Civil: _____ Profissão: _____ Raça: _____

Escolaridade: _____

Naturalidade: _____

Endereço: _____

Telefone: () _____

Anamnese:

Presença de doenças intercorrentes? (Distúrbios da coagulação, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças autoimunes, doenças hepáticas, diabetes, câncer, sangramento, pré-eclâmpsia na família, complicações em gravidez anterior)

História familiar: () SIM () NÃO

Fumante: () SIM () NÃO

Consumo de álcool: () SIM () NÃO Quantidade: _____

Pratica exercício físico: () SIM () NÃO

Frequência: _____ Modalidade: _____

Informações sobre a gestação e antecedentes gineco-obstétricos:

Idade gestacional: _____ semanas

Pré-natal: () SIM () NÃO

Gravidez múltipla: () SIM () NÃO

GPA (Gravidez Parto Aborto): _____/_____/_____

Mesmo pai: () SIM () NÃO

Partos vaginal (PN) ou cirúrgico (PC)?

Idade do primeiro parto: _____

Intervalo interpartal (meses):

Parto prematuro: () SIM () NÃO

Filhos vivos: _____

Principais queixas:

() Cefaléia () Epigastralgia () Escotoma

() Outros : _____

Uso de medicamentos: _____**Informações clínicas e laboratoriais**

Altura: _____ cm

Peso: _____ Kg

Ganho de peso na gravidez: ____ Kg

Exames laboratoriais: Data da realização: ____/____/____

Hm:	TGO:
Hb:	TGP:
Ht:	Bilirrubina total:
Global:	Bilirrubina direta:
N.b	Bilirrubina indireta:
N.S	Ac. Úrico:
E	Creatinina:
B	Uréia:
L	LDH:
M	Outros:
Plaquetas:	

Pressão arterial: _____/_____ mmHg

12 ANEXO

12.1 Anexo A – Parecer Consubstanciado do CEP

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>UFC - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ /</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO (rs10887800) DO GENE DA RENALASE (RNLS) EM MULHERES COM PRÉ-ECLÂMPSIA								
Pesquisador: MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA								
Área Temática:								
Versão: 2								
CAAE: 86263417.2.0000.5054								
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - CAMPUS DE SOBRAL								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 2.685.131								
Apresentação do Projeto:								
<p>Trata-se de um estudo transversal e quantitativo do tipo caso controle. Será constituído por mulheres grávidas com pré-eclâmpsia (casos) e mulheres grávidas normotensas (controles). Todas as pacientes serão admitidas na Maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Sobral. O diagnóstico de pré-eclâmpsia será determinado de acordo com a Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez. Os seguintes critérios serão utilizados para o diagnóstico de PE: pressão arterial sistólica (PAS) e pressão sanguínea diastólica (PAD) deve ser superior a 140/90 mmHg, pelo menos, em duas medições, no mínimo com 4 h de intervalo, e a proteinúria deve ser acima de 300 mg por 24 hs. As mulheres grávidas que não preencherem a esses critérios serão excluídas do estudo. O grupo de controle será recrutado a partir do mesmo centro sendo constituído por mulheres grávidas voluntárias normotensas com pelo menos uma gravidez, sem história de PE. Os critérios de inclusão das gestantes com PE (casos) serão: idade gestacional igual ou superior a 20 semanas; pressão arterial sistólica (PAS) e pressão sanguínea diastólica (PAD) superior a 140/90 mmHg, pelo menos, em duas medições, no mínimo com 4 h de intervalo; proteinúria acima de 300 mg por 24 hs, em amostras isoladas, pelo método semiquantitativo de fita, conforme o protocolo clínico adotado na maternidade, serão incluídas ainda as formas graves de PE, mesmo na ausência de proteinúria. Para o grupo das gestantes normotensas (controles) os critérios de inclusão serão: estar no terceiro trimestre de gestação; ter pelo menos uma gravidez anterior; sem qualquer história de hipertensão ou PE; pressão sistólica/diastólica 120/80mmHg. A</p>								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000</td> <td style="border: none; text-align: right;">CEP: 60.430-275</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: Rodolfo Teófilo</td> <td style="border: none;"></td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: CE</td> <td style="border: none; text-align: right;">Município: FORTALEZA</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Telefone: (85)3366-8344</td> <td style="border: none; text-align: right;">E-mail: comape@ufc.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	CEP: 60.430-275	Bairro: Rodolfo Teófilo		UF: CE	Município: FORTALEZA	Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comape@ufc.br
Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000	CEP: 60.430-275							
Bairro: Rodolfo Teófilo								
UF: CE	Município: FORTALEZA							
Telefone: (85)3366-8344	E-mail: comape@ufc.br							

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.885.131

abordagem das pacientes será realizada na enfermagem de alto risco da Maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (CE), na beira do leito, mediante esclarecimentos sobre o conteúdo e objetivo da pesquisa e sem prejuízos à assistência. Serão colhidas amostras de raspado bucal de 100 mulheres com diagnóstico de PE e 100 mulheres do grupo controle.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a associação entre o polimorfismo (rs10687800) do gene RNLS com a pré-eclâmpsia

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos e dificuldades são pequenos em virtude da infraestrutura disponível na Universidade envolvida no projeto e todas as informações serão tratadas de forma confidencial. Além disso, a metodologia proposta é de conhecimento do coordenador e demais colaboradores. Os riscos que podem ocorrer referem-se a perda de sigilo dos dados envolvidos na pesquisa.

Benefícios:

A ocorrência de uma provável associação significativa do polimorfismo (rs10687800) do gene da renalase com a pré-eclâmpsia, esta poderá ser considerada um novo marcador genético na patogênese dessa condição, possibilitando um maior conhecimento nessa área e dessa forma ampliando as estratégias terapêuticas e preventivas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, que visa avaliar fatores genéticos associados ao desenvolvimento de pré eclâmpsia, com isso tentar estabelecer um marcador biológico para essa patologia no nosso meio.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados. Conforme solicitado a pesquisadora fez o TCLE e adequou o cronograma.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo CxP: 80.430-275
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 e-mail: compe@ufc.br

Continuação do Parecer: 2.885.131

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 943485.pdf	16/05/2018 03:40:04		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA VERSAO 3 DE 16 05 2018.pdf	16/05/2018 03:39:30	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO VERSAO 3 DE 16 05 2018.pdf	16/05/2018 03:37:20	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Versao 3 de 16 05 2018.pdf	16/05/2018 03:37:01	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Outros	Carta de anuencia.pdf	26/03/2018 10:30:58	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Outros	Termo de compromisso.pdf	07/02/2018 18:40:42	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao de concordancia.pdf	07/02/2018 18:39:38	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Outros	Carta de apreciacao.pdf	07/02/2018 18:38:02	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Outros	Curriculo Lattes.pdf	07/02/2018 18:37:09	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	07/02/2018 18:36:35	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Outros	Declaracao de Fiel Depositario.pdf	07/02/2018 18:34:58	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	07/02/2018 18:29:30	MARA SUELLEM DE FREITAS MOURA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 30 de Maio de 2018

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3368-8344 E-mail: conep@ufc.br