

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DA CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

BRUNA KRAUSPENHAR

**POLIMORFISMOS GENÉTICO E PROTEICO
DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA
NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPسيا**

PORTO ALEGRE
2015

BRUNA KRAUSPENHAR

**POLIMORFISMOS GENÉTICO E PROTEICO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPZIA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Dra. Bartira E. Pinheiro da Costa
Co- orientador: Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo
Co- orientadora: Dra. Dulce E. Casarini

PORTO ALEGRE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

K91p Krauspenhar, Bruna
Polimorfismos genético e proteico da enzima conversora de angiotensina na síndrome de pré-eclâmpsia. / Bruna Krauspenhar. – Porto Alegre, 2015.
72f. Gráf.; tab. Inclui um artigo científico submetido ao periódico *Experimental Medical Hypotheses*.

Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia) – Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS.
Orientador: Profa. Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa

1. Pré-Eclâmpsia. 2. Peptidil Dipeptidase A. 3. Hipertensão.
4. Polimorfismo Genético. I. Costa, Bartira Ercília Pinheiro da. II. Título.

CDD 618.3

Bibliotecária Responsável: Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441

BRUNA KRAUSPENHAR

**POLIMORFISMOS GENÉTICO E PROTEICO DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA NA SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 02 de Março de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Profª Dra. Adriani Oliveira Galão – (UFRGS)

Profª Dra. Leticia Germany Paula – (PUCRS)

Prof Dr. Domingos O L d'Ávila – (PUCRS)

Prof Dr. Ivan Carlos F Antonello – (PUCRS)

PORTO ALEGRE

2015

AGRADECIMENTOS

À minha querida Profa. Dra. Bartira E. Pinheiro da Costa, um exemplo de profissional e pessoa, foi minha professora no terceiro semestre da Faculdade de Farmácia, desde então orientadora durante os 3 anos de iniciação científica e durante os 2 anos do curso de mestrado, agradeço por sua orientação, atenção e motivação, minha eterna admiração e respeito.

Aos meus co-orientadores, Prof. Dr. Carlos E. Poli de Figueiredo e a Profa. Dra. Dulce E. Casarini, pesquisadores exemplares, agradeço pela gentileza e por toda dedicação no auxílio desse trabalho.

Ao grupo de pesquisa em Nefrologia, do qual tenho imenso orgulho em ter participado, agradeço por todo o aprendizado e por ter conhecido grandes amigos: Annerose Barros, Luciana Zamprogna, Marisa Reginatto Vieira, Daniela Moraes, Joice Nedel Ott. Agradeço a todos os estudantes de iniciação científica que ajudaram na coleta das amostras biológicas e no atendimento ambulatorial das gestantes, colaborando para a realização desse trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Rins e Hormônios da UNIFESP, coordenado pela Dra. Dulce, especialmente a Doutora Fernanda Ronchi, agradeço pelo auxílio na execução das atividades laboratoriais e por sua hospitalidade.

Aos colegas que tive a oportunidade de conhecer durante o curso de mestrado e que se tornaram grandes amigos, obrigada por todos os momentos compartilhados.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e a CAPES, agradeço pela oportunidade desta realização científica.

Agradeço a todas as gestantes por terem participado, viabilizando a concretização deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares, especialmente meus pais, Paulo e Roselaine, que sempre me apoiaram em todos os momentos, agradeço por toda compreensão e estímulo.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Introdução: Pré-eclâmpsia é uma doença de alta morbimortalidade materna e fetal, diagnosticada somente após a 20^o semana gestacional, de etiologia não totalmente esclarecida e a cura consiste na retirada da placenta. Segue-se na busca de biomarcadores que possibilitem um diagnóstico precoce para um melhor desfecho da doença. A isoforma 90 kDa da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), proposta como novo marcador de hipertensão, ainda não foi estudada na síndrome de pré-eclâmpsia. **Objetivos:** Avaliar a expressão genética, proteica e enzimática da ECA na Doença Hipertensiva Gestacional. **Materiais e métodos:** Foram incluídas 69 gestantes normotensas e com Síndrome de Pré-eclâmpsia (Pré-eclâmpsia Pura ou Sobreposta) no Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre/RS- Brasil. Foram coletadas uma amostra de sangue para realizar o polimorfismo genético da ECA e 3 amostras de urina (durante a gestação, após o parto e pelo 3 meses após o parto) para realizar a análise do polimorfismo proteico e a atividade enzimática da ECA. Este estudo teve parceria entre os laboratórios de pesquisa de Nefrologia da PUCRS e Rins e Hormônios da UNIFESP. **Resultados:** Foi publicado um artigo científico na revista *Medical Hypotheses*, intitulado em *Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa isoform: Biomarker for diagnosis of preeclampsia?*, descrevendo a hipótese desta pesquisa. Comparando os dados clínicos das participantes entre os grupos analisados (Gestante normal, Pré-eclâmpsia Pura e Pré-eclâmpsia Sobreposta), houve significância estatística entre idade gestacional obstétrica, níveis pressóricos, peso do recém-nascido ($p < 0,001$) e peso da placenta ($p = 0,030$). A história familiar de hipertensão comparada com os genótipos da ECA ($p = 0,017$) sugere envolvimento do alelo I. A razão da atividade enzimática de Zphe e Hhl foi diferente durante o período gestacional ($p < 0,025$) e também em relação aos genótipos da ECA ($p < 0,001$). Enquanto que a atividade enzimática isolada de Zphe e Hhl em relação aos genótipos da ECA não foi significativa ($p = 0,83$ e $p = 0,16$, respectivamente). A análise do polimorfismo proteico não foi realizada devido a problemas na execução da técnica, mas essa atividade será concluída assim que possível. **Conclusão:** O alelo I parece estar associado com a história familiar de hipertensão e os genótipos que possuem esse alelo (ID, II) estão predominantemente mais presentes nas gestantes que apresentam pré-eclâmpsia. A atividade enzimática de ZPhe/Hhl apresenta comportamento diferente durante o

período gestacional e também se altera conforme a classificação genotípica da gestante. Os dados sugerem que os mecanismos envolvidos na hipertensão essencial possam ser diferentes dos envolvidos na hipertensão transitória e espontânea desencadeada nas Doenças Hipertensivas Gestacionais.

Palavras chaves: Pré-eclâmpsia, Enzima Conversora de Angiotensina, Polimorfismo, Hipertensão.

ABSTRACT

Introduction: Preeclampsia is a disease characterized as high maternal and fetal morbidity and mortality, diagnosed only after 20th gestational week, its etiology is not completely understood and healing is placental removal. It has been looking for biomarkers that allow early diagnosis for a better outcome of the disease. The 90 kDa isoform of Angiotensin Converting Enzyme (ACE), proposed as a new biomarker for hypertension, has not been studied in the preeclampsia syndrome so far.

Objective: To evaluate the gene and protein expression, as well as enzymatic activity of ACE in pregnancy induced hypertension. **Material and methods:** It were

included 69 normotensive and preeclampsia syndrome pregnant women at São Lucas Hospital/PUCRS, Porto Alegre/ RS- Brazil. Blood sample was collected to perform ACE genetic polymorphism, and three urine samples (during pregnancy, after delivery and at least 3 months after delivery) were taken to perform ACE protein polymorphism and enzymatic activity. This study was conducted through a partnership between Nephrology Service from PUCRS and Kidneys and Hormones from UNIFESP Laboratories research.

Results: Scientific paper was published in Medical Hypotheses journal, entitled "Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa isoform: Biomarker for diagnosis of preeclampsia?" that described the hypotheses of this research. Comparing the participants clinical data among the groups (Normal pregnant, pure preeclampsia, superimposed preeclampsia), statistical significance was observed between obstetric gestational age, blood pressure, newborn weight ($p < 0.001$) and placental weight ($p = 0.030$). Hypertension familial history compared with ACE genotypes ($p = 0.017$) suggests allele I involvement. Enzymatic activity ZPhe and HhI ratio was different during the gestational period ($p < 0.025$), and also in relation to the ACE genotypes ($p < 0.001$). ZPhe and HhL isolated enzymatic activity also, in relation to the ACE genotypes, was not statistically different ($p = 0.83$ e $p = 0.16$, respectively). The protein polymorphism was not performed due to some technique problems, but this activity will be finished as soon as possible.

Conclusion: It seems that allele I is associated with the hypertension familial history, and the genotypes that have this allele (ID, II) are predominantly present in pregnant women with preeclampsia. Enzymatic activity of Zphe/HhI shows different behavior during the gestational period, and it also change according to genotypes classification. The data suggest that the mechanism involved in essential

hypertension can be different from those involved in transient and spontaneous hypertension triggered pregnancy induced hypertension.

Key Words: Preeclampsia, Angiotensin Converting Enzyme, Polymorphism, Hypertension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1-** Média da atividade enzimática para o substrato ZPhe, representada por escala logarítmica, nos três momentos das coletas de urinas em cada grupo gestacional.....34
- Gráfico 2-** Razão entre as atividades enzimáticas para ZPhe e Hhl, representado por escala logarítmica, nos três momentos das coletas de urinas em cada grupo gestacional.....35
- Gráfico 3-** Média logarítmica da razão entre as atividades enzimáticas para ZPhe e Hhl nos três momentos em que as urinas foram coletadas e a distribuição dos genótipos da ECA (ID, II e DD).....36
- Gráfico 4-** Média logarítmica da atividade de ZPhe/Hhl em relação aos genótipos da ECA, nos 3 diferentes momentos em que as urinas foram coletadas, em cada grupo gestacional.....37
- Gráfico 5-** Atividade enzimática de ZPhe, Hhl e ZPhe/Hhl nos três momentos em que as amostras de urinas foram coletadas nos grupos gestacionais.....38
- Gráfico 6-** Atividade enzimática de ZPhe (A) e Hhl (B) em relação aos genótipos da ECA nos três momentos estudados.....38
- Gráfico 7-** Razão das médias logarítmicas entre as atividades de ZPhe e Hhl em relação aos genótipos da ECA nos três momentos estudados.....39
- Gráfico 8-** Razão das médias logarítmicas das atividades enzimáticas de ZPhe e Hhl em relação aos genótipos da ECA, nos três momentos estudados, dos grupos gestacionais.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Componentes SRA em gestantes normotensas e com SPE.....	21
Tabela 2- Programa de amplificação do DNA- PCR 1.....	27
Tabela 3- Programa de amplificação do DNA- PCR 2.....	28
Tabela 4- Características e perfil genético dos grupos GN, PEP e PES.....	33
Tabela 5- Distribuição dos genótipos da ECA conforme história familiar de hipertensão.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG: Angiotensinogênio

ANG I: Angiotensina I

ANG II: Angiotensina II

DHG: Doença Hipertensiva Gestacional

ECA: Enzima conversora de Angiotensina

GN: Gestante Normotensa

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

HSL: Hospital São Lucas

IMC: Índice de Massa Corporal

IPA: Álcool Isopropílico

IPB: Instituto de Pesquisas Biomédicas

PAD: Pressão Arterial Diastólica

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PBS: Tampão de salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PE: Pré-eclâmpsia

PEP: Pré-eclâmpsia Pura

PES: Pré-eclâmpsia Sobreposta

PPGMCS: Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SPE: Síndrome de Pré-eclâmpsia

SRA: Sistema Renina Angiotensina

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL:.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	23
3. METODOLOGIA	24
3.1 DELINEAMENTO:	24
3.2 SUJEITOS DA PESQUISA:	24
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:.....	24
3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:	25
3.5 ASPECTOS ÉTICOS:.....	25
3.6 IMPLEMENTAÇÃO DO ESTUDO	25
3.6.1 POLIMORFISMO GENÉTICO DA ECA	26
3.6.2 PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS DE URINAS	28
3.6.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	29
3.6.4 POLIMORFISMO PROTEICO.....	29
3.6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4. RESULTADOS.....	32
4.1 RESULTADOS DOS GRUPOS GESTACIONAIS: GN, PEP E PES	32
4.2 RESULTADOS DOS GRUPOS GESTACIONAIS: GN E SPE.....	37
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	52
ANEXO 2- FICHA CONSULTA INICIAL.....	54
ANEXO 3- FICHA CONSULTA DE RETORNO.....	64
ANEXO 4- PARECER DE APROVAÇÃO DA CONEP.....	69
ANEXO 5- ARTIGO PUBLICADO	71

1. INTRODUÇÃO

Pré-eclâmpsia (PE) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna e fetal das Doenças Hipertensivas Gestacionais (DHG), sendo responsável por 2-8% das complicações durante a gravidez (KHAN, et al. 2006; ROBERTS, et al. 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, pelo menos, uma mulher morre a cada sete minutos devido a algum problema relacionado a essa patologia. Na América Latina e Caribe, as desordens hipertensivas são responsáveis por quase 26% das mortes maternas e cerca de 10 a 15% desses óbitos estão diretamente associadas com a PE (KHAN, et al. 2006; DULEY, 2009).

Nas últimas décadas, observou-se um aumento da incidência de PE que pode estar relacionada com mudanças nas características maternas, tais como: aumento do Índice de Massa Corporal (IMC) (BODNAR, et al. 2005) durante a gravidez, e aumento da prevalência de doenças predisponentes como diabetes e hipertensão crônica (BERG, et al. 2009). Sabe-se que vários fatores de risco estão associados com a patologia, entre eles: histórico familiar da doença, etnia, primiparidade, gestação múltipla, fertilização *in vitro*, extremos de idade materna, obesidade, hipertensão preexistente, doença renal e diabetes mellitus (KARUMANCHI, et al. 2005).

Pré-eclâmpsia é uma desordem multissistêmica caracterizada por apresentar hipertensão e proteinúria a partir da 20^a semana de gestação (YOUNG, LEVINE, KARUMANCHI, 2010). As complicações mais graves são: deslocamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemólise, hemorragia cerebral, falência hepática, edema agudo de pulmão, insuficiência renal aguda, crescimento intrauterino restrito e morte fetal (STEEGERS, et al. 2010).

É uma doença conhecida há mais de 2.000 anos, que além de causar grande impacto na saúde materna, também compromete o crescimento fetal (DEMAND, 1994). Ao longo desses anos, segue-se na tentativa de elucidar a sua etiologia e de detalhar os mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia, a fim de encontrar métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento para um melhor desfecho dessa gravidez cercada de complicações.

Várias teorias tentam esclarecer os mecanismos envolvidos nessa patologia, sugerindo o envolvimento de fatores imunológicos (REDMAN, 1991) (REDMAN, SARGENT, 2010), inflamatórios (REDMAN, SARGENT, 2004; REDMAN, 2011), vasculares (GILBERT, 2008; YOUNG, LEVINE, KARUMANCHI, 2010), entre outros. Permanece sendo uma doença sem cura, mas evidências demonstraram que a placenta exerce participação fundamental no surgimento da PE. Sua retirada consiste na eliminação das manifestações clínicas dessa doença, no entanto, os fatores patogênicos relacionados à placenta não estão completamente identificados. Atualmente, a PE tem sido proposta em um modelo de dois estágios: o primeiro seria uma inadequada implantação e desenvolvimento da vascularização placentária; o segundo seria uma resposta materna para esta condição, caracterizada por um quadro inflamatório e de disfunção endotelial sistêmica (ROBERTS, HUBEL, 2009).

Ainda não se alcançou um consenso internacional de qual a melhor definição e diagnóstico para a PE, provavelmente pelo fato de ser uma patologia heterogênea e multifatorial, podendo ter apresentação clínica e gravidade variáveis. Vários grupos propõem suas classificações, tais como: *Canadian Hypertensive Society* (MAGEE, et al. 2008), *National High Blood Pressure Education Program Working Group* (NHBPEPWG, 2000), *International Society for the Study of Hypertension* (BROWN, et al. 2001), *American Society of Hypertension* (LINDHEIMER, CUNNINGHAM, 2008), *Australasian Society for the Study of Hypertension* (LOWE, 2009), *American College of Obstetricians and Gynecologists* (SCHROEDER, 2002), *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* (TUFFNELL, 2006). No presente estudo, utilizamos os critérios recomendados pelo *National High Blood Pressure Education Program Working Group* (NHBPEPWG, 2000) para classificar as DHGs em:

Pré-eclâmpsia/ Eclâmpsia: Doença específica da gestação humana, que ocorre após a 20^a semana gestacional. Caracterizada por apresentar Pressão Arterial Sistólica (PAS) \geq 140 mmHg, Pressão Arterial Diastólica (PAD) \geq 90 mmHg, e proteinúria patológica \geq 0,3g em 24 horas. Na ausência de proteinúria, também existe suspeita diagnóstica quando o aumento da pressão está acompanhado com os seguintes sintomas: cefaleia, borramento visual, dor abdominal e alterações laboratoriais com baixa contagem de

plaquetas e alteração de enzimas hepáticas. A pressão arterial e a proteinúria devem voltar ao normal até 12 semanas após o parto, sendo caracterizada como PE “pura” (PEP). Eclâmpsia é a progressão desse quadro clínico com convulsões.

Pré-eclâmpsia Sobreposta à Hipertensão Crônica: Desenvolvimento da PE em pacientes com hipertensão crônica. O diagnóstico de Pré-eclâmpsia Sobreposta (PES) é provável nas seguintes situações: mulheres hipertensas e sem proteinúria no início da gestação, mas que desenvolvem proteinúria após 20^a semana gestacional, e mulheres com hipertensão e proteinúria prévias à 20^a semana, mas que desenvolvem aumento súbito de proteinúria, pressão arterial, transaminases, bem como trombocitopenia.

Hipertensão Gestacional: Gestante com hipertensão detectada, pela primeira vez, após a 20^a semana de gestação sem proteinúria patológica. O diagnóstico final poderá ser confirmado com a normalização da pressão arterial no período de 12 semanas após o parto, sendo classificada como hipertensão transitória. Se a pressão arterial elevada persistir após 12 semanas, a paciente será classificada como hipertensa crônica.

Hipertensão Crônica: Presença de hipertensão arterial prévia a gestação, que continua após o término da gravidez, ou que aparece anteriormente à 20^a semana gestacional. Hipertensão é definida como PAS \geq 140 mmHg e/ou PAD \geq 90 mmHg. A hipertensão diagnosticada, pela primeira vez durante a gestação, e que não normaliza após o parto, também é classificada como hipertensão crônica.

O termo Síndrome de Pré-eclâmpsia (SPE) tem sido utilizado quando não é possível diferenciar PEP e PES, uma vez que o diagnóstico final é dado somente doze semanas após o parto (ODEGARD, et al. 2000). Estudos relatam que pacientes com histórico de DHG têm risco elevado de desenvolver diabetes, hipertensão e doença cardiovascular após alguns anos (MCDONALD, 2008; LYKKE, et al. 2009). Cerca de 10-20% das mulheres que têm hipertensão gestacional evoluem para PE (DAVIS, et al. 2007). Aquelas que desenvolveram PE, na primeira gestação, possuem elevado risco de desenvolver doença renal (VIKSE, et al. 2010).

Até o momento, a avaliação clínica da PE baseia-se nos níveis tensionais pressóricos e alguns exames laboratoriais, como: urina de 24 horas para doseamento proteico, hemograma completo, ácido úrico, perfil de coagulação, creatinina sérica, níveis séricos de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase (SIBAI, 2003). Muitos estudos são realizados na tentativa de encontrar um biomarcador específico que possa auxiliar no diagnóstico precoce, permitindo ao médico escolher a melhor conduta clínica para o bem-estar da paciente, prevenindo uma evolução grave do estado patológico.

Nos últimos anos, várias moléculas foram apontadas como importantes preditores de PE (ALLEN, et al. 2014). No entanto, Levine, Karumanchi e Maynard demonstraram envolvimento de fatores pró-angiogênicos (PIGF- *placental growth factor*, VEGF- *vascular endothelial growth factor*) e antiangiogênicos (sFlt-1- *soluble fms-like tyrosine kinase 1* e sEng- *soluble endoglin*) no processo de placentação, sendo considerados promissores para diagnosticar PE antes das 34 semanas gestacionais (LEVINE, et al. 2004) (RANA, et al. 2007). Atualmente, a relação sFlt1/PIGF tem sido proposta como um dos melhores métodos para prever a patologia (VERLOHREM, et al. 2014).

Além disso, mais de 70 genes supostamente relacionados com os mecanismos fisiopatológicos da PE têm sido estudados. Esses genes foram divididos nos seguintes grupos: proteínas vasoativas, trombofilia e hipofibrinólise, estresse oxidativo e metabolismo lipídico, função endotelial, imunogenes (MUTZE, et al. 2008). Os genes do Sistema Renina Angiotensina (SRA), que fazem parte do grupo de proteínas vasoativas, tem sido também investigados, uma vez que esse sistema é responsável pela regulação da pressão sanguínea e da homeostase eletrolítica. O SRA é sintetizado em muitos tecidos, entre eles, um dos principais locais durante a gestação, está na unidade útero-placentária (SHAH, 2006).

O SRA atua através de uma série de reações enzimáticas que tem início com a biossíntese e secreção da renina pelas células justaglomerulares das arteríolas renais aferentes, em resposta a baixa pressão arterial e ao desequilíbrio eletrolítico. A renina é uma protease que hidrolisa o angiotensinogênio (ANG) em angiotensina I (ANG I). A enzima conversora de angiotensina (ECA) que é produzida pelo endotélio vascular de vários órgãos, em especial o pulmonar, cliva a ANG I em um

octapeptídeo biologicamente ativo, a angiotensina II (ANG II). Essa atua predominantemente em seus receptores AT1 e em menor grau nos AT2, promovendo vasoconstrição arteriolar, ativação da atividade simpática, viabilidade celular e a liberação de diferentes moléculas, como a aldosterona que desempenha um papel crítico na manutenção do balanço eletrolítico (FYHRQUIST, SAIJONMAA, 2008).

A ECA também age no sistema calicreína-cinina, degradando a bradicinina que é um potente vasodilatador endógeno, aumentando, portanto, a resposta vasoconstritora (MASUYER, et al. 2012). Outro componente do SRA bastante investigado, é a ECA 2, um homólogo da ECA, que degrada o resíduo de ANG II em angiotensina (1-7), uma molécula vasodilatadora. Além disso, estudos demonstraram a expressão de Angiotensina (1-7) e ECA 2 em vários locais da interface útero-placentária (NEVES, et al. 2008). Também, tem sido proposta como um possível alvo terapêutico para a PE, ainda em fase de estudo clínico (FERREIRA, et al. 2012).

O SRA tem uma rota bastante complexa que envolve muitos componentes, sendo bem provável que ainda não conheçamos completamente todos eles. Durante a gestação, ocorrem algumas mudanças na expressão dos componentes do SRA, para uma adaptação do sistema materno para que a mulher mantenha-se normotensa, enquanto que nas gestantes que desenvolvem PE, estudos demonstraram que ocorre um erro de adaptação, conseqüente à ativação inapropriada dos mecanismos de regulação da pressão arterial, resultando em sua anormal elevação. Conforme a revisão feita por Yang e colaboradores (YANG, et al. 2013), demonstrada na tabela 1, os níveis séricos dos componentes do SRA em gestantes normotensas e com PE são os seguintes:

Tabela 1. Componentes SRA em gestantes normotensas e com SPE

Componentes SRA	Gestante Normotensa	Gestante Pré-eclâmptica
AGT	++	-
Renina	++	+
Atividade Renina	++	=/-
Aldosterona	++	-
ANG II	++	=/-
Atividade ANG II	-	++
ANG (1-7)	++	-
ECA	-	=/-
ECA 2	++	-
Atividade ECA 2	++	-
RAT 1	=	++

++ Aumentado significativamente; + ligeiramente aumentado; = igual; - diminuído. (Adaptado de Yang e cols., 2013) SRA: Sistema Renina Angiotensina; SPE – Síndrome de Pré-eclâmpsia; AGT: Angiotensinogênio; ANG II: Angiotensina II; ECA: Enzima Conversora de Angiotensina; RAT: receptor de angiotensina

O polimorfismo da ECA é um dos mais investigados no SRA. Ocorre a inserção ou deleção de 287 pares de bases no íntron 16 do gene da ECA localizado no cromossomo 17 (17q23). O genótipo DD está associado com níveis elevados de ECA em 65% e o heterozigoto ID em 31% em relação ao genótipo II (RIGAT, et al. 1990). A razão dos elevados níveis de ECA no alelo D é, particularmente, devido a uma sequência silenciadora no alelo I (JACKSON, et al. 2000). Vários estudos têm sido realizados e apresentaram resultados contraditórios em relação à associação do genótipo ID e o risco de PE, inclusive algumas metanálises (GALAO, et al. 2004; SHAIK, et al. 2011; CHEN, et al. 2012; ZHONG, et al. 2012). A contradição desses achados provavelmente deve-se a diferença das populações em estudo, etnias, tamanho amostral, bases genéticas, métodos de genotipagem, entre outros.

Um grupo de pesquisadores da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo), coordenado pela Profa Dra Dulce Casarini, descreveu a presença das isoformas da ECA com massas moleculares de 190 e 65 kDa nas urinas de indivíduos normotensos, diferenciando das encontradas em pacientes hipertensos com massas moleculares de 90 e 65 kDa, sendo formas N-domínio da ECA (CASARINI, et al. 2001). Enquanto isso, Marques e colaboradores (MARQUES, et al.

2003) descreveram, na urina de ratos *Wistar*, as isoformas de 190 e 65 kDa, e nas urinas de ratos SHR as isoformas de 80 e 65 kDa, repetindo, portanto, o perfil descrito pela pesquisadora Casarini. De acordo com esses achados, foi proposto um marcador genético de hipertensão, avaliando a presença da isoforma 90 kDa na urina de hipertensos (RONCHI, et al. 2005; TEIXEIRA, et al. 2008; MALUF-MEIKEN, et al. 2012).

Até o momento, não foram encontrados relatos de estudos avaliando a expressão destas isoformas em gestantes com DHG. Analisando a excreção urinária da ECA em gestantes, é possível verificar se este marcador está apenas presente e/ou aumentado nas pacientes que tem PES, ou se ele também aparece nas gestantes PEP, que é uma forma de hipertensão transitória, mas que, uma vez presente, aumenta o risco futuro de doença cardiovascular nessas mulheres.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a expressão genética, proteica e enzimática da ECA na DHG.

2.2 Objetivos Específicos:

No sangue e urina de gestantes normotensas (GN), PEP e PES durante a gestação e no puerpério:

- ✧ Caracterizar o perfil genético, as isoformas proteicas da ECA, bem como sua atividade enzimática;
- ✧ Verificar a existência de relação entre os polimorfismos genético, proteico e atividade;
- ✧ Verificar associação entre o genótipo, a atividade enzimática e o polimorfismo proteico da ECA e as características clínicas das participantes do estudo.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento:

Estudo com delineamento tipo coorte prospectiva.

3.2 Sujeitos da Pesquisa:

Seleção aleatória conforme a chegada das gestantes ao Ambulatório de Obstetrícia e ao Centro Obstétrico do Hospital São Lucas (HSL) da PUCRS (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul)- Porto Alegre/RS. Todas as gestantes foram devidamente informadas sobre a pesquisa e incluídas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e nenhuma amostra foi coletada antes do consentimento das participantes.

Foi preenchida uma ficha de inclusão que constam os dados de anamnese, exame físico e exames complementares (Anexo 2). Durante o período gestacional, após as 20 semanas,, foram coletados aproximadamente 50 mL de urina e 4 mL de sangue e encaminhados para o Laboratório de Nefrologia no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS. Imediatamente após o parto, uma nova coleta de urina foi realizada. As amostras foram processadas e armazenadas conforme o objetivo de suas análises, esta descrição consta dos itens 3.6.1; 3.6.2; 3.6.3 e 3.6.4.

Pelo menos três meses após o parto, as participantes do estudo foram agendadas para comparecerem ao Ambulatório de Hipertensão para acompanhamento médico e preenchimento da ficha de retorno (Anexo 3), e também foi realizado a coleta de mais uma amostra de urina. Somente neste momento, foi possível obter o diagnóstico final das gestantes que apresentaram SPE, classificando-as como PEP ou PES (2000).

3.3 Critérios de Inclusão:

Foram incluídas gestantes com SPE e GN. As pacientes deveriam ter idade gestacional comprovada por data da última menstruação confiável ou por ultrassonografia precoce (≤ 12 semanas).

3.4 Critérios de Exclusão:

Foram excluídas pacientes com diagnóstico de hepatopatia, tireoideopatia, diabetes, nefropatia ou qualquer outra patologia associada à gestação, bem como as pacientes com alteração no exame de fundoscopia.

Na linha de pesquisa da Hipertensão na Gestação do Grupo de Pesquisa em Nefrologia, existem vários projetos aprovados pelo CEP, acontecendo simultaneamente. Muitas vezes, as mesmas pacientes se enquadram em diferentes estudos do grupo e aceitam participar de todos. Por isso, os critérios de exclusão descritos se aplicam para o presente projeto, pois são condições para os outros estudos.

3.5 Aspectos Éticos:

Aprovado pelo CEP em sua totalidade no dia 19 de agosto de 2013, nº do parecer 364.750/ 09.08.2013 (Anexo 4). A linha de pesquisa da Hipertensão na Gestação dispõe de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido único aprovado pelo CEP (Ofício nº 440/05-CEP) (Anexo 1).

3.6 Implementação do Estudo

Este estudo é decorrente de uma parceria entre os grupos de pesquisa do Laboratório de Nefrologia da PUCRS e o Laboratório de Rins e Hormônios da UNIFESP, o qual é coordenado pela Profa Dra Dulce Casarini.

Casarini e colaboradores descreveram um marcador urinário de hipertensão, a isoforma 90 kDa da ECA, e estão patenteando um teste rápido de urina para detecção dessa molécula. Em associação com o Grupo de Pesquisa em Nefrologia da PUCRS, o qual estuda Hipertensão na Gestação, surgiu o questionamento de avaliar a presença desse marcador de hipertensão essencial em pacientes com PE, já que apresenta-se como um modelo de hipertensão transitória em humanos.

Deste modo, as amostras de sangue e urinas de cada gestante foram coletadas no Ambulatório de Obstetrícia e no Centro Obstétrico do HSL da PUCRS e armazenadas no Laboratório de Nefrologia/IPB. A partir da amostra de sangue

realizou-se o polimorfismo genético, conforme descrito no item 3.6.1 As amostras de urinas foram processadas e dialisadas, também no Laboratório de Nefrologia, conforme descrito a seguir, e transportadas até a UNIFESP para a condução dos ensaios laboratoriais de Atividade Enzimática e Polimorfismo Proteico, conforme técnica desenvolvida por Casarini e colaboradores.

Durante a realização da disciplina de Oficina de Redação Científica, ministrada pelo professor Dr. Carlos E. Poli de Figueiredo no PPGMCS/PUCRS, foi redigido um artigo científico sobre a hipótese deste projeto, o qual já está publicado na revista *Medical Hypotheses*, conforme descrito em resultados.

3.6.1 Polimorfismo Genético da ECA

A detecção de inserção ou deleção de 287 pares de bases no íntron 16 do gene da ECA através do teste de genotipagem foi realizada no laboratório de Nefrologia no IPB-HSL.

A amostra de sangue foi coletada, antes do parto, de gestantes normotensas e com SPE em tubo tipo *vacutainer*[®] contendo EDTA. Então, encaminhada ao laboratório de Nefrologia e mantida em refrigeração a 4°C até o momento da extração do DNA.

Os passos do protocolo de extração do DNA foram: 1) centrifugar a amostra de sangue por 10 minutos a 3000 rpm; 2) Retirar o *buffy coat* - camada de leucócitos - com uma pipeta descartável estéril, transferindo para um tubo de centrifugação auto clavado; 3) Adicionar ao tubo de centrifugação, aproximadamente 1000 µl de água mili-Q autoclavada e centrifugar por 30 segundos (*short spin*), a fim de lisar as hemácias remanescentes; 4) Descartar o sobrenadante e adicionar 1000 µl de PBS 1X (tampão de salina tamponada com fosfato) auto clavado e centrifugar, novamente, por 30 segundos; 5) Repetir os passos 3 e 4 até a obtenção de um sedimento branco, sem resquícios de eritrócitos; 6) Adicionar 300 µl de Brazol e 60 µl de Clorofórmio para que ocorra rompimento das membranas e digestão das proteínas; 7) Homogeneizar no *vortex* e centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm, para separar as fases orgânica e aquosa; 8) Retirar a fase aquosa onde se encontra o DNA; 9) Medir o volume retirado da fase aquosa e multiplicar por 0,7 para

acrescentar álcool isopropílico (IPA) a fim de precipitar o DNA em 24 horas (-20°C);
 10) Centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm e repousar o tubo de centrifugação, contendo o sedimento de DNA a temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos;
 11) Adicionar 50 µl de água mili-Q autoclavada e armazenar a -20°C.

Após a extração do DNA, realizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Adicionou-se dentro de cada tubo de centrifugação: 14,95 µl de água mili-Q autoclavada; 2,5 µl tampão 10x; 1,0 µl cloreto de magnésio; 0,5 µl de dNTPs 10mM; 0,35 µl do *primer* reverso (GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'); 0,35 µl do *primer* direto (5'- CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3'); 2,5 µl de DMSO 10%; 0,35 µl de Taq DNA polimerase; 2,5 µl da amostra de DNA completando um volume total de 25 µl. Os tubos de centrifugação foram dispostos no termociclador, equipamento amplificador de DNA. No termociclador, foi desenvolvido um programa com faixas de temperatura para amplificação do gene em questão, conforme tabela 2.

Tabela 2. Programa de amplificação do DNA- PCR 1

FASE	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos (número)
Desnaturação inicial	94	3	
Desnaturação	94	1	
Anelamento	58	1	30
Extensão	72	1	
Extensão final	72	10	
Final	4	-	

Após esse processo, foi preparado gel de agarose 2% com brometo de etídeo. Em cada poço do gel, foi dispensado 20 µl da amostra proveniente do termociclador com 5 µl de xileno, previamente homogeneizados. Em um dos poços adicionou-se marcador de pares de base. Os poços foram direcionados para o polo negativo da cuba de eletroforese, já que a estrutura do DNA é negativa, e assim, a amostra migrou em direção ao polo positivo. Aplicou-se uma tensão de 100 Volts e uma corrente de 400 mA por 30 minutos para a migração.

O gel de agarose foi visualizado com luz ultravioleta. Bandas com 190 pares de base foram classificadas como genótipo II; bandas com 190 e 490 pares de base foram classificadas como genótipo ID; e bandas com 490 pares de base, genótipo DD.

Todas as gestantes que apresentaram genótipos DD foram genotipadas novamente através de um segundo PCR, acrescentando um terceiro *primer* (5'-TGG GAT TAC AGG CGT GAT ACA G-3') que anela na sequência de inserção, resultando na amplificação de uma banda extra de 160 pares de base quando o alelo I estiver presente. Estudos descreveram que cerca de 10% dos genótipos DD tendem a ser ID, por isso a necessidade da confirmação do genótipo com um segundo PCR (EVANS, et al 1994; UEDA, et al. 1996).

Devido à inserção desse terceiro *primer*, o programa para o segundo PCR no termociclador foi alterado, conforme demonstra a tabela 3.

Tabela 3- Programa de amplificação do DNA- PCR 2

FASE	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos (número)
Desnaturação inicial	94	3	
Desnaturação	94	1	
Anelamento	55	1	30
Extensão	72	1	
Extensão final	72	5	
Final	4	-	

3.6.2 Processamento inicial das amostras de urinas

As urinas coletadas de gestantes GN e SPE foram armazenadas a -20°C, processadas e encaminhadas para o Laboratório do Rim e Hormônios da UNIFESP. O transporte foi realizado em caixa de isopor com gelo seco, via aérea.

As amostras foram processadas individualmente, após a medição do volume e ajuste do pH para 8,0 com tampão Tris 1M. Foram submetidas à centrifugação de 3000 rpm por 8 minutos e obteve-se os sobrenadantes que foram concentrados em

centricon (Millipore, USA) a 3000 rpm a 4°C, e passaram pelo processo de ultrafiltração no mesmo equipamento com tampão Tris/HCl 50 mM, pH 8,0, contendo NaCl 150 mM, utilizando uma membrana de exclusão de 30 kDa de massa molecular. Posteriormente, realizou-se dosagens da atividade enzimática das isoformas da ECA, conforme descrita no item a seguir.

3.6.3 Atividade Enzimática

A atividade da ECA foi determinada pela técnica de fluorimetria, utilizando Hipuril-His-Leu (HHL) e Z-Phe-His-Leu (ZPhe-HL) (PIQUILLOUD, et al. 1970; FRIEDLAND, SILVERSTEIN, 1976) como substratos. O tampão padrão utilizado para os ensaios foi o fosfato de potássio 100 mM pH 8,3, contendo NaCl 300 mM e ZnSO₄ 0,1 mM.

Alíquotas das urinas (50µL) foram incubadas a 37°C, com 200 µL dos substratos ZPhe-HL e HHL separadamente, durante um período de 4 horas, sendo que as reações enzimáticas foram interrompidas com 1,5 mL de NaOH 0,28 N. O dipeptídeo His-Leu liberado acoplou-se ao marcador fluorescente ortoformaldaldeído (20 mg/mL, em metanol), sendo a reação fluorimétrica interrompida após 10 minutos pela adição de 200 µL HCl 3 N. A seguir, a leitura da fluorescência (excitação: 360 nm; emissão: 500 nm) foi feita no espectrofluorímetro (Hitachi F-2000, Japão).

3.6.4 Polimorfismo Proteico

A concentração das proteínas nas urinas foi determinada através de leitura de absorbância em 280 nm utilizando cubetas de quartzo com 1,0 cm de largura. As demais determinações proteicas foram feitas pelo método descrito por (BRADFORD, 1976) usando albumina sérica bovina como padrão (Kit Bio-Rad, USA).

Para determinar o polimorfismo proteico, utilizou-se eletroforese de acordo com o método descrito por (LAEMMLI, et al 1970). Após realizada concentração proteica destas amostras de urinas, uma alíquota correspondente a 100 µg de proteína foi liofilizada e redissolvida em 20 µL de tampão de amostra (água destilada, Tris-HCl 500 mM, pH 6,8, glicerol, SDS (sódio dodecil sulfato) 10%, 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05%. A seguir, as amostras foram

aquecidas em banho seco a 950°C por 5 minutos. Em seguida, processou a eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5% acrilamida) na presença de sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE) sob uma tensão de 140V e corrente de 40 mA.

As massas moleculares das enzimas foram determinadas por comparação com a migração de proteínas com peso molecular conhecido. Após a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida, foi realizado a técnica de *imunoblotting*, transferindo-se eletroforeticamente as proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de Nitrocelulose (Hybond ECL, HE Helthcare, Suécia), e incubando com anticorpo anti-ECA 9B9 (1:1000) (Chemicon International, USA). Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário biotinilado (1:2000). As etapas subsequentes foram realizadas pelo sistema estreptavidina/fosfatase alcalina, segundo recomendações do fabricante (HE Helthcare, Suécia).

Todavia, não foi possível realizar este procedimento devido a problemas nos anticorpos utilizados nesta técnica descrita por Casarini e colaboradores (2001). Vários anticorpos vêm sendo testados pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Rins e Hormônios, assim como modificações na execução da técnica, a fim de solucionar este problema. Assim, para que não fosse desperdiçado conteúdo amostral, optou-se por não realizar a análise do polimorfismo proteico até que o problema seja solucionado, mesmo prevendo que o período do mestrado encerrasse sem a conclusão desta etapa do projeto. Deste modo, a análise dos polimorfismos protéicos da ECA será conduzida posteriormente.

3.6.5 Análise Estatística

A construção do banco de dados foi realizada por meio do programa Excel (2011) e para análise estatística dos dados utilizou-se o programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 21.0 (SPSS 21.0) para *Windows*.

As variáveis contínuas foram apresentadas como média e desvio padrão ou mediana e amplitude interquartil, quando os dados apresentavam distribuição assimétrica. Dados categóricos foram descritos por frequência, porcentagem ou razão. Nas comparações entre grupos foi realizada Equação de Estimativa

Generalizada e ANOVA. O teste do Qui-quadrado foi empregado nas comparações das variáveis categóricas, assim como teste exato de Fischer quando necessário. O nível de significância foi definido como $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Um dos resultados desta dissertação de mestrado está apresentado no Anexo 5, sendo a publicação de um artigo científico na revista *Medical Hypotheses*. O artigo pode ser acessado através do endereço eletrônico: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030698771400334X> (KRAUSPENHAR, et al. 2014). Foi intitulado *Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa isoform: Biomarker for diagnosis of preeclampsia?* e sustenta a hipótese de avaliar a isoforma 90 kDa da ECA como um possível biomarcador de PE, sugerindo a possibilidade de um diagnóstico médico precoce. Este trabalho possui parceria com o grupo de pesquisadores do Laboratório de Rins e Hormônios/UNIFESP, coordenado pela Profa Dra Dulce Casarini, que há anos vem estudando a isoforma 90 kDa como marcador genético de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).

4.1 Resultados dos grupos gestacionais: GN, PEP e PES

O tamanho amostral deste estudo foi de 69 gestantes, das quais 24 tiveram uma gestação normal (GN), 19 apresentaram PEP, 23 PES e 3 SPE (sem classificação clínica definida). A idade gestacional obstétrica e os níveis pressóricos foram significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,001$), bem como o peso do recém-nascido e da placenta. A idade materna, tipo racial e o histórico familiar de hipertensão não foram significativamente diferentes entre os grupos ($p = 0,582$, $p = 0,518$ e $p = 0,538$, respectivamente). A distribuição dos genótipos da ECA e a frequência alélica segundo os grupos também estão descritos na Tabela 4, que demonstra as características da população em estudo. Foi detectado diferença estatística na distribuição do genótipo DD quando comparado com os outros grupos gestacionais ($p = 0,048$), sendo que para a frequência alélica, esta diferença não foi constada (I: $p = 0,399$ e D: $0,958$), de modo que os grupos apresentam distribuição de Hardy-Weiberg.

Tabela 4- Características e perfil genético dos grupos GN, PEP e PES

	GN (n=24)	PEP (n=19)	PES (n=23)	P
Idade Materna (anos): média ± DP	30,7 ± 8,3	28,3 ± 6,3	29,7 ± 7,6	0,582
Idade Gestacional Obstétrica (semana): média ± DP	39,3 ± 1,7	35,2 ± 3,8	34,4 ± 3,2	<0,001
Caucasiana: n (%)	11 (47,8)	12 (63,2)	14 (60,9)	0,518
Pressão Arterial Sistólica (mmHg): média ± DP	120 ± 9,8	149 ± 15,4	155 ± 20,9	<0,001
Pressão Arterial Diastólica (mmHg): média ± DP	76 ± 10,0	95 ± 12,3	97 ± 15,6	<0,001
História Familiar de HAS SIM: n(%)	15 (63,6)	15 (78,9)	17 (73,9)	0,538
Parto normal: n(%)	10 (40,9)	5 (28,6)	4 (16,7)	0,148
Peso do recém-nascido (g): média ± DP	3296,7 ± 384,6	2456,9 ± 1020,2	2410,8 ± 988,2	<0,001
Peso da placenta (g): média ± DP	645,2 ± 126,8	498,5 ± 189,0	588,6 ± 238,4	0,030
Índice de Apgar 1 minuto: média ± DP	8,0 ± 1,4	7,8 ± 1,4	8,0 ± 1,6	0,892
Índice de Apgar 5 minutos: média ± DP	9,1 ± 0,8	8,8 ± 1,1	9,2 ± 0,6	0,425
Genótipos DD: n(%)	7 (30,4)*	2 (11,8)**	1 (5,3)***	0,048
Genótipos ID: n(%)	10 (43,5)*	12 (70,6)**	15 (78,9)***	0,210
Genótipos II: n(%)	6 (26,1)*	3 (17,6)**	3 (15,8)***	0,553
Alelo D: n(%)	24 (52,2)	16 (47,1)	17 (44,7)	0,958
Alelo I: n(%)	22 (47,8)	18 (52,9)	21 (55,3)	0,399

*Grupo GN possui 1 gestante sem genótipo, totalizando n=23. **Grupo PEP possui 2 gestantes sem genótipo, totalizando n=17. ***Grupo PES possui 4 gestantes sem genótipo, totalizando n=19. P foi calculado através do teste estatístico ANOVA, comparando os três grupos gestacionais.

Analisando o histórico familiar de hipertensão dessas gestantes com o genótipo da ECA, constatou-se significância estatística (p= 0,017) conforme demonstra a tabela 5. Os dados mostram que os genótipos ID e II possuem 73% e 91%, respectivamente, de histórico familiar de hipertensão. Enquanto que 67% do genótipo DD não tem histórico familiar de hipertensão.

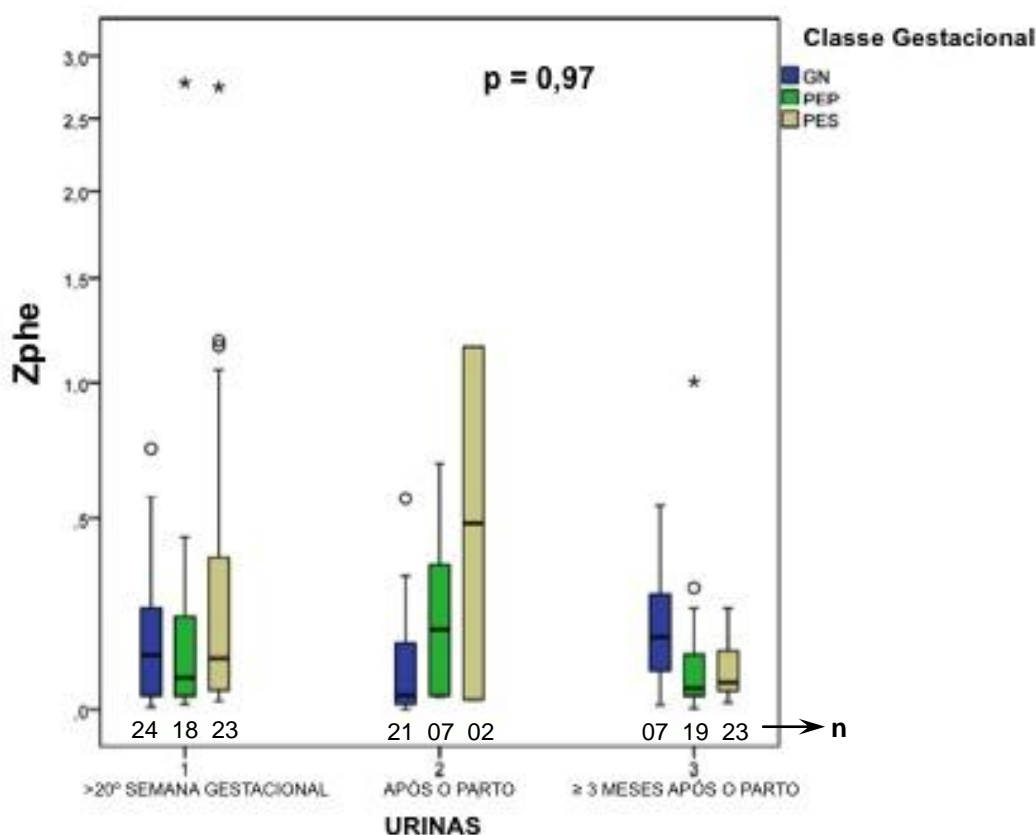
Tabela 5- Distribuição dos genótipos da ECA conforme história familiar de hipertensão

Histórico Familiar de HAS	Genótipo		
	ID	II	DD
SIM	73%	91%	33%
NÃO	27%	9%	67%

Teste exato de Fisher, $p = 0,017$.

Relacionando a atividade da ECA para o substrato ZPhe (maior afinidade pela molécula de 90 kDa da ECA), com as urinas 1 (coletada após a 20ª semana de gestação), 2 (imediatamente após o parto) e 3 (≥ 3 meses após o parto), segundo as classes gestacionais -GN, PEP E PES-, constata-se que não houve significância estatística ($p = 0,97$), conforme Gráfico 1.

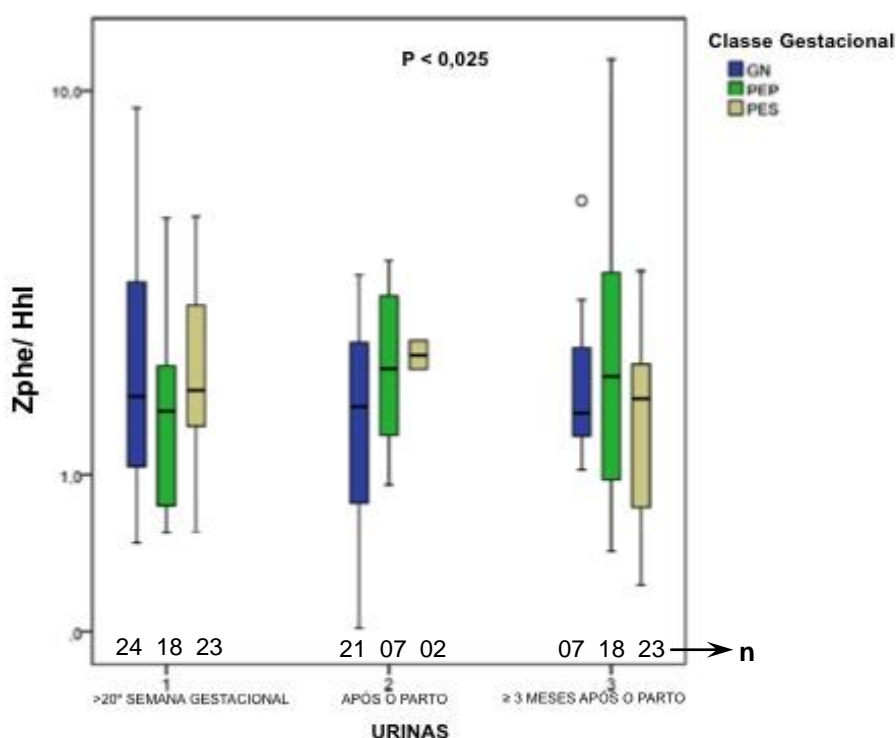
Gráfico 1: Média da atividade enzimática para o substrato ZPhe, representada por escala logarítmica, nos três momentos das coletas de urinas em cada grupo gestacional



(GN –gestação normal-, PEP – pré-eclâmpsia pura- e PES – pré-eclâmpsia sobreposta).
n: representa o tamanho amostral de cada grupo em cada momento de coleta das urinas.

Porém, ao relacionar as classes gestacionais (GN, PEP e PES) com a razão das atividades enzimáticas de ZPhe e Hhl nos 3 momentos que foram coletadas as amostras de urina, significância estatística foi detectada ($p < 0,025$), conforme ilustra o Gráfico 2.

Gráfico 2: Razão entre as atividades enzimáticas para ZPhe e Hhl, representado por escala logarítmica, nos três momentos das coletas de urinas em cada grupo gestacional



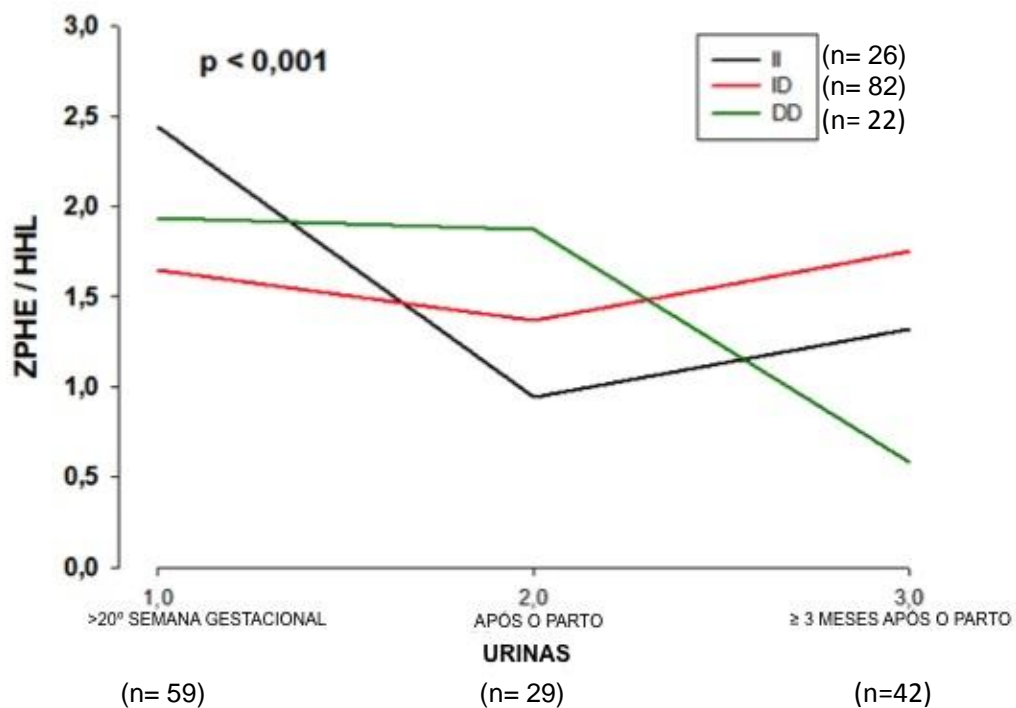
(GN –gestação normal-, PEP – pré-eclâmpsia pura- e PES – pré-eclâmpsia sobreposta).
n: representa o tamanho amostral de cada grupo em cada momento de coleta das urinas.

A atividade enzimática para ZPhe e Hhl com os genótipos da ECA (ID, II e DD) foi relacionada isoladamente, mostrando não haver significância estatística ($p = 0,83$ e $p = 0,16$, respectivamente). Porém, ao realizar a razão entre as atividades enzimáticas para ZPhe e Hhl com os genótipos, houve significância estatística ($p < 0,001$), conforme ilustra o Gráfico 3.

O Gráfico 3 está demonstrando que a distribuição dos genótipos da ECA (ID, II, DD), considerando a razão da atividade para os substratos ZPhe e Hhl, se altera conforme o momento da coleta de urina, com significância estatística de $p < 0,001$. Os genótipos ID e DD apresentaram-se com distribuição semelhante durante a

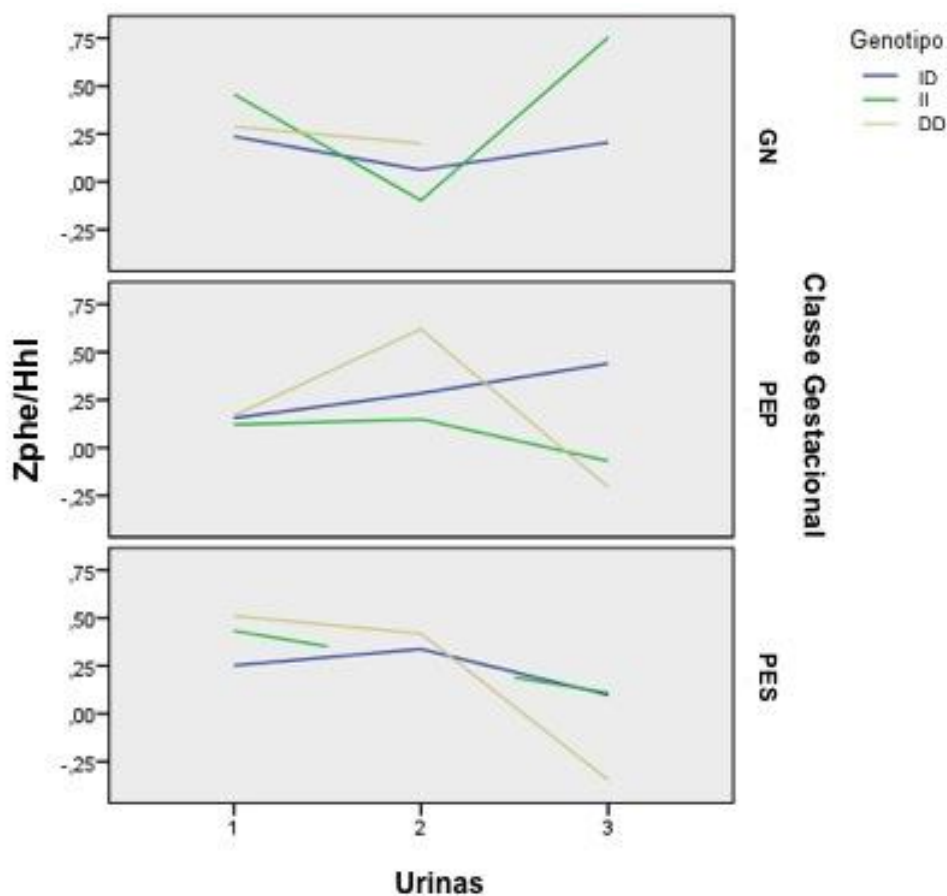
gestação, conforme a razão da atividade da enzima. Entretanto, nota-se que gestantes com genótipo ID apresentam discreta diminuição da razão da atividade enzimática no pós-parto; diferentemente do genótipo II que a queda é muito acentuada nesse mesmo momento. Três meses após o parto, os valores da razão da atividade enzimática aumentam em ambos os genótipos II e ID, enquanto para o genótipo DD a atividade decai acentuadamente para valores quase nulos.

Gráfico 3: Média logarítmica da razão entre as atividades enzimáticas para ZPhe e Hhl nos três momentos em que as urinas foram coletadas e a distribuição dos genótipos da ECA (ID, II e DD).



O Gráfico 4 representa a distribuição dos genótipos da ECA em relação à atividade ZPhe/Hhl, estratificada pelos três 3 grupos: GN, PEP e PES. Identifica-se que os três genótipos apresentam diferentes razões entre ZPhe e Hhl nos três momentos que as urinas foram coletadas dos grupos de gestantes estudados. O genótipo DD, no pós-parto (urina 3), apresenta queda acentuada da relação ZPhe/Hhl nos grupos PEP e PES, enquanto que, neste mesmo período, GN com perfil genético II elevam acentuadamente à mesma relação. Linhas interrompidas mostram que o tamanho amostral foi muito baixo para ser analisado estatisticamente.

Gráfico 4: Média logarítmica da atividade de ZPhe/Hhl em relação aos genótipos da ECA, nos 3 diferentes momentos em que as urinas foram coletadas, em cada grupo gestacional

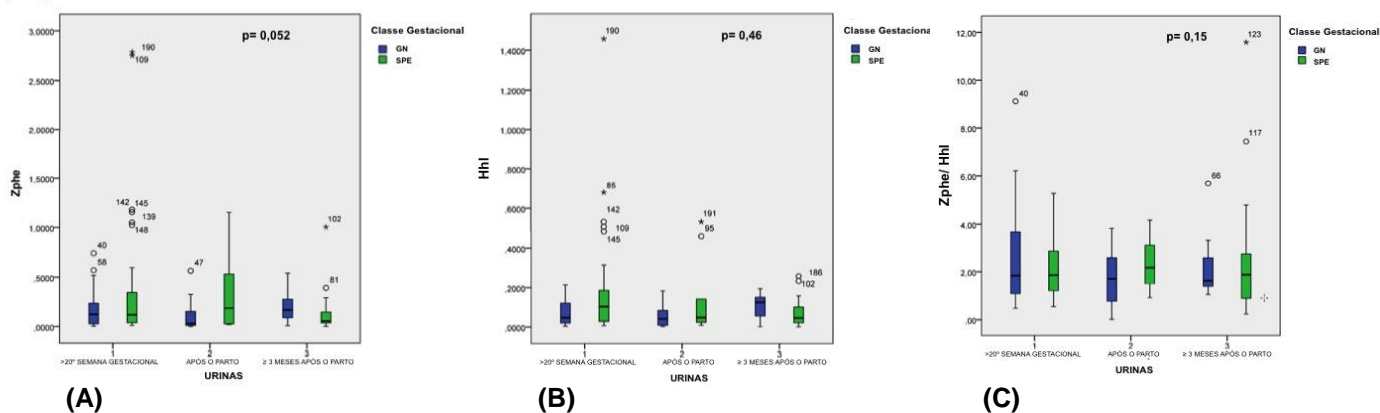


GN –gestação normal-, PEP – pré-eclâmpsia pura- e PES – pré-eclâmpsia sobreposta. (GN: n= 12 ID, 6 II, 7 DD. PEP: n= 12 ID, 3 II, 2 DD. PES: n= 15 ID, 3 II, 1 DD).

4.2 Resultados dos grupos gestacionais: GN e SPE

Os dados também foram analisados estratificando as 69 amostras obtidas em apenas dois grupos: 24 GN e 45 SPE (PEP + PES). Comparando os grupos gestacionais de acordo com a atividade enzimática do substrato Zphe, Hhl, e Zphe/Hhl constata-se que não houve diferença estatística em nenhuma das três análises, conforme demonstra o Gráfico 5.

Gráfico 5: Atividade enzimática de ZPhe, Hhl e ZPhe/Hhl nos três momentos em que as amostras de urinas foram coletadas nos grupos gestacionais



(A) Representa a média da atividade enzimática de ZPhe, (B) a média de Hhl e (C) a média de Zphe/Hhl. GN –gestante normal- e SPE –síndrome de pré-eclâmpsia. Apresentando $p= 0,052$, $p=0,46$ e $p= 0,15$, respectivamente.

Associando isoladamente a média logarítmica da atividade enzimática de ZPhe e Hhl com os genótipos da ECA (ID, II, DD), nota-se que não houve comportamento diferente entre os mesmos, não apresentando significância estatística ($p= 0,84$ e $p=0,12$, respectivamente), conforme o gráfico 6. Porém, ao relacionar a razão das atividades enzimáticas de ZPhe e Hhl com os genótipos, o comportamento foi diferente, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,001$), conforme demonstra o Gráfico 7.

Gráfico 6: Atividade enzimática de ZPhe (A) e Hhl (B) em relação aos genótipos da ECA nos três momentos estudados

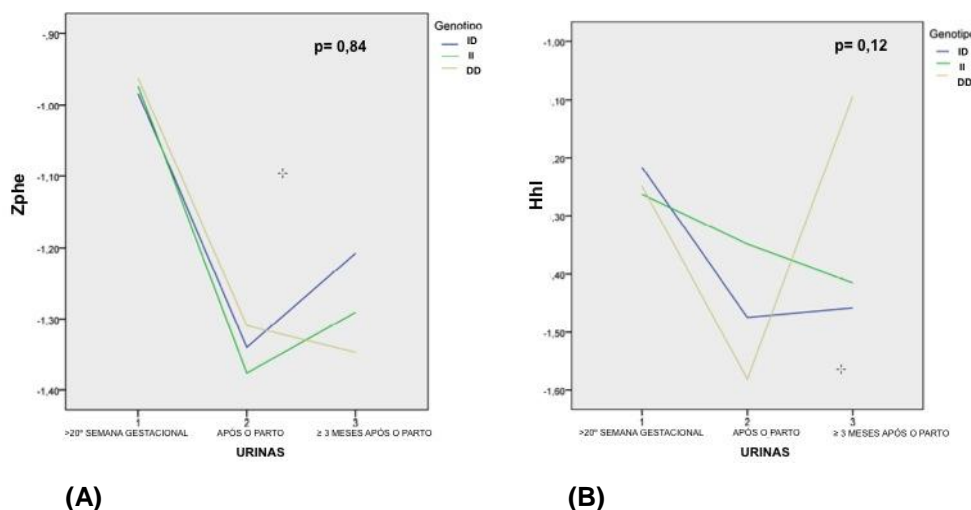
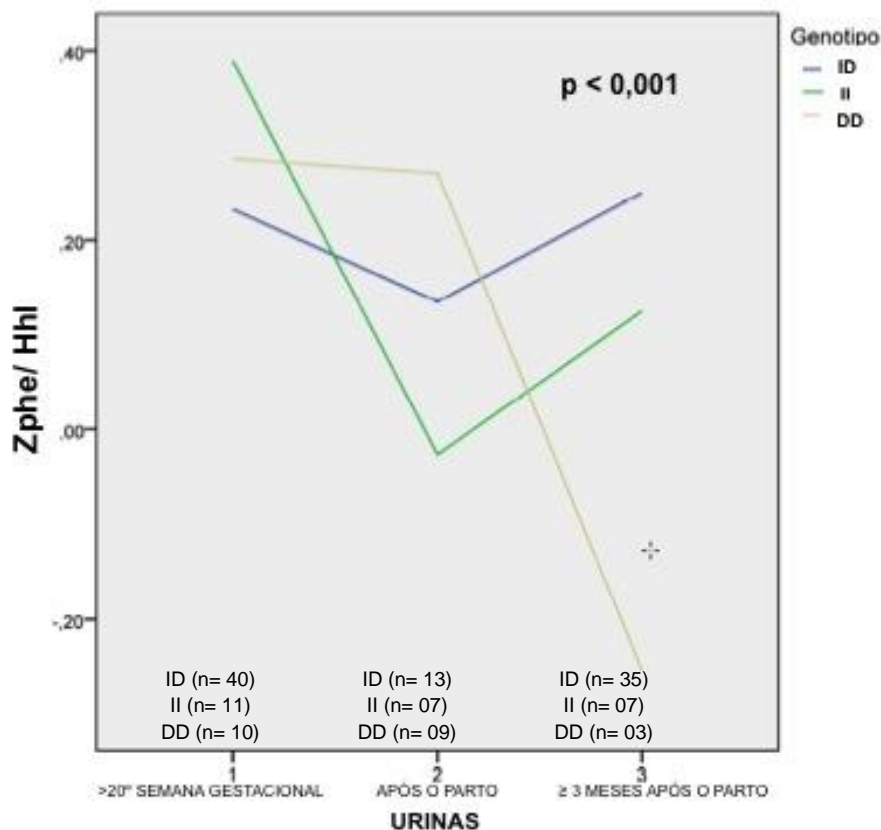
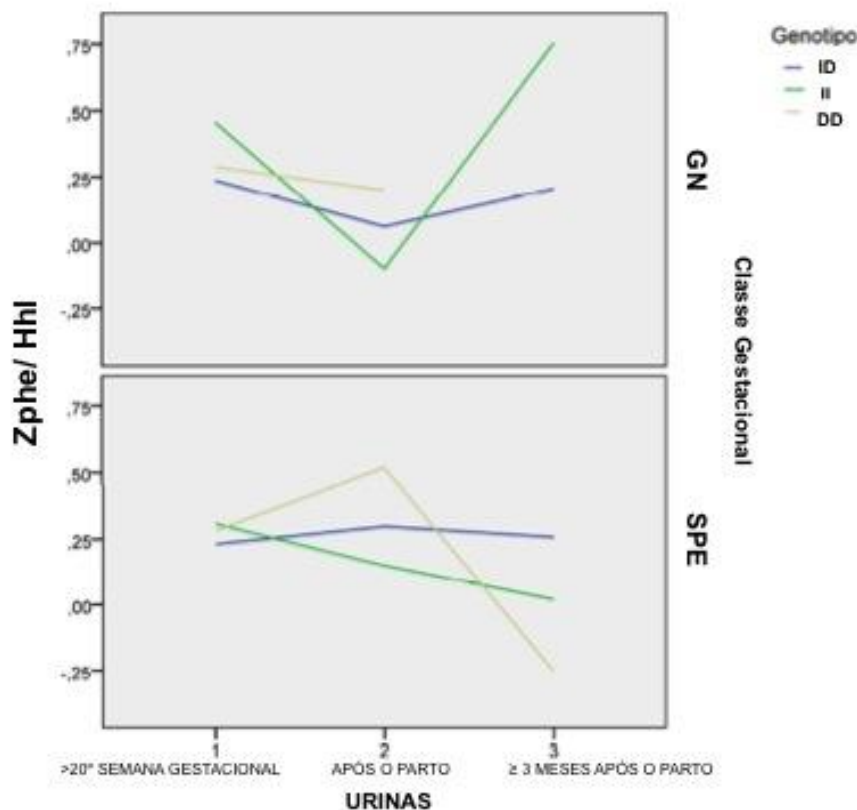


Gráfico 7: Razão das médias logarítmicas entre as atividades de ZPhe e Hhl em relação aos genótipos da ECA nos três momentos estudados.



De acordo com o Gráfico 8, é possível observar o comportamento dos genótipos em relação à razão das atividades enzimáticas ZPhe e Hhl em cada grupo gestacional separadamente, demonstrando que a atividade no grupo GN que possui genótipo II eleva-se muito no pós-parto, enquanto que no grupo SPE esta razão decai. Esta queda é mais acentuada ainda nas gestantes SPE, DD. A linha interrompida refere-se aos dados com número insuficiente de gestantes para análise estatística.

Gráfico 8: Razão das médias logarítmicas das atividades enzimáticas de ZPhe e Hhl em relação aos genótipos da ECA, nos três momentos estudados, dos grupos gestacionais



(GN: n= 10 ID, 6 II, 7 DD. SPE: n= 30 ID, 6 II, 3 DD)

O histórico familiar de hipertensão relacionado com a classe gestacional (GN ou SPE), não foi estatisticamente significativo ($p=0,23$; Teste Qui Quadrado). Assim como, a etnia dessas gestantes não apresentou associação com a classe gestacional, nem com os genótipos da ECA ($p= 0,67$ e $p= 0,56$ respectivamente, Teste Qui-Quadrado).

A análise do polimorfismo proteico descrito no item 3.6.4 não foi executada neste estudo devido a problemas na realização do procedimento, impedindo a visualização bem definida das bandas de 65, 90 e 190 kDa no gel. A verificação deste problema está sendo conduzida pelo grupo de pesquisa colaborador da UNIFESP através da revisão do método. O tamanho amostral obtido no presente estudo influenciou na decisão de não utilizar as amostras urinárias (apresentam pouco volume) nos testes de ajuste da técnica. Neste sentido, esta etapa do projeto permanecerá pendente. Por ocasião do curso de doutorado da mestranda, teremos

tempo hábil para solucionar esta limitação junto da Profa Dra Dulce Casarini. Paralelamente, as coletas de gestantes continuam para que o tamanho amostral seja aumentado.

5. DISCUSSÃO

Pré-eclâmpsia, doença com alta incidência de morte materna, principalmente em países em desenvolvimento, vem sendo investigada há séculos, a fim de melhor compreender seus mecanismos fisiopatológicos e, com isso obter um biomarcador sensível e específico para seu diagnóstico. Então, através de uma parceria com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Dulce E. Casarini, questionou-se a possibilidade de analisar a isoforma 90 kDa da ECA, marcador de hipertensão, nas Doenças Hipertensivas Gestacionais, e assim verificar a expressão e comportamento dessa molécula nessa população, já que não foram encontrados dados científicos sobre esse tema, conforme revisão bibliográfica.

Deste modo, neste projeto, gostaríamos de mostrar a relação entre os genótipos (II, ID, DD), a atividade enzimática dos substratos ZPhe e Hhl e o polimorfismo proteico da ECA (isoformas 90 e 65 kDa) em gestantes com PE, uma das principais doenças hipertensivas gestacionais. Infelizmente, não foi possível associar os dados obtidos com a isoforma 90 kDa da ECA, marcador de hipertensão, mas assim que os problemas relacionados a execução da técnica do polimorfismo proteico forem solucionados, novas análises serão conduzidas dando continuidade a este trabalho. Os resultados do polimorfismo proteico são de extrema importância para a melhor compreensão desses achados. Somente então poderá ser verificado se há uma relação entre o tipo de genótipo (ID, DD, II) com a expressão da isoforma proteica da ECA, e como é o comportamento da atividade enzimática dessa isoforma nos diferentes momentos do processo gestacional normal e de mulheres que apresentam PE. Assim, quando tivermos todos os resultados disponíveis (polimorfismos genético, proteico e atividade enzimática) e suas correlações, o artigo científico com esses achados será enviado para tentativa de publicação em uma revista de maior impacto.

Devido às condições clínicas das gestantes PEP e PES, já era esperado que a idade gestacional obstétrica e os níveis pressóricos fossem significativamente diferentes entre os grupos ($p < 0,001$); bem como o peso do recém-nascido e da placenta ($p < 0,001$ e $p = 0,030$, respectivamente). Na maior parte das vezes, é necessária a interrupção da gestação em função da patologia. A idade materna, tipo

racial e índices de Apgar 1 e 5 não foram significativos entre os grupos ($p= 0,582$, $p= 0,518$, $p= 0,892$ e $p= 0,425$, respectivamente).

Conforme demonstrado na Tabela 4, não houve diferença estatística entre os grupos gestacionais estudados (GN, PEP e PES) e a história familiar de hipertensão ($p= 0,538$). No entanto, ao analisar a frequência genotípica em relação a essa história familiar, conforme Tabela 5, observou-se que 91% dos genótipos II e 73% dos genótipos ID apresentam essa relação, enquanto que apenas 33% do genótipo DD ($p= 0,017$; Teste exato de Fisher) possuem histórico familiar de hipertensão. Esse dado sugere que o alelo I está envolvido na transmissão das informações genéticas de história familiar de hipertensão. Deste modo, os dados da Tabela 5 estão em conformidade com alguns estudos, inclusive metanálises, que demonstraram que o alelo D não tem relação com as doenças hipertensivas gestacionais, porém possuem relação com as doenças cardiovasculares (GALÃO, et al. 2004; SHAIK, et al. 2011; MORGAN, et al. 1999).

Não houve significância estatística para frequência alélica D e I ($p= 0,958$ e $p= 0,399$, respectivamente), nem da distribuição dos genótipos ID e II ($p= 0,210$ e $p= 0,553$, respectivamente) em relação os grupos gestacionais analisados. No entanto, o genótipo DD apresentou significância estatística, sendo diferente entre os três grupos ($p= 0,048$), porém o tamanho amostral para esta variável é relativamente pequeno, havendo apenas uma amostra representativa no grupo PES e duas no grupo PEP. Novas análises precisam ser realizadas para confirmarem esses achados.

Estratificando os grupos em GN, PEP e PES, não se observou diferença na atividade enzimática de ZPhe (específica para a isoforma 90 kDa da ECA) e Hhl (específica para a isoforma 65 kDa da ECA), entre os grupos analisados. No entanto, obtendo a razão das atividades enzimáticas de ZPhe e Hhl evidenciou-se que o comportamento é diferente entre os três grupos gestacionais, sendo estatisticamente significativo ($p < 0,025$), conforme mostra o Gráfico 2. No grupo PES, a atividade enzimática ZPhe/Hhl mostrou-se alta durante a gestação e no puerpério, decaindo 3 meses após o parto. Enquanto que no grupo PEP, a atividade permaneceu elevada após parto. Esses dados conferem com os representados no Gráfico 4, pois aproximadamente 80% e 70%, respectivamente, das gestantes PES

e PEP possuem genótipo ID, conforme frequência descrita na Tabela 4.

Na prática clínica, as gestantes PEP deixam de manifestar os sintomas clínicos específicos da PE no puerpério, enquanto que as PES permanecem hipertensas. Assim, estima-se que os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão essencial, difiram dos envolvidos na hipertensão transitória presente na PE. Enquanto que no grupo GN, não se sabe como é este comportamento após a gestação, uma vez que a maioria dessas pacientes não retornaram ao ambulatório para coleta da amostra 3 de urina, sendo uma das grandes dificuldades na execução deste projeto, ocasionando perda desses dados.

O polimorfismo genético da ECA, bastante estudado na PE, foi relacionado isoladamente com as atividades enzimáticas de ZPhe e Hhl, não havendo significância estatística. Porém, ao realizar a razão dessas atividades (ZPhe/Hhl), mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$). De acordo com o Gráfico 3, as gestantes que possuem o genótipo DD apresentaram uma queda na atividade enzimática após o parto. Entende-se que durante a gestação, essas mulheres produzem quantitativamente mais isoformas 65 e 90 kDa, apresentando alta atividade e que imediatamente após o parto, tendem a diminuir a síntese dessas isoformas proteicas, por consequência, diminuindo a atividade enzimática. Já, as gestantes que possuem o alelo I (Genótipos ID, II), durante o período gestacional apresentam uma diminuição da síntese proteica dessas isoformas, especialmente as pacientes II, e logo após o parto, essa síntese tende a aumentar sutilmente.

Como o tamanho amostral deste estudo foi relativamente pequeno, optou-se por realizar as mesmas análises, porém subdividindo as amostras em apenas dois grupos: GN e SPE (PEP + PES). Os resultados se mantiveram parecidos com os da análise anterior, representado pelos três grupos gestacionais - GN, PEP, PES.

Deste modo, ao comparamos apenas o grupo GN com o grupo SPE, observou-se, conforme o Gráfico 5, que a atividade enzimática de ZPhe, representada por (A), foi diferente entre os dois grupos, apresentando um valor de P limítrofe, porém não significativo ($p=0,052$). As pacientes GN apresentaram diminuição da atividade enzimática durante a gestação e aumento no puerpério, conforme o esperado. Pois, durante um processo gestacional normal, devido ao

aumento do volume sanguíneo, ocorrem modificações no SRA para compensar os níveis tensionais e assim se manterem normotensas, enquanto que as SPE apresentaram atividade praticamente constante durante o período gestacional, com acentuada diminuição da atividade no puerpério. O mesmo achado foi encontrado quando as amostras foram subdivididas em 3 grupos (GN, PEP, PES).

Ao relacionar a razão das atividades enzimáticas (ZPhe/Hhl) com os polimorfismos genéticos da ECA, houve significância estatística ($p < 0,001$). De acordo com o Gráfico 7, as gestantes que possuem o genótipo DD demonstraram uma atividade enzimática contínua durante a gestação, e imediatamente após o parto, essa tende a diminuir acentuadamente. Já as mulheres com genótipos ID e II, apresentam uma queda da atividade durante o período gestacional, especialmente as do genótipo II, e no puerpério ocorreu um aumento na atividade enzimática. No Gráfico 8, observa-se a diferença da atividade ZPhe/Hhl entre os grupos GN e SPE especialmente nas pacientes que possuem o genótipo II. As mulheres GN possuem uma queda na atividade durante a gestação e um aumento no puerpério. Enquanto que as SPE apresentam um declive da atividade durante a gestação que permanece no puerpério. Demonstrando o mesmo comportamento quando analisado entre os 3 grupos (GN, PEP, PES).

O tamanho amostral utilizado foi um limitador neste estudo. Mais análises precisam ser realizadas, a fim de confirmar os achados encontrados, que sugerem uma diferença entre os mecanismos envolvidos na hipertensão essencial e na hipertensão transitória e espontânea que se manifesta em gestantes com PE.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, conclui-se que o alelo I está associado com a história familiar de hipertensão, assim como aproximadamente 88% e 95%, respectivamente, das gestantes PEP e PES possuem genótipo ID e II. Do mesmo modo, a razão da atividade enzimática para ZPhe e Hhl é diferente durante e após o período gestacional, também apresentando alteração conforme classificação genotípica de cada gestante. Os genótipos que possuem o alelo I, demonstram queda dessa atividade durante a gestação e no puerpério, sendo mais acentuada nas gestantes II, e aumento proeminente três meses após o parto, enquanto que o genótipo DD apresenta atividade praticamente constante durante a gestação e diminuição somente após o parto.

Assim, os dados sugerem que os mecanismos envolvidos na hipertensão essencial são diferentes dos envolvidos na hipertensão espontânea e transitória presente na PE, e que de algum modo, o processo gestacional pode influenciar no comportamento dos genes da ECA. Estando o alelo I inativado ou silenciado durante a gestação, provavelmente ocorreria diminuição da expressão proteica das isoformas 65 e 90 kDa da ECA, de modo a reduzir sua atividade enzimática, sendo o mesmo ativado após o puerpério, enquanto que o alelo D parece estar silenciado durante a gestação e inativado após o puerpério.

A expectativa é de que a análise do polimorfismo proteico da ECA traga conclusões mais específicas para esses achados; novos testes precisam ser realizados com uma amostragem maior, a fim de confirmar e melhor compreender os resultados.

7. REFERÊNCIAS

ALLEN, R. E. et al. Abnormal blood biomarkers in early pregnancy are associated with preeclampsia: a meta-analysis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.182C, p.194-201, 2014.

BERG, C. J. et al. Overview of maternal morbidity during hospitalization for labor and delivery in the United States: 1993-1997 and 2001-2005. **Obstet Gynecol**, v. 133, n. 5, p. 1075-1081, 2009.

BODNAR, L. M. et al. Inflammation and triglycerides partially mediate the effect of prepregnancy body mass index on the risk of preeclampsia. **Am J Epidemiol**, v. 162, n.12, p. 1198-1206, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p. 248-254, 1976.

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., p. IX-XIV, 2001.

CASARINI, D. E. et al. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. **Int J Biochem Cell Biol**, v.33, n. 1, p. 75-85, 2001.

CHEN, Z. et al. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and risk of pregnancy hypertensive disorders: a meta-analysis. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.13, n. 1, p. 184-195, 2012.

DAVIS, G. K. et al. Predicting transformation from gestational hypertension to preeclampsia in clinical practice: a possible role for 24 hour ambulatory blood pressure monitoring. **Hypertens Pregnancy**, v.26, n.1, p. 77-87, 2007.

DEMAND, N. Birth, Death and Motherhood in Classical Greece. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, xx + 276, 1994.

DULEY, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. **Seminars in Perinatology**. WB Saunders, p. 130-137, 2009.

EVANS, A. E. et al. Polymorphisms of the angiotensin-converting-enzyme gene in subjects who die from coronary heart disease. **Q J Med**, v. 87, n. 4, p. 211-214, 1994.

FERREIRA, A. J. et al. Angiotensin-(1-7)/angiotensin-converting enzyme 2/mas receptor axis and related mechanisms. **Int J Hypertens**, p. 690-785, 2012.

FRIEDLAND, J., SILVERSTEIN, E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. **Am J Clin Pathol**, v. 66, n.2, p. 416-424, 1976.

FYHRQUIST, F., SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med** **264**, v.3, p. 224-236, 2008.

GALÃO, A. O. et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, n. 3, p. 821-824, 2004.

GILBERT, J. S. et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.294, n.2, p. 541-550, 2008.

JACKSON, A. et al. Effect of the angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism on the risk of venous thromboembolism. **Br J Haematol**, v.111, n. 2, p. 562-564, 2000.

KARUMANCHI, S. A. et al. Preeclampsia: a renal perspective. **Kidney Int**, v.67, n.6, p. 2101-2113, 2005.

KHAN, K. S. et al. "WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review." **Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1066-1074, 2006.

KRAUSPENHAR, B. et al. Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa Isoform: Biomarker for Diagnosis of Preeclampsia? **Medical Hypotheses**, v.83, n. 5, p. 526-529, 2014.

LAEMMLI, U. K. et al. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. **J Mol Biol**, v. 49, n. 1, p. 99-113, 1970.

LEVINE, R. J. et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 7, p. 672-83, 2004.

LINDHEIMER, M. D. T. S., CUNNINGHAM, F. G. ASH position article: Hypertension in pregnancy. **J Am Soc Hypertens**, v.2, p. 484–9, 2008.

LOWE, S. A. et al. Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008." **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v.49, n.3, p. 242-246, 2009.

LYKKE, J. A. et al. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. **Hypertension**, v.53, n.6, p. 944-951, 2009.

MAGEE, L. A. et al. Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. **J Obstet Gynaecol Can**, v.30, n.3, S. 1-48, 2008.

MALUF-MEIKEN, L. C. et al. N-domain isoform of Angiotensin I converting enzyme as a marker of hypertension: populational study. **Int J Hypertens**, P. 581-780, 2012.

MARQUES, G. D. et al. N-domain angiotensin I-converting enzyme with 80 kDa as a possible genetic marker of hypertension. **Hypertension**, v.42, n. 4, p. 693-701, 2003.

MASUYER, G. et al. Molecular recognition and regulation of human angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity by natural inhibitory peptides. **Sci Rep**, v.2, p. 717, 2012.

MCDONALD, S. D. et al. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. **Am Heart J**, v.156, n.5, p. 918-930, 2008.

MORGAN, L. F. et al. Angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. **J Hypertens**, v. 17, n. 6, p. 765-8, 1999.

MUTZE, S. et al. Genes and the preeclampsia syndrome. **J Perinat Med**, v.36, n.1, p. 38-58, 2008.

NEVES, L. A. et al. ACE2 and ANG-(1-7) in the rat uterus during early and late gestation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.294, n. 1, p. 151-161, 2008.

ODEGARD, R. A. et al. Preeclampsia and fetal growth. **Obstet Gynecol**, v.96, n.6, p. 950-955, 2000.

PIQUILLOUD, Y. et al. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. **Biochim Biophys Acta**, v. 206, n.1, p. 136-142, 1970.

RANA, S. et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. **Hypertension**, v. 50, n. 1, p.137-42, 2007.

REDMAN, C. W. Immunology of preeclampsia. **Semin Perinatol**, v.15, n.3, p. 257-262, 1991.

REDMAN, C. W. Preeclampsia: a multi-stress disorder. **Rev Med Interne**, v.32, n.2, S. 41-44, 2011.

REDMAN, C. W., SARGENT, I. L. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. **Semin Nephrol**, v.24, n.6, p. 565-570, 2004.

REDMAN, C. W., SARGENT, I. L. Immunology of pre-eclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v.63, n.6, p. 534-543, 2010.

Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 1, S. 1-S22, 2000

RIGAT, B. et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J Clin Invest**, v.86, n. 4, p. 1343-1346, 1990.

ROBERTS, C. L. et al. Population-based trends in pregnancy hypertension and pre-eclampsia: an international comparative study. **British Medical Journal Open**, 2011.

ROBERTS, J. M., HUBEL, C. A. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. **Placenta**, v.30, S. 32-37, 2009.

RONCHI, F. A. et al. N-domain angiotensin-converting enzyme isoform expression in tissues of Wistar and spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 23, n. 10, p. 1869-78, 2005.

SCHROEDER, B. M. ACOG practice bulletin on diagnosing and managing preeclampsia and eclampsia. American College of Obstetricians and Gynecologists. **Am Fam Physician**, v.66, n.2, p. 330-331, 2002.

SHAH, D. M. The role of RAS in the pathogenesis of preeclampsia. **Curr Hypertens Rep** 8, v.2, p. 144-152, 2006.

SIBAI, B. M. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v.102, n.1, p. 181-192, 2003.

SHAIK, A. P. et al. A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women. **J Obstet Gynaecol**, v.31, n. 7, p. 603-607, 2011.

STEEGERS, E. A. et al. Pre-eclampsia. **Lancet**, v.376, n.9741, p. 631-644, 2010.

TEIXEIRA, A. M. et al. Association of urinary 90 kDa angiotensin- converting enzyme with family history of hypertension and endothelial function in normotensive individuals. **Braz J Med Biol Res.**, v. 41, n. 5, p. 351-6, 2008.

TUFFNELL, D. J. et al. The management of severe preeclampsia/eclampsia, guideline number 10(A). London: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2006.

UEDA, S. et al. Mistyping of the human angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: frequency, causes and possible methods to avoid errors in typing. **J Mol Endocrinol**, v.17, n. 1, p. 27-30, 1996.

VERLOHREM, S. et al. New gestational phase-specific cutoff values for the use of the soluble fms-like tyrosine kinase-1/placental growth factor ratio as a diagnostic test for preeclampsia. **Hypertension**, v.63, n. 2, p. 346-52, 2014.

VIKSE, B. E. et al. Previous preeclampsia and risk for progression of biopsy-verified kidney disease to end-stage renal disease. **Nephrol Dial Transplant**, v.25, n.10, p. 3289-3296, 2010.

YANG, J. et al. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia: genetic polymorphisms and microRNA. **J Mol Endocrinol**, v.50, n. 2, p. 53-66, 2013.

YOUNG, B. C., LEVINE, R. J., KARUMANCHI, S. A. Pathogenesis of preeclampsia. **Annu Rev Pathol**, v.5, p. 173-192, 2010.

ZHONG, W. G. et al. Meta analysis of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism as a risk factor for preeclampsia in Chinese women. **Genet Mol Res**, v. 11, n. 3, p. 2268-2276, 2012.

ANEXO 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA: ENFOQUE NA GESTAÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL

TCLE aprovado pelo CEP em 31/05/2005 (OF N° 440/05)-CEP e aprovado pelo CONEP registro 11972

Pesquisadores Responsáveis: Bartira Ercília Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos Otávio L d'Avila, Ivan Carlos Ferreira Antonello, João Piffero Steibel.

Entrevistador da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da paciente: _____

SOBRE A PESQUISA: A presente linha de pesquisa avalia aspectos da gravidez, como pressão sanguínea e pressão alta na busca do aumento do conhecimento, alívio do sofrimento e melhora da saúde de mulheres e crianças. Esta Linha de Pesquisa é parte do Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina e do Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Nos estudos serão avaliados diversos aspectos que podem influenciar na doença, tais como: marcadores presentes no sangue, na urina, na placenta ou em tecidos; função dos vasos sanguíneos; função das células; função de órgãos, como os rins; sensibilidade gustativa ao sal; e fatores genéticos.

A idéia é estudar fatores que possam ser importantes para a ocorrência da doença pré-eclâmpsia, que é a elevação da pressão arterial na gestação com perda de proteína na urina. Estes testes poderão ajudar a diagnosticar as pessoas em risco ou com esta condição, ou eventualmente auxiliar na formulação de novos tratamentos.

O QUE SERÁ FEITO: Você será convidada para uma entrevista com um dos membros da equipe de pesquisa. O pesquisador lhe dirá de que se trata a linha de pesquisa e o estudo que está sendo oferecido. Então será perguntado se deseja participar da pesquisa.

Caso concorde, após assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, serão perguntados dados de sua história médica, coletado um volume de sangue venoso e urina antes e depois do parto, além das coletas dos exames de rotina. Alguns dos estudos desta linha de pesquisa avaliam outros aspectos e também poderá ser coletado amostra de sangue do cordão umbilical após o parto e amostra da placenta, e/ou avaliação da função dos vasos por ecografia, e/ou medida da sensibilidade gustativa ao sal. Em alguns estudos, são avaliados a presença de marcadores genéticos. Os genes a serem estudados são extraídos do sangue ou da placenta, tentando identificar especificamente os possíveis causadores desta doença. Após o parto você poderá ser convidada a realizar acompanhamento clínico com o grupo no ambulatório Nefrologia. Este grupo atende e acompanha pacientes com hipertensão arterial sistêmica, doença hipertensiva da gestação (entre elas pré-eclâmpsia). As mulheres que desenvolvem complicação durante a gestação, têm um maior risco de doenças vasculares no futuro. A idéia do grupo é de acompanhar estas mulheres, a longo prazo, com a finalidade de observar a evolução, detectar fatores de risco ou sinais de doença, encaminhando a prevenção e/ou tratamento destes. Meses após o parto, poderá ser solicitado um exame de cintilografia renal que visa detectar a presença de cicatrizes no rim de mulheres em risco (cicatrizes são mais comuns em mulheres que desenvolveram hipertensão na gestação). Estas avaliações não interferirão nas suas avaliações e cuidados rotineiros.

O material biológico da pesquisa será coletado e congelado até a análise pelos colaboradores do Laboratório de Nefrologia da PUCRS. Os resultados serão publicados em revistas de circulação no meio médico e em congressos.

Para que os estudos possam ser realizados, é necessário que você faça a opção autorizando ou não a coleta dos diferentes materiais ou realização dos exames:

Rúbrica Pesquisador

Rúbrica da paciente ou responsável

Acompanhamento ambulatorial: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Urina: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Placenta: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Sangue: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Sangue do Cordão Umbilical: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Ecografia dos vasos: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Análise genética: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Cintilografia renal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
Sensibilidade Gustativa ao Sal: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

*OBS.: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo.

MATERIAL EM ESTUDO E ARMAZENAMENTO: O material poderá ser utilizado apenas para esta pesquisa, ou também ser armazenado para emprego em futuros estudos. É necessário que você faça a opção autorizando ou não o armazenamento para emprego futuro: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Se houver possibilidade de fazermos novas análises com o material coletado, será novamente solicitada a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa para realizar a avaliação adicional. Os estudos são desenvolvidos de forma anônima. Os resultados da pesquisa estarão disponíveis a você em qualquer momento por qualquer motivo. Questionamos se você gostaria de ser comunicada sobre o resultado do estudo. É necessário que você faça a opção escrevendo SIM ou NÃO: _____ QUERO SABER DO RESULTADO DA PESQUISA.

RISCOS E BENEFÍCIOS: Os riscos ou desconfortos dessa pesquisa são considerados mínimos. Este estudo não lhe trará nenhum tipo de discriminação individual ou coletiva. A presente pesquisa se propõe a colaborar com o conhecimento sobre a gestação e suas doenças relacionadas com o controle da pressão arterial, não trazendo benefícios diretos para as pacientes participantes.

LIBERDADE: A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária e você pode desistir a qualquer momento, sem prejuízo do tratamento e sem a necessidade de explicar o motivo.

Eu, _____, fui informada pelo(a) _____, dos objetivos e justificativas dessa pesquisa de forma bem clara e detalhada. Recebi informações sobre cada passo que estarei envolvida. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza, e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Estou ciente que as informações por mim fornecidas serão mantidas em segredo e usadas somente conforme opção acima. Fui informada que se existirem danos a minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização, conforme estabelece a lei. Também sei que não terei nenhum custo que seja relacionado à pesquisa.

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (51) 99333993, 33128537, ou 3320 3000 - Ramais 3174 ou 2344, para qualquer dúvida como participante deste estudo. Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Paciente ou Responsável
CI

Investigador
CI/CRM

***EQUIPE PARTICIPANTE:** Bartira E. Pinheiro da Costa, Bruna Krauspenhar, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Domingos d'Avila, Ivan Antonello, João Steibel, Marta Hentschke.

ANEXO 2- Ficha Consulta Inicial

HOSPITAL SÃO LUCAS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

AMBULATÓRIO DE DOENÇAS HIPERTENSIVAS

FICHA CONSULTA INICIAL

IDENTIFICAÇÃO

CASO Nº: _____ REGISTRO: _____ DATA DA CONSULTA: ____/____/____

NOME COMPLETO: _____

DN: ____/____/____ SEXO: 1. Masculino 2. Feminino

COR: 1. Negra 2. Branca 3. Mista

PROFISSÃO: _____

ESTADO CIVIL: 1. Com companheiro(a) 2. Sem companheiro(a)

ESCOLARIDADE: 1. Não estudou 4. 2º grau incompleto 6. 3º grau incompleto

2. 1º grau incompleto 5. 2º grau completo 7. 3º grau completo 3. 1º grau completo

ENDEREÇO RESIDENCIAL: _____ FONE: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP.: _____

ENDEREÇO PROFISSIONAL: _____ FONE: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP.: _____

NOME DE PARENTE/AMIGO: _____

ENDEREÇO RESIDENCIAL: _____ FONE: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP.: _____

DADOS DE HISTÓRIA

01. O paciente sabe ter pressão alta? 1. Sim 2. Não (*vá para a pergunta 24 se paciente for ♀ e 30 se for ♂*)

02. Em caso afirmativo, como soube?

1. Médico 4. Medidores de rua/supermercado 7. Outros: _____

2. Enfermeiro/auxiliar 5. Suspeita ter 9. Não se lembra
3. Banco de sangue 6. Pré-natal

03. Com que idade foi diagnosticado pressão alta? _____ anos

Se paciente for ♂ vá para a pergunta 19.

04. Em caso de doença hipertensiva na gestação atual ou recente (puerpério), desde quando sabe ter press alta?

1. Antes da gestação 3. Após a 20ª semana de gestação
2. Antes da 20ª semana de gestação 8. Não se aplica

05. História da gestação atual: Idade gestacional: _____ sem. (DUM) _____ sem. (Eco com _____ sem.)

Pré-natal: 1. Sim 2. Não

8. Não se aplica

06. Puerpério: 1. Sim 8. Não se aplica (*Vá para a pergunta 17*)

Dados do parto: Data: _____/_____/_____

07. Idade gestacional no parto: _____ sem. (DUM) _____ sem. (Eco com _____ sem.)

08. Tipo de parto: 1. Normal 2. Cesáreo. Causa _____

09. Amamentação: 1. Sim 2. Não

Dados do RN:

10. Gênero: 1. Masculino 2. Feminino

11. 1. Natimorto 2. Nativivo

12. Idade gestacional pediátrica: _____ sem

13. APGAR: _____ / _____ 14. 1. PIG 2. AIG 3. GIG

15. Peso do RN: _____ g 16. Peso da placenta: _____ g

17. A paciente teve pressão alta durante alguma gravidez?

1. Sim 2. Não

8. Não se aplica 9. Não sabe

18. A paciente permaneceu com a pressão alta após a gestação?

1. Sim 2. Não 8. Não se aplica 9. Não sabe

19. Que medicamentos para a pressão alta está usando?

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____

20. Que medicamentos usou anteriormente para a pressão?

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____

21. Assinale os motivos para o abandono:

1. Efeitos adversos 4. O médico mandou parar 8. Não se aplica
 2. Achou que estava curado 5. Achou que a pressão baixou demais 9. Não se lembra
 3. Custo 6. Gestação 10. Outro: _____

22. Houve recomendação de tratamento não-farmacológico prévio?

1. Não houve 5. Diminuir sal da comida 11. Parar anticoncepcional hormonal
 2. Parar de fumar 6. Diminuir as gorduras animais 12. Outra: _____
 3. Diminuir as bebidas 7. Diminuir o peso 8. Não se aplica
 4. Fazer exercícios 10. Aumentar ingestão de frutos/verduras 9. Não se lembra

23. Quais das medidas recomendadas o paciente segue?

1. Não houve 5. Diminuir sal da comida 11. Parar anticoncepcional hormonal
 2. Parar de fumar 6. Diminuir as gorduras animais 12. Outra: _____
 3. Diminuir as bebidas 7. Diminuir o peso 8. Não se aplica
 4. Fazer exercícios 10. Aumentar ingestão de frutos/verduras 9. Não se lembra

13. Nenhuma

Se paciente for ♂ vá para a pergunta 30.

24. A paciente já esteve grávida? 1. Sim 2. Não
25. Quantas vezes? 1. _____ 8. Não se aplica
26. Quantos filhos nasceram vivos? 1. _____ 8. Não se aplica
27. A paciente faz ou fez anticoncepção? 1. Sim 2. Não (*Vá para a pergunta 30*) 8. Não se aplica
28. Que método emprega ou empregou?
1. Tabela 3. Pílula: _____ 5. Diafragma
2. Camisinha 4. DIU 6. Outro: _____
29. Se usa ou usou pílula, por quanto tempo (desconte interrupções) ? _____ anos
- Ano de início: _____
30. Revisão de sistemas (sintomas):
1. Visão: _____ 2. _____
- Coração: 1. Precordialgia 2. Palpitações 3. Dispnéia 4. _____
3. Rim: 1. Hematúria 2. Proteinúria 3. _____
4. Cérebro: _____
31. Na família biológica do paciente tem alguém com pressão alta?
0. Ninguém 2. Mãe 4. Tios 6. Filhos 8. Não se aplica
1. Pai 3. Irmãos 5. Avós 7. Primos 9. Não sabe
32. Na família biológica alguém teve provável infarto do miocárdio, AVC ou morte súbita antes dos 60 anos?
0. Ninguém 2. Mãe 4. Tios 6. Filhos 8. Não se aplica
1. Pai 3. Irmãos 5. Avós 7. Primos 9. Não sabe
33. Na família biológica alguém teve provável pressão alta na gravidez?
0. Ninguém 2. Tias 4. Avós 8. Não se aplica
1. Mãe 3. Irmãs 5. Primas 9. Não sabe
34. O paciente fuma? 1. Sim 2. Não 3. Não fuma mais, parou há _____ meses _____ anos
35. O paciente tem alguma atividade física regular?
1. Não tem atividade 3. Corre regularmente 5. Outra: _____
2. Caminha regularmente 4. Tem atividade física associada ao trabalho

36. O paciente costuma tomar bebidas alcoólicas? 1. Sim 2. Não

37. O paciente usa saleiro na mesa? 1. Sim 2. Não

38. Anote outros diagnósticos estabelecidos anotados no prontuário:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	__/__/__	_____	4. _____	__/__/__	_____
2. _____	__/__/__	_____	5. _____	__/__/__	_____
3. _____	__/__/__	_____	6. _____	__/__/__	_____

39. Anote outras doenças que o paciente refere ter:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	__/__/__	_____	4. _____	__/__/__	_____
2. _____	__/__/__	_____	5. _____	__/__/__	_____
3. _____	__/__/__	_____	6. _____	__/__/__	_____

40. O paciente tem história de infecção urinária de repetição?

1. Sim 2. Não 8. Não se aplica

41. Se sim, quando? 1. Na infância 2. Na idade adulta

42. O paciente tem história de nefropatia do refluxo?

1. Sim 2. Não 8. Não se aplica 9. Não sabe

43. Que outros remédios usa atualmente?

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____

44. Quem é o principal responsável pela renda familiar?

1. O próprio paciente 3. A esposa/companheira 5. Outro: _____

2. O marido/ companheiro 4. Ambos 9. Não sabe

45. A renda familiar mensal estimada em salários mínimos é: _____ salários mínimo

DADOS DE EXAME FÍSICO

46. PRESSÃO ARTERIAL Manguito: _____ cm

Início da consulta: Sentado: **PA MS D:** ____ / ____ mmHg Pé: **PA MS D:** ____ / ____ m

PA MS E: ____ / ____ mmHg **PA MS E:** ____ / ____ mmHg **PA DL E:** ____ / ____ mmHg

Fim da consulta: Sentado: **PA MS D:** ____ / ____ mmHg Pé: **PA MS D:** ____ / ____ mmHg **PA MS E:** ____ / ____ mmHg **PA MS E:** ____ / ____ mmHg **PA DL E:** ____ / ____ mmHg

47. FREQUÊNCIA CARDÍACA: _____ bpm

48. PESO: _____ Kg 49: ALTURA: _____ cm 50: IMC: _____

51. CIRCUNFERÊNCIA BRAQUIAL: _____ cm 52. QUADRIL: _____ cm 53. CINTURA: _____ cm

54. Os pulsos carotídeos são:

1. Normais 2. Com sopro à D 3. Com sopro à E 4. Com sopro bilateral

9. Não examinado

55. Há sopros no pré-córdio?

1. Não há sopros 2. Com sopros 9. Não examinado

56. O ritmo cardíaco é:

1. Regular 2. Irregular, sugere extrassístolia 3. Irregular, sugere fibrilação atrial

4. Irregular inespecífico

57. Há turgência jugular a 45°? 1. Sim 2. Não 9. Não examinado

58. Há edema de membros inferiores?

1. Uma cruz em 4 2. Duas 3. Três 4. Quatro 5. Não há edema

59. Anote as anormalidades de semiologia respiratória:

1. Não há anormalidades 4. Diminuição do MV à E 7. Estertores

2. Aumento do diâmetro AP 5. Sibilos 9. Não examinado

3. Diminuição do MV à D 6. Roncos 10. Outra: _____

60. Há massas palpáveis no abdômen?

1. Não 2. Sim, sugere rins aumentados 3. Sim, sugere baço aumentado

4. Sim, sugere fígado aumentado 5. Sim, outra: _____ 9. Não examinado

61. A aorta é palpável no abdômen?

1. Não 2. Sim, aparentemente normal 3. Sim, sugere dilatação aneurismática

9. Não examinado

62. Há sopros no abdômen?

1. Não 3. Sim, na altura da artéria renal E 5. Sim, sobre as artérias ilíacas

2. Sim, sobre a aorta 4. Sim, na altura da artéria renal D 6. Sim, outra: _____

9. Não examinado

63. Exame dos pulsos periféricos: anote os seguintes códigos:

1. Normais 3. Ausente à E 5. Diminuído à D 7. Diminuídos bilateralmente

2. Ausente à D 4. Ausente bilateralmente 6. Diminuído à E 10. Com sopro (femorais)

Pulso radial: _____

Pulso pedioso: _____

Pulso braquial: _____

Pulso femoral: _____

64. Anormalidades no exame neurológico:

1. Não há alterações 4. Hemiparesia à E 7. Distúrbio de equilíbrio

2. Hemiplegia à D 5. Hemiparesia à D 10. Afasia/disfasia

3. Hemiplegia à E 6. Alterações de sensibilidade 11. Alteração par craneano: _____

12. Outra: _____

65. Anormalidades do fundo de olho:

1. Sem anormalidades 3. Apagamento venoso 5. Exsudatos 7. Edema de papila

2. Estreitamento arteriolar 4. Represamento venoso 6. Hemorragias

RESULTADO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

66. Exame qualitativo de urina:

1. pH: _____

6. Proteinúria: _____ +

2. densidade: _____

7. Glicosúria: _____ +

3. Sem alterações

10. Cilindros granulosos: _____

4. Hematúria: _____ hem p/c

11. Cilindros hialinos: _____

5. Leucocitúria: _____ leuc p/c

12. Cilindros hemáticos: _____

67. Proteinúria/amostra: _____ mg/dL
68. Creatininúria/amostra: _____ mg/dL
69. Prt/Cr: _____
70. Proteinúria / 24 horas: _____ mg/24h
71. Creatinina: _____ mg/dL
72. Potássio: _____ mEq/L
73. Glicemia em jejum: _____ mg/dL
74. Ácido úrico: _____ mg/dl
75. TGO: _____ UI/L
76. TGP: _____ UI/L
77. Colesterol total: _____ mg/dL
78. HDL colesterol: _____ mg/dL
79. LDL colesterol: _____ mg/dL
80. Triglicérides: _____ mg/dL
81. Hematócrito: _____ %
82. Hemoglobina: _____ g/dL
83. Leucócitos: _____ por μ L 1. Desvio à E 2. Desvio à D 3. Sem desvio
84. Plaquetas: _____ por μ L
85. ECG (____/____/____):
86. Rx tórax (____/____/____):

LISTA DE PROBLEMAS

Anotar lesões em órgãos-alvo:

DIAGNÓSTICO	CID
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____
5. _____	_____
6. _____	_____
7. _____	_____
8. _____	_____
9. _____	_____

10.

ANÁLISE

CONDUTA

A. Retorno à consulta em: _____ semanas. _____ mês (es).

B. Encaminhado a outro ambulatório: _____.

C. Tratamento não-medicamentoso recomendado:

- | | |
|--|---|
| 1. Parar de fumar | 5. Aumentar a ingestão de frutos e verduras |
| 2. Tratar a obesidade | 6. Limitar a ingestão de álcool |
| 3. Reduzir gorduras saturadas e carboidratos refinados | 7. Realizar exercícios físicos dinâmicos |
| 4. Reduzir a ingestão de sal | 10. Substituir a anticoncepção hormonal |

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____
4. _____	_____	_____	_____	_____
5. _____	_____	_____	_____	_____

E. Exames solicitados:

- | | |
|---|---|
| 1. <input type="checkbox"/> Exame qualitativo de urina | 9. <input type="checkbox"/> Colesterol total, HDL e LDL |
| 2. <input type="checkbox"/> Proteinúria/amostra e Creatininúria/amostra | 10. <input type="checkbox"/> Hemograma |
| 3. <input type="checkbox"/> Proteinúria/ 24 horas | 11. <input type="checkbox"/> Plaquetas |

4. [] Creatinina

12. [] TSH e T4

5. [] Potássio

13. [] ECG

6. [] Glicemia em jejum

14. [] Rx de tórax

7. [] Ácido úrico

15. [] Ecografia abdominal total

8. [] TGO e TGP

16. [] Cintilografia com DMSA

17. [] Outro: _____

F.Observações:

DATA PREVISTA PARA O RETORNO A CONSULTA: ____/____/____

RESPONSÁVEIS PELA COLETA DOS DADOS BÁSICOS:

ANEXO 3- Ficha Consulta de Retorno

HOSPITAL SÃO LUCAS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

AMBULATÓRIO DE DOENÇAS HIPERTENSIVAS

FICHA CONSULTA DE RETORNO

IDENTIFICAÇÃO

CASO Nº: _____ REGISTRO: _____ DATA DA CONSULTA: ____/____/____

NOME COMPLETO:

DADOS DE HISTÓRIA

01. Intercorrências:

02. Aderência ao tratamento não-medicamentoso: 1. Sim 2. Não

03. Medicamentos em uso:

	NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1.	_____	_____	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____	_____	_____
4.	_____	_____	_____	_____	_____
5.	_____	_____	_____	_____	_____

04. Aderência ao tratamento medicamentoso: 1. Sim 2. Não

DADOS DE EXAME FÍSICO

05. PRESSÃO ARTERIAL Manguito: _____ cm

Início da consulta: Sentado: **PA MS D:** ____ / ____ mmHg Pé: **PA MS D:** ____ / ____ mmHg **PA MS E:** ____ / ____ mmHg **PA MS E:** ____ / ____ mmHg **PA DL E:** ____ / ____ mmHg

Fim da consulta: Sentado: **PA MS D:** _____ / _____ mmHg Pé: **PA MS D:** _____ / _____ mmHg **PA MS E:** _____ / _____ mmHg **PA MS E:** _____ / _____ mmHg **PA DL E:** _____ / _____ mmHg

06. FREQUÊNCIA CARDÍACA: _____ bpm

07. PESO: _____ Kg 08: ALTURA: _____ cm 09: IMC: _____

10. O ritmo cardíaco é:

1. Regular 2. Irregular, sugere extrassístolia 3. Irregular, sugere fibrilação atrial

4. Irregular inespecífico

11. Há turgência jugular a 45°? 1. Sim 2. Não

12. Há edema de membros inferiores?

1. Uma cruz em 4 2. Duas 3. Três 4. Quatro 5. Não há edema

13. Anote as anormalidades de semiologia respiratória:

1. Não há anormalidades 4. Diminuição do MV à E 7. Estertores
2. Aumento do diâmetro AP 5. Sibilos 10. Outra: _____
3. Diminuição do MV à D 6. Roncos

14. Há massas palpáveis no abdômen?

1. Não 3. Sim, sugere fígado aumentado
2. Sim, sugere rins aumentados 4. Sim, sugere baço aumentado
5. Sim, outra: _____

15. A aorta é palpável no abdômen?

1. Não 2. Sim, aparentemente normal 3. Sim, sugere dilatação aneurismática

16. Há sopros no abdômen?

1. Não 3. Sim, na altura da artéria renal E 5. Sim, sobre as artérias ilíacas
2. Sim, sobre a aorta 4. Sim, na altura da artéria renal D 6. Sim, outra: _____

17. Exame dos pulsos periféricos: anote os seguintes códigos:

1. Normais 3. Ausente à E 5. Diminuído à D 7. Diminuídos bilateralmente
2. Ausente à D 4. Ausente bilateralmente 6. Diminuído à E 10. Com sopro (femorais)

Pulso radial: _____

Pulso pedioso: _____

Pulso braquial: _____

Pulso femural: _____

18. Anormalidades no exame neurológico:

1. Não há alterações

4. Hemiparesia à E

7. Distúrbio de equilíbrio

2. Hemiplegia à D

5. Hemiparesia à D

10. Afasia/disfasia

3. Hemiplegia à E

6. Alterações de sensibilidade

11. Alteração par craneano: _____

12. Outra: _____

19. Outras anormalidades:

RESULTADO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

20. Exame qualitativo de urina:

1. pH: _____

6. Proteinúria: _____ +

2. densidade: _____

7. Glicosúria: _____ +

3. Sem alterações

10. Cilindros granulosos: _____

4. Hematúria: _____ hem p/c

11. Cilindros hialinos: _____

5. Leucocitúria: _____ leuc p/c

12. Cilindros hemáticos: _____

21. Proteinúria/amostra: _____ mg/dL

22. Creatininúria/amostra: _____ mg/dL

23. Prt/Cr: _____

24. Proteinúria / 24 horas: _____ mg/24h

25. Creatinina: _____ mg/dL

27. Potássio: _____ mEq/L

28. Glicemia em jejum: _____ mg/dL

29. Ácido úrico: _____ mg/dL

30. TGO: _____ UI/L

31. TGP: _____ UI/L

32. Colesterol total: _____ mg/dL

33. HDL colesterol: _____ mg/dL

34. LDL colesterol: _____ mg/dL

35. Triglicerídeos: _____ mg/dL

36. Hematócrito: _____ %

37. Hemoglobina: _____ g/dL

39. Leucócitos: _____ por μ L

1. Desvio à E

2. Desvio à D

3. Sem desvio

40. Plaquetas: _____ por μ L

41. ECG (___/___/___):

42. Rx tórax (___/___/___) :

43. Ecografia abdominal total (___/___/___) :

44. Cintilografia com DMSA (___/___/___) :

45. Outros:

ANÁLISE

CONDUTA

A. Retorno à consulta em: _____ semanas. _____ mês (es).

B. Encaminhado a outro ambulatório: _____.

C. Tratamento não-medicamentoso recomendado:

1. Parar de fumar

5. Aumentar a ingestão de frutos e verduras

2. Tratar a obesidade

6. Limitar a ingestão de álcool

3. Reduzir gorduras saturadas e carboidratos refinados

7. Realizar exercícios físicos dinâmicos

4. Reduzir a ingestão de sal

10. Substituir a anticoncepção hormonal

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

NOME COMERCIAL	NOME FARMACOLÓGICO	CÓDIGO	DOSE	INTERVALO DE DOSE
1. _____	_____	_____	_____	_____
2. _____	_____	_____	_____	_____
3. _____	_____	_____	_____	_____

4. _____

5. _____

E. Exames solicitados:

- | | |
|---|---|
| 1. <input type="checkbox"/> Exame qualitativo de urina | 9. <input type="checkbox"/> Colesterol total, HDL e LDL |
| 2. <input type="checkbox"/> Proteinúria/amostra e Creatininúria/amostra | 10. <input type="checkbox"/> Hemograma |
| 3. <input type="checkbox"/> Proteinúria/ 24 horas | 11. <input type="checkbox"/> Plaquetas |
| 4. <input type="checkbox"/> Creatinina | 12. <input type="checkbox"/> TSH e T4 |
| 5. <input type="checkbox"/> Potássio | 13. <input type="checkbox"/> ECG |
| 6. <input type="checkbox"/> Glicemia em jejum | 14. <input type="checkbox"/> Rx de tórax |
| 7. <input type="checkbox"/> Ácido úrico | 15. <input type="checkbox"/> Ecografia abdominal total |
| 8. <input type="checkbox"/> TGO e TGP | 16. <input type="checkbox"/> Cintilografia com DMSA |
| 17. <input type="checkbox"/> Outro: _____ | |

F.Observações: _____

ATA PREVISTA PARA O RETORNO A CONSULTA: ____/____/____

RESPONSÁVEIS PELA COLETA DOS DADOS:

ANEXO 4- Parecer de aprovação da CONEP

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Polimorfismos Genético e Proteico da Enzima Conversora de Angiotensina na Síndrome de Pré-eclâmpsia

Pesquisador: Bartira Ercilia Pinheiro da Costa

Área Temática: Área 1. Genética Humana.

(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

Versão: 1

CAAE: 18595113.0.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 364.750

Data da Relatoria: 09/08/2013

Apresentação do Projeto:

Bem claro, completo e organizado.

Objetivo da Pesquisa:

Bem definido e coerente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descrita adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo pertinente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, projeto dá continuidade a projeto maduro já aprovado nesse e outros CEPs.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320--3345

Fax: (513)320--3345

E-mail: cep@pucrs.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL - PUC/RS



Continuação do Parecer: 364.750

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 19 de Agosto de 2013

Assinador por:
caio coelho marques
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681

Bairro:

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)320--3345

Fax: (513)320--3345

E-mail: cep@pucrs.br

ANEXO 5- Artigo publicado

Medical Hypotheses 83 (2014) 526–529



Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy



Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa isoform: Biomarker for diagnosis of preeclampsia? [☆]



Bruna Krauspenhar^{a,*}, Fernando Sontag^a, Fernanda A. Ronchi^b, Dulce E. Casarini^b, Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo^a, Bartira E. Pinheiro da Costa^a

^a Graduate Program in Medicine and Health Sciences (Nephrology), School of Medicine, Institute of Biomedical Research, São Lucas Hospital, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Nephrology Division, Department of Medicine, Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2014

Accepted 10 September 2014

ABSTRACT

Preeclampsia (PE), one of the leading gestational hypertensive diseases, is characterized by increased blood pressure ($\geq 140/90$ mm Hg) and pathological proteinuria after 20 weeks gestation. It is a complex, multifactorial syndrome with an unestablished etiology and cure. The search continues for a biomarker that could assist in the early prediction or diagnosis of PE, reducing the rate of maternal and fetal mortality. Based on the findings of Casarini et al. that suggest the 90 kDa isoform of the Angiotensin Converting Enzyme (ACE) as a possible marker of hypertension, we hypothesized that this isoform may be present in pregnant women with PE, since they present a transient and spontaneous model of systemic arterial hypertension in pregnancy.

We believe, therefore, that pregnant women with pure PE (PPE) express the ACE 90 kDa isoform in urine, as well as having elevated isoform enzymatic activity, during pregnancy only. Postpartum, with the normalization of blood pressure, the protein isoform would no longer be expressed. Pregnant women with superimposed preeclampsia (SPE) would present the ACE 90 kDa isoform both during and after the gestation period, and its enzymatic activity would remain high as they are chronically hypertensive. It is expected that normotensive pregnant women do not present this isoform in their urine as elevated blood pressure levels do not occur. Both normotensive and PPE affected pregnant women with a family history of hypertension, will possibly express the ACE 90 kDa isoform before pregnancy and may become hypertensive, only after some years, through the influence of environmental factors and/or other diseases.

If our hypothesis is confirmed, it will allow differentiation of PPE and SPE sooner than 12 weeks postpartum, which is currently the estimated period for confirmation of the specific diagnosis. Furthermore, it could be an early biomarker for predicting the disease, enabling the physician to choose the best clinical management. In addition, it would minimize the use of other methods as the biological sample for obtaining the marker is urine, a practical and effective test with good reproducibility. Finally, test results would enable a greater understanding of the mechanisms involved in gestational hypertension.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Preeclampsia (PE), is considered one of the leading causes of maternal and fetal morbidity and mortality in the world, affecting around 2–8% of pregnancies [1]. It is characterized by the

presentation of blood pressure levels $\geq 140/90$ mm Hg and proteinuria after 20 weeks gestation [2,3]. PE has been known as “the disease of theories”, mentioned by Lindheimer et al. [4]. Several mechanisms are involved in its pathophysiology, including the involvement of immunologic [5], inflammatory [5,6], renal ischemia [7], and vascular factors, among others [2,8–10]. Although its cure remains unknown, it is recognized that the placenta is directly involved in the syndrome outcome, since its removal results in the disappearance of clinical manifestations [11,12].

International consensus on the best criteria for defining preeclampsia has not yet been reached [3,13–19]. As per guidelines, PE is classified as: preeclampsia – expressed through elevated blood pressure and proteinuria after 20 weeks gestation, with

[☆] Sources of support: Financial support was received from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

* Corresponding author at: Av. Ipiranga, 6690, Hospital São Lucas-PUCRS, 2º andar Laboratório de Nefrologia-IPB, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil. Tel./fax: +55 5133367700.

E-mail address: brukrauspenhar@gmail.com (B. Krauspenhar).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2014.09.009>

0306-9877/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

values returning to normal up to 12 weeks postpartum, and in this text we will refer to as pure PE (PPE); superimposed preeclampsia (SPE) – pregnant women with preexisting chronic hypertension, presenting with or without proteinuria, that exhibit a sudden increase in proteinuria after 20 weeks gestation and continue hypertensive postpartum [3]. The term PE syndrome (PES) has been proposed for circumstances when it is not possible to differentiate between PPE and SPE [20].

Efforts have been made to obtain a sensitive and specific biomarker for early diagnosis of PES, enabling accurate prediction in the first trimester of pregnancy. This would assist in prevention or treatment of the disease, and reduce the rate of maternal and fetal morbidity and mortality. Several molecules have been proposed for assisting in PE diagnosis, however, it is a complex and multifactorial syndrome, and as such, no ideal biomarker has yet been obtained [2,16,21,22].

In recent years, Levine, Karumanchi, Maynard and coworkers have demonstrated the involvement of proangiogenic factors (PlGF-placental growth factor; VEGF-vascular endothelial growth factor) and antiangiogenic factors (sFlt-1-soluble fms-like tyrosine kinase 1 and sEng-soluble endoglin) in the placental process, and are being considered promising for the early risk identification of PE before 34 gestational weeks [23,24]. Currently, the PlGF/sFlt1 ratio has been proposed as one of the best methods for predicting the disease [22].

The renin-angiotensin system (RAS), responsible for the regulation of blood pressure and electrolyte homeostasis, has been actively investigated in PES [25,26]. Studies on the genetic polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE), one of the components of the RAS, demonstrate that the D allele is related to elevated plasma ACE levels, and is strongly associated with cardiovascular diseases [27]. However, the findings concerning ACE genetic polymorphism in PE are contradictory [28–32].

Casarini et al. described the presence of ACE isoforms expressed by molecular weights of 190 and 65 kDa in the urine of normotensive individuals, differing from those with molecular weights of 90 and 65 kDa found in hypertensive patients, which are enzymes known as N-domain ACE isoforms [33]. This finding has been proposed as a urinary marker of hypertension, evaluating the presence of the 90 kDa isoform [34]. Therefore, the involvement of this isoform in the pathophysiology of gestational hypertension is questioned herein.

Hypothesis

It is hypothesized that the 90 kDa protein ACE isoform is present in the urine of pregnant women with SPE, before and after pregnancy. Its enzymatic activity is raised during the gestation period, and remains postpartum as the patient continues to be hypertensive.

In pregnant women with PPE its expression occurs only during the gestational period, except in women with a family history of hypertension. It is assumed that the enzymatic activity of the isoform is increased during pregnancy and normalizes postpartum.

Normotensive pregnant women with no family history of hypertension do not express the 90 kDa ACE isoform during and after the gestational period, and therefore, would have no enzymatic activity as no increase in blood pressure levels takes place.

Evolution of the hypothesis

90 kDa isoform – a biomarker of hypertension

The presence of the 65 kDa and 190 kDa (somatic ACE) isoforms have been described in the urine of normotensive rats and humans, while the 90 (N-domain ACE) and 65 kDa isoforms have been encountered in the urine of hypertensive rats and humans, and in normotensives with a family history of hypertension. According to these studies, the 90 kDa ACE isoform may contribute to the early diagnosis of hypertension, assisting in the prevention of cardiovascular diseases [33–38].

PES, characterized as a spontaneous and transient human model of hypertension in pregnancy, is a multisystem disorder that has great impact on maternal and fetal health [39]. In line with the scientific literature, and based on the assumption that the 90 kDa ACE isoform is associated with essential hypertension [33–36], our hypothesis is formed of the following possibilities, as illustrated in Fig. 1:

- Normotensive pregnant women: we believe they do not present the 90 kDa ACE isoform during and after pregnancy as they maintain normal blood pressure levels. However, women with a family history of systemic arterial hypertension may express the 90 kDa ACE isoform in their urine and may become hypertensive in the future, influenced by various environmental factors or diseases. It is, therefore, supposed that the enzymatic activity of the 90 kDa ACE isoform is null during the gestational period, since it is not present in normotensive women with no family history of hypertension.
- Pregnant women with PPE: we believe they present the 90 kDa ACE isoform during pregnancy due to increased blood pressure, with the isoform no longer being expressed in the urine postpartum as blood pressure levels return to normal. In cases where women have a family history of hypertension, they may have protein expression before pregnancy, evolving to PE and then normalizing their clinical condition after delivery. These women can become hypertensive in the future due to external factors or other diseases. Thus, the enzymatic activity

	NORMAL PREGNANCY		PURE PREECLAMPSIA		SUPERIMPOSED PREECLAMPSIA	
	Gestation	Postpartum	Gestation	Postpartum	Gestation	Postpartum
	90 kDa	X	X	90 kDa	X	90 kDa
Enzyme Activity	∅	∅	↑	∅	↑	↑

∅ : null; ↑ : elevated; X : absent.

Fig. 1. Enzyme activity and Angiotensin Converting Enzyme 90 kDa isoform in the urine of normal pregnant and women with preeclampsia.

of the 90 kDa ACE isoform in patients with no history of systemic arterial hypertension should be increased during the gestational period, disappearing in the puerperium.

- Pregnant women with SPE: these women must already express the 90 kDa ACE isoform in their urine as they are chronically hypertensive. Therefore, this group would present expression of this isoform before and after pregnancy due to essential hypertension. The same should occur with enzyme activity, with it remaining increased during and after the gestational period.

A comparative study should be conducted between pregnant women, normotensive and with PES, and being more than 20 weeks pregnant, in order to evaluate the association between the protein polymorphism of ACE and the PPE and SPE classes. The same is applicable for the activity of this enzyme in the urine, as proposed in Fig. 1. This experimental design, associated with the results connected to our hypothesis, would differentiate between PPE and SPE in the immediate postpartum period, something that is normally done 12 weeks after delivery when the hypertension present in SPE does not disappear. In this way, the patient with SPE would have early confirmation of the diagnosis of essential hypertension, emphasizing the importance of maintaining permanent follow-up. In addition, the results would make it possible to detect if the mechanisms involved in essential hypertension are the same as in gestational hypertension.

Pregnant women are, in general, young ladies who are at a reproductive age and do not suffer from chronic diseases, such as hypertension. After delivery, they are inclined to not adhere properly to clinical monitoring. Therefore, the diagnosis of PPE by the biomarker proposed in Fig. 1, would suggest a differentiated clinical management for patients with SPE, showing the importance of controlling blood pressure levels through occasional medical follow-up, since they would have been warned of the relevance of this monitoring. It is reported that women with PE show greater risk of manifesting cardiovascular and renal disease in the future [40–42].

The presence of the 90 kDa ACE isoform and the increase in the ACE enzymatic activity in the postpartum period of women with PPE, suggests a family history of hypertension. This would indicate the same medical management as that given to women who do not present 90 kDa ACE isoform after delivery.

Urinary detection of the 90 kDa ACE isoform

In order to confirm our hypothesis and based on the experimental methods used by Casarini et al. [34,38], two urine collections should be made from pregnant women with PES, to analyze the presence and enzymatic activity of the 90 kDa ACE isoform: the first sample after 20 weeks gestation, and the second within 12 weeks after delivery.

It would be interesting to analyze studies comparing genetic polymorphism with protein polymorphism and the enzymatic activity of ACE isoforms in urine, to observe whether there is correlation between these results. Once the gene is activated, it produces a protein by as yet unknown mechanisms, which creates different isoforms in normotensive and hypertensive individuals, giving contrasting measurements of enzymatic activity. These results could help in understanding this gene-protein-enzyme activity route. Meanwhile, the findings related to the genetic polymorphism of ACE in PE results in different data. Perhaps this contradiction is based on the analysis of distinct populations, with them having differing ethnic and genetic characteristics [28–32].

Enzyme activity of the 90 kDa isoform

The enzymatic activity of ACE isoforms is an additional analysis to confirm the presence of these proteins in urine, through their

measurement using two substrates: Hippuryl-His-Leu (HHL) [39] to quantify the somatic ACE with 190 kDa and Z-Phe-His-Leu (ZPhe-HL) [43,44] to quantify the 90 and 65 kDa N-domains isoforms, as outlined in a technique by Casarini et al. [34,38]. Determining the ZPhe-HL/HHL activity ratio indicates the highest quantity/activity of the N-domain isoform (90/65 kDa).

Consequences of the hypothesis and discussion

Many studies have been performed in an attempt to find a biomarker that may assist in the diagnosis of PE; enabling the physician to choose the best clinical practice for the welfare of the patient, and preventing serious progression of the pathological condition. However, to date, many of the proposed molecules have proven not accurate or sensitive enough in predicting the disease. The use of urine as the biological sample for the detection of the 90 kDa ACE isoform would be a low-cost, highly reproducible and effective clinical examination. All patients could have access to this clinical analysis. An ideal biomarker should be one that is not obtained through invasive methods and should be practical, effective and sensitive. Thus, if the results confirm our hypothesis, the 90 kDa ACE isoform may be an excellent biomarker for the specific diagnosis of PE.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest in relation to financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence this work.

Acknowledgments

The nephrology Laboratory have support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul). C.E. Poli-de-Figueiredo and D.E. Casarini are CNPq researcher.

References

- [1] Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 2009;33(3):130–7 [Epub 2009/05/26].
- [2] Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 2010;5:173–92 [Epub 2010/01/19].
- [3] Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(1):S1–S22 [Epub 2000/08/02].
- [4] Lindheimer MD, Cunningham FG, Roberts JM. Chesley's hypertensive disorders in pregnancy. Stamford: Appleton & Lange; 1998. p. 3–41. Cap. 1.
- [5] Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia and the systemic inflammatory response. *Semin Nephrol* 2004;24(6):565–70 [Epub 2004/11/06].
- [6] Redman CW. Preeclampsia: a multi-stress disorder. *Rev Med Interne* 2011;32(Suppl. 1):S41–4 [Epub 2011/05/03].
- [7] Kincaid-Smith P. The renal lesion of preeclampsia revisited. *Am J Kidney Dis* 1991;17(2):144–8.
- [8] Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;294(2):H541–50 [Epub 2007/12/07].
- [9] Maynard SE, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011;31(1):33–46 [Epub 2011/01/27].
- [10] Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161(5):1200–4 [Epub 1989/11/01].
- [11] Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta* 2009;30(Suppl. A):S32–7 [Epub 2008/12/17].
- [12] Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357(9249):53–6 [Epub 2001/02/24].
- [13] Tuffnell DJ, Shennan AH, Waugh JJS, Walker JJ. The management of severe preeclampsia/eclampsia, guideline number 10(A). London: Royal College of Obstetricians and Gynaecologists; 2006.

- [14] Magee LA, Helewa M, Moutquin JM, von Dadelszen P. SOGC guidelines: diagnosis, evaluation and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30(Suppl. 1):1–48.
- [15] Lindheimer MDT, Cunningham FG. ASH position article: hypertension in pregnancy. *J Am Soc Hypertens* 2008;2:484–9.
- [16] Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM. 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* 2001;20(1):IX–XIV [Epub 2002/06/05].
- [17] Lowe SA, Brown MA, Dekker GA, Gatt S, McLintock CK, McMahon LP, et al. Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009;49(3):242–6 [Epub 2009/07/02].
- [18] Schroeder BM. ACOG practice bulletin on diagnosing and managing preeclampsia and eclampsia. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Am Fam Physician* 2002;66(2):330–1 [Epub 2002/08/03].
- [19] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350(7):672–83 [Epub 2004/02/07].
- [20] Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST, Salvesen KA, Austgulen R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclampsia. *BJOG* 2000;107(11):1410–6 [Epub 2000/12/16].
- [21] Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111(5):649–58 [Epub 2003/03/06].
- [22] Hertig A, Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta* 2010;411(21–22):1591–5 [Epub 2010/07/24].
- [23] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 2004;350(7):672–83 [Epub 2004/02/07].
- [24] Rana S, Karumanchi SA, Levine RJ, Venkatesha S, Rauh-Hain JA, Tamez H, et al. Sequential changes in antiangiogenic factors in early pregnancy and risk of developing preeclampsia. *Hypertension* 2007;50(1):137–42 [Epub 2007/05/23].
- [25] Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008;264(3):224–36 [Epub 2008/09/17].
- [26] Yang J, Shang J, Zhang S, Li H, Liu H. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in preeclampsia: genetic polymorphisms and microRNA. *J Mol Endocrinol* 2013;50(2):R53–66 [Epub 2013/02/02].
- [27] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86(4):1343–6 [Epub 1990/10/01].
- [28] Shaik AP, Sultana A, Bammidi VK, Sampathirao K, Jamil K. A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women. *J Obstet Gynaecol* 2011;31(7):603–7 [Epub 2011/10/07].
- [29] Chen Z, Xu F, Wei Y, Liu F, Qi H. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and risk of pregnancy hypertensive disorders: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012;13(1):184–95 [Epub 2011/11/17].
- [30] Galao AO, de Souza LH, da Costa BE, Scheibe RM, Poli de Figueiredo CE. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in preeclampsia and normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(3):821–4 [Epub 2004/10/07].
- [31] Zhong WC, Wang Y, Zhu H, Zhao X. Meta analysis of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism as a risk factor for preeclampsia in Chinese women. *Genet Mol Res* 2012;11(3):2268–76 [Epub 2012/06/02].
- [32] Ng E, Lu Y, Hambly B, Jelinek HF, Yu B, Matthews S, et al. Angiotensin-converting enzyme gene DD genotype is associated with increased systolic blood pressure in an Australian Rural Type 2 Diabetic Cohort. *Hypertens Res* 2013;36(4):381–2 [Epub 2012/12/14].
- [33] Casarini DE, Plavnik FL, Zanella MT, Marson O, Krieger JE, Hirata IY, et al. Angiotensin converting enzymes from human urine of mild hypertensive untreated patients resemble the N-terminal fragment of human angiotensin I-converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33(1):75–85 [Epub 2001/02/13].
- [34] Maluf-Meiken LC, Fernandes FB, Aragao DS, Ronchi FA, Andrade MC, Franco MC, et al. N-domain isoform of angiotensin I converting enzyme as a marker of hypertension: populational study. *Int J Hypertens* 2012;2012:581780 [Epub 2012/06/06].
- [35] Ronchi FA, Andrade MC, Carmona AK, Krieger JE, Casarini DE. N-domain angiotensin-converting enzyme isoform expression in tissues of Wistar and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2005;23(10):1869–78 [Epub 2005/09/09].
- [36] Marques GD, Quinto BM, Plavnik FL, Krieger JE, Marson O, Casarini DE. N-domain angiotensin I-converting enzyme with 80 kDa as a possible genetic marker of hypertension. *Hypertension* 2003;42(4):693–701 [Epub 2003/08/06].
- [37] Hattori MA, Del Ben CL, Carmona AK, Casarini DE. Angiotensin I-converting enzyme isoforms (high and low molecular weight) in urine of premature and full-term infants. *Hypertension* 2000;35(6):1284–90 [Epub 2000/06/17].
- [38] Teixeira AM, Plavnik FL, Fernandes FB, Marson O, Christofalo DM, Ajzen SA, et al. Association of urinary 90 kDa angiotensin-converting enzyme with family history of hypertension and endothelial function in normotensive individuals. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(5):351–6 [Epub 2008/06/03].
- [39] Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Preeclampsia. *Lancet* 2010;376(9741):631–44 [Epub 2010/07/06].
- [40] McDonald SD, Malinowski A, Zhou Q, Yusuf S, Devereaux PJ. Cardiovascular sequelae of preeclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analyses. *Am Heart J* 2008;156(5):918–30 [Epub 2008/12/09].
- [41] Lykke JA, Langhoff-Roos J, Sibai BM, Funai EF, Triche EW, Paidas MJ. Hypertensive pregnancy disorders and subsequent cardiovascular morbidity and type 2 diabetes mellitus in the mother. *Hypertension* 2009;53(6):944–51 [Epub 2009/05/13].
- [42] Vikse BE, Hallan S, Bostad L, Leivestad T, Iversen BM. Previous preeclampsia and risk for progression of biopsy-verified kidney disease to end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25(10):3289–96 [Epub 2010/03/30].
- [43] Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 1976;66(2):416–24.
- [44] Piquilloud Y, Reinharz A, Roth M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim Biophys Acta* 1970;206(1):136–42.