

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**AVALIAÇÃO IMUNOGENÉTICA EM PACIENTES COM  
PRÉ-ECLÂMPSIA: GENES ASSOCIADOS AO ESTRESSE E APOPTOSE**

**Mauricio Busatto**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientação: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

**Porto Alegre**

**Agosto de 2012**

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

Agências financiadoras:

CNPq

CAPES

FAPERGS

Instituição de origem:

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

*Dedico este trabalho às fontes de todo o material genético que possuo no interior de cada uma das trilhões de células que me compõe, pai e mãe.*

## AGRADECIMENTOS

*Nós homens, sozinhos, jamais nos tornaríamos o que somos hoje se não houvesse a influência do meio ambiente e os desafios impostos que alavancaram a nossa evolução. E eu, Mauricio, não seria o que sou hoje se não tivesse convivido com um grupo renomado de cientistas e amigos que formam o PPGBM. Devo a estes, imenso agradecimento às suas contribuições intelectuais, morais e científicas a este trabalho. Pontualmente gostaria de agradecer:*

*À Priscila Vianna, pela excelente profissional que é. Por todos os momentos de discussão e estruturação deste trabalho. Pela paixão que seus artigos sobre imunogenética da gestação me despertaram e por ter se tornado uma grande amiga. Trabalhar com ela é sensacional, desejo que muitos trilhem este caminho ao seu lado;*

*Ao professor José Artur, por ter acreditado em mim e tornado a realização de um grande sonho possível. Agradeço por me ensinar a desenvolver um pensamento crítico e por todos os momentos de filosofia científica durante a correção deste trabalho. Um exemplo de profissional que certamente jamais esquecerei;*

*Ao Diego, pela grandiosa contribuição a este trabalho através do seu profundo conhecimento estatístico e pela determinante ajuda em todos os momentos que necessitei;*

*À Bianca, pela grande disposição no auxílio das genotipagens e pela excelente companhia e amiga que se tornou;*

*À professora Lavínia e aos seus alunos Lucas e Juliano pela contribuição para a realização deste trabalho.*

*Embora não tenham auxiliado diretamente na realização desta dissertação é fundamental agradecer aos maravilhosos colegas de trabalho que tive o imenso prazer de compartilhar todos os momentos:*

*À Diny, pela pessoa maravilhosa que é! Por ser determinada e batalhadora. É indescritível trabalhar ao lado de alguém tão pura e carinhosa. Agradeço também pela eterna companhia na hora do café e por todos os momentos de alegrias e desabafos que compartilhamos;*

*À Mila, por ser uma garota extremamente empolgada com a vida e desta maneira conseguir influenciar todos ao seu redor. Sinceramente nunca vi uma pessoa*

*ler um artigo de forma tão alegre. Seria um erro não mencionar que ela é uma das pessoas mais inteligentes que eu conheci;*

*À Ju, pela eterna disposição em ajudar. Sempre pronta para resolver qualquer problema no laboratório, ela é um exemplo de liderança. Carinhosa e cheia de paciência eu agradeço por cada conselho que recebi;*

*À Paula, por todo o auxílio ao longo deste trabalho, que não foi pouco. Ela faz muita falta no laboratório, é muito bom trabalhar com uma pessoa tão inteligente e dedicada;*

*À Fê, pela grande companhia em todos os momentos. Chegar no laboratório cedo e sentir cheirinho de café era sinônimo de que a Fernanda já havia chegado. Como era bom fazer PCR ao teu lado. Admiro tua tranquilidade e agradeço de coração por abrir novas portas em meu caminho;*

*À Nayê, por simplesmente ser quem ela é. Como é bom ter uma amiga como você. Correta e divertida. Obrigado por todos os momentos de descontração e alegria, que não foram poucos. Mulher de atitude, admiro-a muito por isso;*

*À Camile, pela acolhida quando cheguei em Porto Alegre. Sempre tímida, mas com uma personalidade que eu admiro;*

*À Jacque, pelas intermináveis aulas de espanhol e pelo eterno carisma por tudo e por todos. Tua companhia é “graciosa”. Obrigacias;*

*À Tássia, por ser um exemplo de bom humor e pela grande companhia nos momentos humorísticos do laboratório com as várias interpretações que fizemos juntos do grande Clô;*

*Ao Veit, por ter me ensinado a fazer PCR, por ser um exemplo de profissional e pela determinação em alcançar seus objetivos;*

*À Francis, pela amizade e companheirismo na representação discente. Personalidade forte e sinceridade são palavras que descrevem perfeitamente o que ela é. Quero agradecer por discordar de mim, eu adoro isso;*

*À Pietra, pela parceria nos jogos de vôlei e pela troca de experiências que fixaram alguns padrões em um encontro ao acaso;*

*À Bel e ao Pedro, por todo o tempo que convivemos. Não consigo separá-los nem nos agradecimentos. Pessoas de muita luz. Tenho grande admiração por ambos;*

*À Prizinha e a Pati, pela grande amizade. A presença delas torna qualquer ambiente agradável e super animado. Foi ótimo o tempo que passamos juntos;*

*À Vivian, pelo carinho. Admiro a forma com que estudou e foi atrás do seu sonho. Parabéns pela coragem e determinação;*

*À Ana Karine, pela sua amizade no laboratório;*

*À Lia, por sua simpatia. É muito bom trabalhar com pessoas animadas;*

*Ao Bruno, Gui e Gabi, conhecer vocês foi algo extraordinário. Uma pena que não convivemos muito tempo no laboratório, mas sempre que os encontro é um momento fantástico;*

*Aos bioinformatas: Dani, Megui, Gustavo, Mauricio e Dinler pela sempre prontidão em ajudar em qualquer problema;*

*Embora não façam parte do meu mundo profissional, seus apoios são indispensáveis em minha vida, desta forma agradeço:*

*À minha mãe e ao meu pai, por terem me educado para ter coragem e determinação na realização dos meus sonhos. Tudo que sou devo a eles! Toda a dedicação que eles tiveram por mim, desde os passeios que a minha mãe fazia comigo de guarda-chuvas nas tardes ensolaradas até a paciência que meu pai tinha quando me encontrava escondido em seu carro na hora em que ele saía para o trabalho. Vocês são peças fundamentais para todas as minhas conquistas! Obrigado de coração por tudo!*

*Ao meu irmão, Gustavo, por todos os momentos que passamos juntos e pelo companheirismo ao longo de todo o nosso crescimento. Poder ter um grande irmão/amigo que eu sempre poderei contar é algo grandioso! Obrigado mano!*

*À minha avó Rita, por todos os momentos de alegria e carinho que passamos juntos. Por todo o apoio financeiro e pela grande mulher que é!*

*Ao Henrique, companhia essencial em minha vida. Agradeço por cada conselho e momento de compreensão. Poder contar com você torna meu caminho mais fácil. Admiro tua calma e inteligência. Obrigado por toda a revisão clínica deste trabalho;*

*Por fim, mas não menos importante agradeço aos meus grandes amigos: Filipe Furlan, Fernanda Rohde, Aline Mocelin, Dani Furlan, Luciane Coletti, Eliane Regina da Silva, Josi Fão, Renato Sponchiado, Melquior Scheid, Ismael Sauter, Paulinha Luz e meu eterno amigo Maiquel Donin Sponchiado. Vocês tornam minha vida mais feliz e meu caminho mais alegre! Amo-os!*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 Pré-eclâmpsia.....	13
1.2 Estresse e Gestação .....	17
1.3 Apoptose e gestação.....	26
2. OBJETIVOS .....	34
2.1 Objetivo geral .....	34
2.2 Objetivos específicos .....	34
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	35
3.1 The molecular role of glucocorticoid receptor polymorphisms in the development of preeclampsia .....	35
3.2 Apoptosis in preeclampsia: are there any effects of <i>TP53</i> , <i>MDM2</i> and <i>LIF</i> polymorphisms in disease development? .....	56
4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO.....	67
5. REFERÊNCIAS .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

A – adenina

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

C – citosina

cDNA – DNA complementar

CIUR – crescimento intrauterino restrito

CIVD – coagulação intravascular disseminada

CRF – hormônio liberador de corticotrofina

DBD – domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco

DcR – receptor chamariz

DISC – complexo sinalizador indutor de morte

DM – diabetes melito

DMs – *Double minutes*

DR3, 4, 5 – receptor de morte 3, 4, 5

FADD – domínio de morte associado ao FAS

FAS – ácido graxo sintase

FASL – fas ligante

FKBP52 – proteína ligada à FK506

G – guanina

GC – glicocorticóides

GR – receptores de glicocorticóides

GRE – elementos responsivos aos glicocorticóides

HAS – hipertensão arterial sistêmica

HLA-G – antígeno leucocitário humano G



HELLP – hemólise, elevação das enzimas hepáticas e diminuição das plaquetas;

HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal

HPV – papiloma vírus

hsp70, 90 – proteína de choque térmico 70, 90

IKK – inibidor da cascata  $\kappa$ B-quinase

IL-1 – interleucina 1

IMC – índice de massa corpórea

JNK – JUN N-terminal quinase

LBD – domínio de ligação do ligante

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LH – hormônio luteinizante

LIF – *leukemia inhibitory factor*

MDM2 – *p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)*

MET – metionina

mRNA – RNA mensageiro

NF- $\kappa$ B - Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NK – *natural killer*

NR3C1 – subfamília 3 dos receptores nucleares, grupo C, membro 1

NTD – domínio variável N-terminal

PE – pré-eclâmpsia

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

ROS – espécies reativas de oxigênio

RR – risco relativo

SNC – sistema nervoso central

T – timina

TNF – fator de necrose tumoral

TNFR – superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral

TRADD – TNFR associados ao domínio de morte

TP53 – *tumoral protein p53*

U – uracila

uNK – *natural killer* uterinas

## RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multifatorial de etiologia ainda não completamente esclarecida. A hipertensão arterial sistêmica e proteinúria maciça que surgem após a 20ª semana de gestação são as características marcantes desta enfermidade. Fatores genéticos, endoteliais e imunológicos, além de taxa de apoptose alterada, falha na invasão trofoblástica e estresse psicossocial também estão envolvidos com o desenvolvimento de PE. Mulheres grávidas apresentam uma maior vulnerabilidade ao estresse, devido às constantes alterações hormonais durante a gestação. O hormônio cortisol, também chamado de hormônio do estresse, é produzido pela supra-renal e atua em várias células e tecidos, a partir da sua ligação com receptores específicos (receptores de glicocorticóide – GR). Níveis elevados de cortisol podem desencadear apoptose celular devido ao aumento do estresse oxidativo. O gene *NR3C1* codifica o GR, essencial para a interação entre o cortisol e os diversos mecanismos fisiológicos. A presença de polimorfismos como o *BclII* (rs41423247) e *ER22/23EK* (rs6189/6190) já foi relacionada com uma maior ou menor sensibilidade ao cortisol, respectivamente. Dessa maneira, objetivamos investigar a frequência destes polimorfismos em gestantes saudáveis e com PE. Além disso, avaliamos também a presença de polimorfismos em genes que codificam proteínas chave na cascata de apoptose (rs1042522, rs2279744, rs929271 nos genes *TP53*, *MDM2* e *LIF* respectivamente) e sua relação com a PE. O alelo A do polimorfismo *ER22/23EK* esteve mais presente no grupo controle, enquanto que o alelo G do polimorfismo *BclII* apresentou maior frequência em grávidas que desenvolveram a forma leve de PE. Nenhuma diferença entre mulheres com PE e o grupo controle foi observada em relação aos polimorfismos em genes de cascata apoptótica. Concluímos que alterações genéticas no gene codificador dos receptores de cortisol podem afetar a resposta frente ao estresse, aumentando a probabilidade para o desenvolvimento de PE. Porém, os genes envolvidos na via apoptótica aqui avaliados não parecem estar relacionados com esta desordem. Mais pesquisas devem ser realizadas buscando elucidar a complexa fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

## ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a multifactorial disease which etiology is not fully elucidated. Systemic hypertension and massive proteinuria that arise after the 20th week of pregnancy are the hallmarks of this disorder. Genetic, endothelial and immune factors, modified rate of apoptosis, trophoblast invasion failure and psychosocial stress are also involved with PE development. Pregnant women have an increased vulnerability to stress due to constant hormonal changes during pregnancy. The cortisol hormone, also called the stress hormone, is produced by the adrenal and acts on several cells and tissues through its binding to specific receptors (glucocorticoid receptor – GR). High cortisol levels may trigger apoptosis due to increased oxidative stress. The gene *NR3C1* encodes the GR, essential for the interaction between cortisol and the various physiological mechanisms. The presence of polymorphisms as *BclII* (rs41423247) and *ER22/23EK* (rs6189/6190) has been associated with a higher and lower sensitivity to cortisol, respectively. Thus, we aimed to investigate the frequency of these polymorphisms in healthy and PE pregnant. Moreover, we also assessed the presence of polymorphisms in genes that encode key proteins in the apoptosis pathway (rs1042522, rs2279744, rs929271 in *TP53*, *MDM2* and *LIF* genes) and its relationship with PE. The A allele of the *ER22/23EK* polymorphism was more frequent in the control group, while the G allele of the *BclII* polymorphism had a higher frequency in pregnant women who developed mild PE. No differences between women with PE and the control group were observed for polymorphisms in genes of apoptotic pathway. We conclude that genetic alterations of cortisol receptors may affect the response to stress, modulating the development of PE. However genes of apoptotic pathway evaluated here do not seem to be related to this disorder. More research should be done seeking to elucidate the complex pathophysiology of preeclampsia.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Pré-eclâmpsia

Desde o tempo de Hipócrates tem sido reconhecida clinicamente a eclâmpsia, uma doença caracterizada pela ocorrência de convulsões motoras generalizadas em gestantes. Há dois mil anos, Celsius descreveu a ocorrência de gestações relacionadas a convulsões que desapareciam logo após o nascimento do concepto. Visto que estes sintomas se iniciavam de maneira abrupta e terminavam da mesma forma, esta enfermidade foi denominada eclâmpsia, palavra derivada do termo grego “Κεραυνό” (relâmpago). No início do último século, Rayer e Lever observaram um quadro de albuminúria nas pacientes grávidas que sofriam convulsões. No ano de 1884, Schedoff e Porockjakoff relacionaram a característica de hipertensão arterial sistêmica com o desfecho eclâmpsia. Com base nestas informações, cientistas do século XX concluíram que a hipertensão arterial sistêmica e proteinúria eram fortes indicadores preditivos para o desenvolvimento de eclâmpsia. O prelúdio de eclâmpsia foi denominado pré-eclâmpsia (PE) (Kanasaki & Kalluri, 2009).

A PE é uma síndrome específica da gravidez que surge classicamente após 20 semanas de gestação e antes de 48h pós-parto (Young *et al.*, 2010). Duas características que fazem parte dos critérios diagnósticos são o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial sistólica  $\geq 140$ mmHg ou pressão arterial diastólica  $\geq 90$ mmHg) e proteinúria significativa ( $\geq 300$ mg de proteína em coleta de urina em 24 horas ou índice proteinúria/creatinúria  $\geq 0,5$  em amostra simples). Quando a pressão arterial permanece acima de 160/110mmHg, a pré-eclâmpsia é classificada como grave (Barra *et al.*, 2012). Além da pressão arterial, outros critérios são utilizados para classificar como grave a PE: perda progressiva da função renal [oligúria ( $< 400$ mL/24h), aumento da creatina sérica ( $> 1,2$ mg/dl)], disfunção hepática, sinais de hemólise microangiopática e plaquetopenia ( $< 100.000$  células/mm<sup>3</sup>) (Freitas *et al.*, 2006).

As mulheres pré-eclâmpicas apresentam como características fisiopatológicas da doença uma resposta anormal à vascularização da placenta, aumento da resistência vascular sistêmica e da agregação plaquetária, além da ativação da cascata de coagulação e disfunção das células endoteliais (Pregnancy, 2000). Os fatores etiológicos desta doença ainda não estão completamente esclarecidos embora se acredite no envolvimento de fatores genéticos, imunológicos e angiogênicos (Bdolah *et al.*, 2005).

Na tabela 1 observamos os fatores de risco já descritos e o risco relativo de cada elemento no desenvolvimento de PE.

**Tabela 1.** Fatores de risco para Pré-eclâmpsia

<b>Fator de Risco</b>	<b>Comentários</b>
<b><i>Evidência Forte</i></b>	
Hidropsia fetal (não-imune)	RR = 10
Gestação molar	RR = 10
Primigestação	RR = 5 a 10
Irmã com PE	RR = 2,5 a 4
Gestação gemelar	RR = 3
Diabetes melito (DM)	RR = 2 a 3
Irmã, mãe ou avó com eclâmpsia	Respectivamente 37, 26, 16% de PE
PE sobreposta em gestação prévia	70% de chance de recorrência
HAS crônica	25% de chance de desenvolvem PE sobreposta
Nova paternidade	Risco semelhante ao da primigestação
<b><i>Evidência média ou fraca</i></b>	
Idade materna > 35 anos	RR = 3 a 4
IMC $\geq$ 25,8	RR = 2,3 a 2,7
Ganho excessivo de peso	Aumento do risco
Uso de método anticoncepcional de barreira	Aumento do risco
Maior duração da atividade sexual	Diminuição do risco
Aborto prévio	Diminuição do risco
RR = risco relativo; IMC = índice de massa corpórea. HAS = Hipertensão arterial sistêmica. Evidência forte: vários estudos demonstraram risco; Evidência média ou fraca: alguns estudos demonstraram associação [adaptado de (Freitas <i>et. al.</i> , 2006)].	

Desordens hipertensivas permanecem sendo o principal fator para a morbidade perinatal e mortalidade materna. Em média seis a 8% de todas as grávidas são afetadas por esta complicação e estima-se que 15% dos nascimentos prematuros sejam causados pela pré-eclâmpsia (Kanasaki & Kalluri, 2009). Uma pesquisa realizada no ano de 2004 com o objetivo de relatar a incidência de morte materna nas principais capitais brasileiras apontou que somente as doenças hipertensivas específicas da gestação (eclâmpsia e pré-eclâmpsia) foram responsáveis por 37% de todas as mortes obstétricas

diretas (Gotlieb, 2004). No estado do Rio Grande do Sul um estudo retrospectivo de 20 anos realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre correlacionou 18,5% das mortes obstétricas diretas com doenças hipertensivas (Freitas *et al.*, 2006). A Tabela 2 mostra as complicações maternas e fetais mais frequentes da PE.

Mulheres com histórico de pré-eclâmpsia apresentam maior chance de reincidência no futuro, especialmente se a doença desenvolveu-se prematuramente no período de gestação. (Young *et al.*, 2010). Por razões desconhecidas, também ocorre um aumento da incidência em mulheres primíparas (Trogstad *et al.*, 2011). Gestantes afrodescendentes apresentam o dobro da incidência da doença relacionada a mulheres com ascendência europeia (Sibai *et al.*, 2005).

**Tabela 2.** Complicações da Pré-eclâmpsia

<b>Maternas</b>	<b>Fetais</b>
CIVD/Síndrome HELLP (10 - 20%)	Prematuridade (15 - 67%)
Edema pulmonar / Aspiração (2 - 5%)	CIUR (10 - 25%)
Insuficiência renal aguda (1 - 5%)	Morte perinatal (1 - 2%)
Descolamento prematuro de placenta (1 - 4%)	Hipóxia - dano neurológico (<1%)
Insuficiência hepática / Hemorragia (1%)	Morbidade cardiovascular futura associada ao CIUR (<1%)
Eclâmpsia (<1%)	
Acidente vascular cerebral (<1%)	
Morte (<1%)	
Morbidade cardiovascular futura (<1%)	

CIVD = coagulação intravascular disseminada; HELLP = hemólise, elevação das enzimas hepáticas e diminuição das plaquetas; CIUR = Crescimento intrauterino restrito [adaptado de (Sibai, 2005)].

A gravidez é uma condição fisiológica que pode resultar na sobrevivência de um embrião semi alogênico que possui 50% de material genético materno e outros 50% de material genético paterno. Um complexo processo de tolerância imunológica é ativado na interface materno-fetal por diversos fatores (Bulla *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos suportam o conceito de que a má adaptação do sistema imunológico da mãe em relação ao feto seja uma das causas da PE (Sibai *et al.*, 2005). O gene do antígeno leucocitário humano G (*HLA-G*) codifica proteínas conhecidas por influenciar a imunidade durante a gestação (Langat *et al.*, 2006). A molécula *HLA-G* foi a primeira a ser descrita como ligante de inibição de receptores presentes na superfície das células

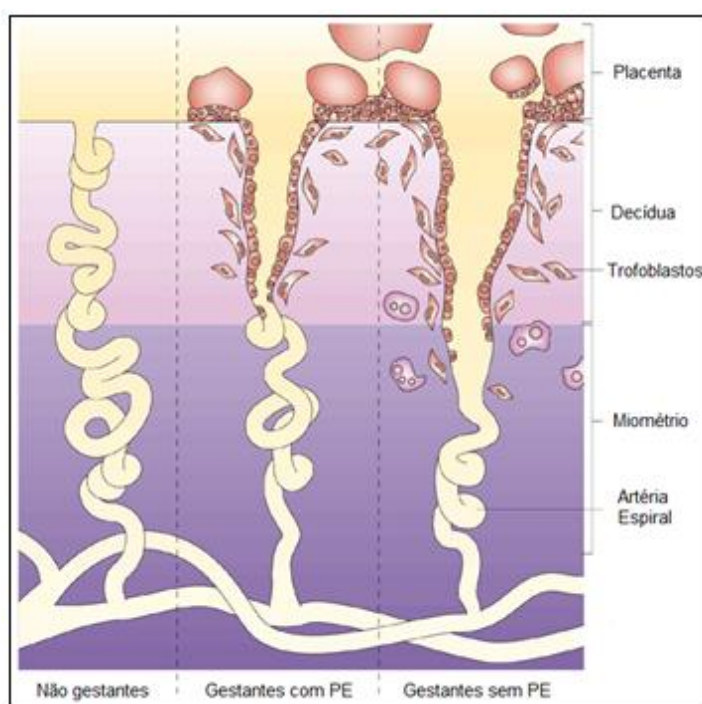
*natural killer* uterinas (uNK), contribuindo para a tolerância materno-fetal, apresentando propriedades de imunotolerância (Carosella *et al.*, 2008). Dentre outras pesquisas realizadas sobre a molécula HLA-G, nosso grupo identificou uma associação entre variantes de *HLA-G* e o desenvolvimento de pré-eclâmpsia, reforçando a importância da imunorregulação durante a gestação (Vianna *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos fisiopatológicos da PE é a falha no desenvolvimento de um suprimento sanguíneo adequado para a placenta, acarretando em estresse oxidativo placentário e na liberação excessiva de fatores placentários na circulação materna. Estes eventos desencadeiam uma resposta inflamatória e disfunção endotelial. Alternativamente, o desenvolvimento de pré-eclâmpsia pode ocorrer na presença de placenta normal em mulheres que são susceptíveis a inflamações sistêmicas como as doenças crônicas cardiovasculares ou metabólicas (Borzychowski *et al.*, 2006). Grandes alterações ocorrem no sistema vascular ao longo da gestação resultando em um acréscimo da capacidade de nutrição na interface feto-placentária (Myatt & Webster, 2009). O volume sanguíneo aumenta em torno de 45% na 8ª semana gestacional, alcançando 5 litros de sangue na 32ª semana, gerando uma hemodiluição fisiológica, reduzindo a viscosidade sanguínea e, conseqüentemente, protegendo o organismo contra eventos tromboembólicos (Myatt & Webster, 2009).

Dentre outros fatores, o desenvolvimento da placenta humana depende da diferenciação de células epiteliais placentárias especializadas denominadas trofoblastos (Zhou *et al.*, 1997). Os trofoblastos são células essenciais para o sucesso gestacional. Estas células se diferenciam em duas linhagens: sinciotrofoblasto e trofoblasto invasivo. A primeira linhagem auxilia na implantação do blastocisto, já a segunda linhagem é classificada em duas sublinhagens: intersticial e endovascular. O trofoblasto intersticial invade o tecido uterino e ancora a placenta à parede uterina, enquanto as células do trofoblasto endovascular migram para as artérias espirais. Nas artérias espirais as células do trofoblasto deslocam e substituem a linhagem endotelial, iniciando uma ação de degradação do músculo e do revestimento elástico que mantém a integridade do vaso (Goldman-Wohl & Yagel, 2002). Este processo de afrouxamento das artérias espirais, denominado de conversão, permite o estabelecimento da circulação útero-placentária e aumenta em torno de 10 vezes o fluxo sanguíneo uterino (Kanasaki & Kalluri, 2009).



Uma invasão trofoblástica inadequada (Figura 1) ocasiona a remodelação incompleta das artérias espirais uterinas e esta é a principal causa da isquemia placentária, sendo considerada uma das vias para o desenvolvimento da PE (Gilbert *et al.*, 2008). Porém, a fisiopatologia da pré-eclampsia ainda não está completamente esclarecida (Bdolah *et al.*, 2005).



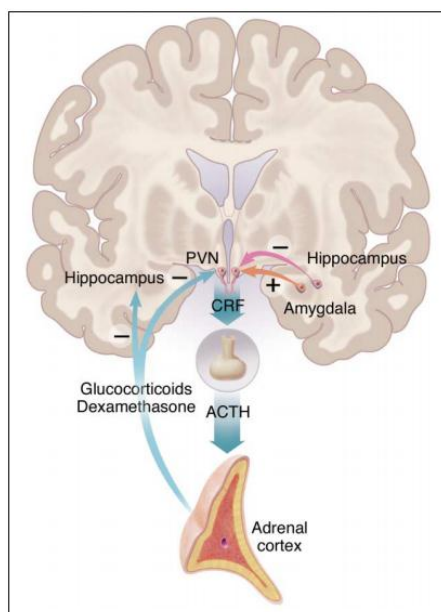
**Figura 1. Falha no mecanismo de vascularização placentária em PE.** Em gestantes pré-eclâmpticas o remodelamento das artérias espirais é limitado à camada decidual, impedindo uma perfusão sanguínea ideal para o desenvolvimento fetal [adaptado de (Bell, 2004)].

## 1.2 Estresse e Gestação

As alterações patológicas de humor, que podem variar desde uma extrema euforia até uma grave depressão, ocorrem com uma maior frequência durante a gestação devido às constantes flutuações de hormônios gonadais (Marcus, 2009). Quatorze a 23% das grávidas apresentarão quadros depressivos durante o período de gestação (Yonkers *et al.*, 2009). A depressão é um distúrbio afetivo altamente estressante que desencadeia uma maior liberação de cortisol, e este hormônio em excesso é considerado um dos principais fatores de risco gestacional (Lancaster *et al.*, 2010).

Há décadas sabe-se que tanto o estresse físico quanto o psicossocial estão associados com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Figura 2). O

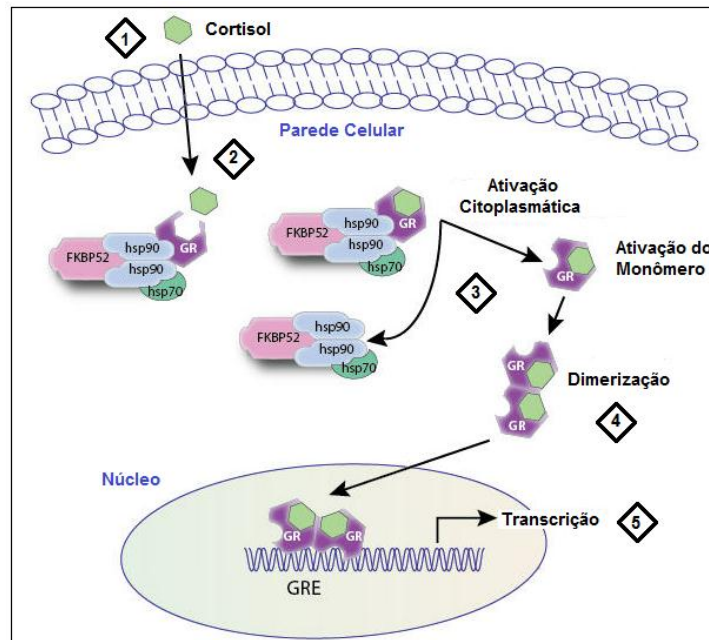
hipotálamo, através do fator de liberação de corticotropina (CRF), controla a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior, que por sua vez regula a secreção dos glicocorticóides (GC) pelo córtex da glândula adrenal, sendo o cortisol o principal deles (Tsigos & Chrousos, 2002). Os GC estão entre as drogas mais utilizadas para tratar doenças inflamatórias e alérgicas, dado sua capacidade anti-inflamatória.



**Figura 2. Regulação do Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.** PVN = Núcleo paraventricular do hipotálamo; CRF = Hormônio liberador de corticotrofina; ACTH = Hormônio adrenocorticotrófico. Adaptado de (Nestler *et al.*, 2002). Todo o estresse físico é transmitido, inicialmente, através do tronco cerebral até eminência mediana no hipotálamo. No hipotálamo ocorre a secreção de CRF no sistema porta-hipofisário, ativando a produção de ACTH pela hipófise, induzindo o córtex adrenal a produzir cortisol. O estresse mental pode causar aumento igualmente rápido da secreção de ACTH. Acredita-se que isto decorra da atividade aumentada da região da amígdala e do hipocampo, que transmitem sinais para o hipotálamo medial posterior. O cortisol exerce efeitos diretos de *feedback* negativo sobre o hipotálamo, reduzindo a formação de CRF e sobre a hipófise anterior, diminuindo a formação de ACTH. Este efeito é essencial para manter os níveis plasmáticos normais [adaptado de (Hall, 2002)].

Os glicocorticóides são importantes reguladores em quase todos os tecidos do corpo humano e seus efeitos são mediados pela ligação aos receptores de glicocorticóides (GR) (Figura 3) (van Rossum *et al.*, 2002). Os GC são internalizados pelas células alvo e se ligam a seus receptores difundidos no citoplasma. Após esta interação, os GC e seus receptores são transportados para o núcleo em forma de dímero, onde se ligam ao DNA em regiões específicas contendo elementos responsivos aos

glicocorticóides (GRE), alterando a transcrição de diversos genes alvo. Desta forma, os GC exercem seus efeitos anti-inflamatórios ativando a transcrição de genes de citocinas supressoras.



**Figura 3. Via de sinalização do cortisol.** A estabilidade do receptor de glicocorticóide (GR) no citoplasma é mantida pela ligação a proteínas acessórias como FKBP52 (*FK506-binding protein*), hsp90 (*heat shock protein 90*) e hsp70 (*heat shock protein 70*). (1) A molécula de cortisol é lipossolúvel e atravessa a membrana citoplasmática. (2) Ocorre a ligação do cortisol ao receptor de glicocorticóide, mudando a sua conformação e tornando-o hiperfosforilado. (3) A ativação do receptor leva à dissociação das proteínas acessórias; (4) Ocorre a dimerização do monômero; (5) O dímero migra para o núcleo e liga-se à região GRE – elementos responsivos a glicocorticóides - regulando a expressão gênica [adaptado de (Oakley & Cidlowski, 2011)].

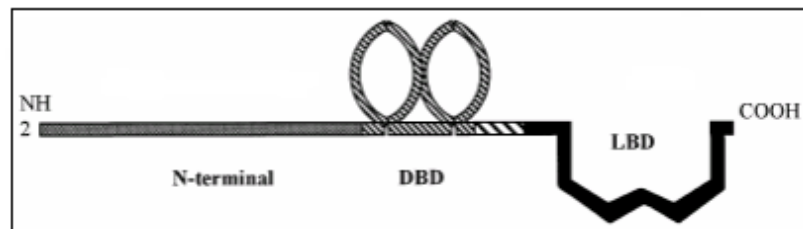
O papel regulador dos GC abrange muitas funções do sistema nervoso central, tais como excitação, cognição, humor, sono, atividade e direção do metabolismo intermediário, manutenção de um adequado tônus cardiovascular, além de atuar sobre o crescimento, reprodução e atividade do sistema imunológico (Chrousos & Kino, 2009). O efeito dos glicocorticóides sobre o sistema nervoso central (SNC), endócrino e sistema imunológico, despertou nos cientistas o desejo de desvendar a rede de interações presente nesta instigante área. No sistema imunológico, os glicocorticóides exercem funções inibidoras ou estimuladoras a partir de eventos estressores (inflamatório, emocional ou fisiológico) que afetam o SNC, caracterizando a área de

estudo da psiconeuroimunologia. O cortisol é um hormônio esteróide com importante função imunorreguladora, suprimindo a resposta imunológica global do organismo, uma vez que algumas de suas ações levam a uma diminuição da atividade das células NK (*natural killer*) (Bauer *et al.*, 1995) e diminuição na proliferação de células T, alterando a produção de citocinas (Baschant & Tuckermann, 2010), além de induzir alteração no tráfego celular – causando linfopenia (Dhabhar *et al.*, 1995). O cortisol também age aumentando a retenção de sódio, a excreção de potássio e a síntese de fatores angiotensinogênicos, resultando na secreção de aldosterona que controla o balanço eletrolítico e aumenta a reabsorção de água, elevando a pressão arterial sistêmica. *In vitro*, o cortisol está relacionado com a expansão clonal linfocitária induzida por mitógenos (concanavalina A e fitoemaglutinina) (Lin *et al.*, 1999).

Em algumas doenças depressivas há um aumento da atividade do eixo HPA, desta forma as células secretoras do ACTH na hipófise são fortemente estimuladas pelo hormônio corticotrófico - CRH, havendo um aumento nos níveis de glicocorticóides (Stanton, 2009). O estresse psicossocial durante a vida pré-natal pode aumentar a vulnerabilidade para o desenvolvimento de PE. Um estudo realizado no ano de 2007 relatou significativo efeito do estresse emocional em grávidas e a incidência de pré-eclampsia. Um aumento nos níveis de hormônio liberador de corticotrofina também foi observado em mulheres com hipertensão gestacional (Leeners *et al.*, 2007). O aumento da liberação de cortisol expõe as células linfóides a níveis deletérios deste hormônio, alterando a sua sensibilidade e interferindo na imunidade celular. Sugere-se que linfócitos expostos cronicamente aos glicocorticóides, como ocorre durante o estresse crônico, podem tornar-se resistentes aos efeitos imunossupressores dos esteróides, provocando também aumento da pressão arterial e disfunção endotelial. Ambas as características são frequentemente observadas em mulheres com PE (Vianna *et al.*, 2011). Sendo assim, torna-se relevante obter mais informações acerca dos processos neuroimunoendócrinos, que caracterizam a ocorrência do estresse psicossocial e sua associação com a pré-eclampsia (KC Vollebregt, 2007).

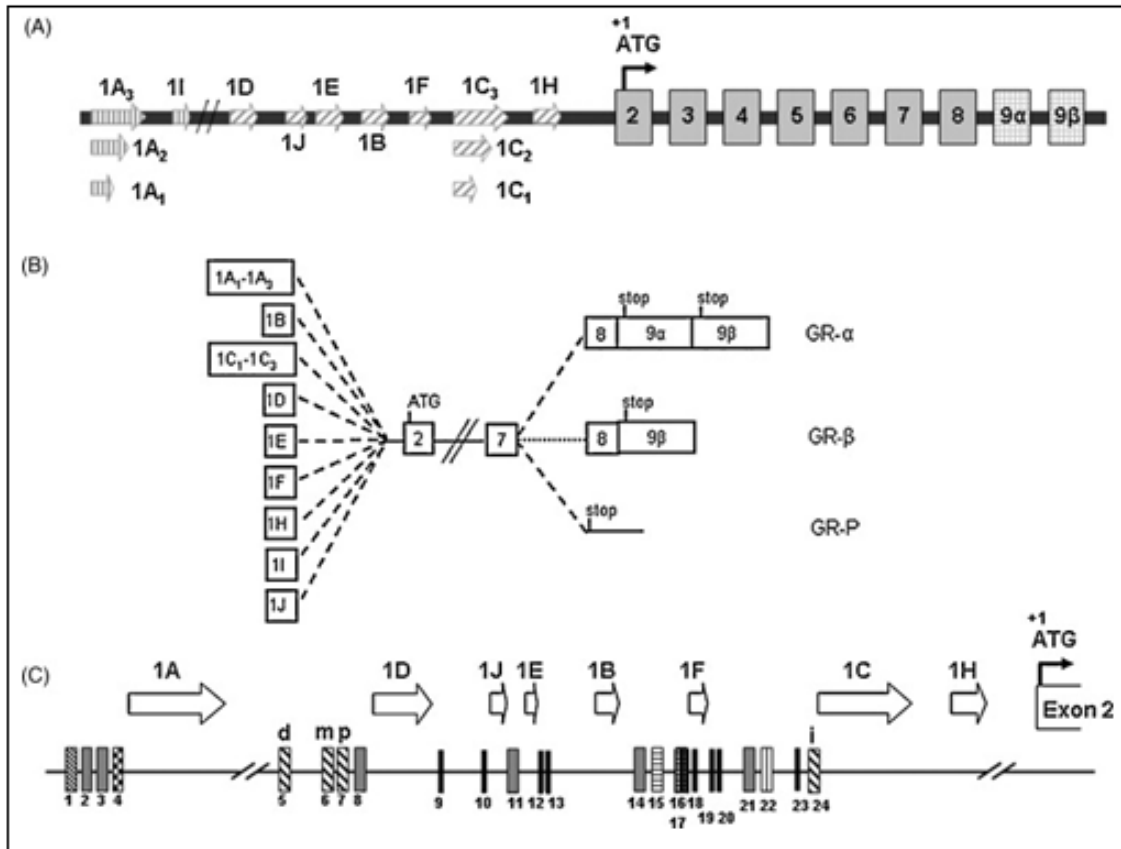
Estudos moleculares, focados na regulação do gene que codifica os receptores de glicocorticóides, são de extrema importância, já que a funcionalidade destes receptores coordena os efeitos anti-inflamatórios dos GC. O gene *NR3C1*, também denominado de receptor de glicocorticóides – GR, está localizado no cromossomo 5 na posição 5q31.3 (Encio & Detera-Wadleigh, 1991). Este gene codifica o receptor de glicocorticóide que

pertence à subfamília dos receptores nucleares 3, grupo C, membro 1. Esta subfamília é formada por proteínas moduladoras que estão estruturalmente organizadas em três regiões distintas: domínio variável N-terminal (NTD), domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco (DBD) e domínio de ligação do ligante (LBD) presente na região C-terminal (Figura 4).



**Figura 4. Representação linear da proteína codificada pelo gene GR.** O domínio N-terminal (NTD) está envolvido na ativação transcricional e pode participar no recrutamento de cofatores, é o sítio imunogenético do receptor e possui uma grande especificidade junto ao promotor. A interação com o DNA é realizada pelo domínio de ligação ao DNA tipo dedo de zinco (DBD). É pela região LBD – que ocorre a ligação do hormônio ao receptor, resultando na ativação transcricional de genes alvos [adaptado de (Gobinet *et al.*, 2002)].

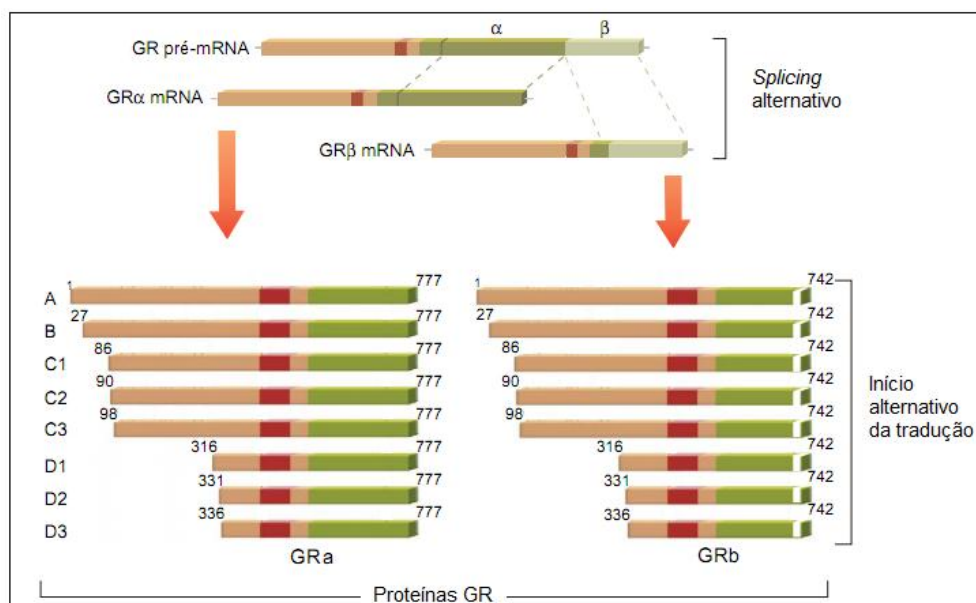
O gene *GR* (Figura 5) contém nove exons, sendo que o primeiro e o último estão sujeitos a processamento alternativo. A variabilidade no primeiro exon não afeta as sequências protéicas, já que o códon iniciador ATG está localizado no éxon 2 (Encio & Detera-Wadleigh, 1991). O primeiro éxon do gene *GR* (Figura 5) contém 8 regiões alternativas para o início da transcrição que estão localizadas em uma região rica em ilhas CpG. As ilhas CpG são caracterizadas como regiões longas (>200pb) contendo mais de 50% do seu conteúdo de nucleotídeos C e G; têm sido encontradas em 60-70% dos genes, na região *upstream*, e quando metiladas estão associadas com um silenciamento gênico estável, agindo de maneira a evitar a ligação dos fatores de transcrição. A metilação de ilhas CpG tem sido implicada na regulação tecido-específica de diversos genes (Larsen *et al.*, 1992). O controle epigenético do gene *GR* está relacionado a consequências significativas sobre o funcionamento do eixo HPA e a subsequente resposta a um agente estressor físico ou psicossocial (Cao-Lei *et al.*, 2011).



**Figura 5. Estrutura do gene NR3C1, potenciais transcrições do mRNA e sítio de ligação na ilha CpG.** (A) Estrutura genômica do GR. (▬) 5' não traduzida dos exons distais; (▧) 5' não traduzida dos exons da ilha CpG; (▩) exons comuns; (▨) exons de *splicing* alternativo na região 3'. (B) Potenciais transcrições dos mRNAs codificando 3 isoformas: GR $\alpha$ , GR $\beta$  e GR-P. (C) Localização dos sítios de ligação dos fatores de transcrição identificados até o momento. (▩) IRF-1 e IRF-2 (posição 1); (▧) c-Myb, c-Ets1/2 e PU1 (posição 4); (▨) Ying Yand 1 (posições 5, 6, 7 e 25); (▩) Elementos responsivos a glicocorticoides (GRE, posições 2, 3, 8, 21 e 22); (▩) Sítios de ligação Sp1 (posições 9, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 21 e 24); (▩) Sítio de ligação NGFI-A b (posição 17); (▩) Fator responsivo a glicocorticoide 1 (GRF-1, posição 18); (▩) Ap-1 (posição 15); e (▩) Ap-2 (posição 23) [adaptado de (Turner *et al.*, 2010)].

O processamento alternativo que ocorre no último éxon do gene *GR* implica no surgimento de diversas variantes (Figura 6), sendo que duas (GR $\alpha$  e GR $\beta$ ) são amplamente estudadas devido às suas relativas abundâncias. Análises das sequências de aminoácidos revelam que as variantes GR $\alpha$  e GR $\beta$  são idênticas até o aminoácido 727, mas divergem além desta posição. Na isoforma GR $\alpha$  existe um adicional de 50 aminoácidos, enquanto na isoforma GR $\beta$  ocorre a adição de 15 aminoácidos não homólogos (Lu & Cidlowski, 2004). A isoforma GR $\beta$  atua como um dominante negativo, inibindo a regulação transcricional da isoforma GR $\alpha$ . O aumento da expressão

da GR $\beta$  tem sido associado com várias doenças relacionadas à resistência ao cortisol (Webster & Cidlowski, 1999).



**Figura 6.** Um gene GR gera múltiplas isoformas de proteínas. O processamento alternativo do exon 9 gera as isoformas GR $\alpha$  e GR $\beta$ . Cada uma destas isoformas produz novas variantes agrupadas em GRa e GRb através de novo processamento alternativo dos mRNA GR $\alpha$  e GR $\beta$ , respectivamente. Os números indicam o primeiro e último resíduo de cada isoforma [adaptado de (Lu & Cidlowski, 2006)].

Dentre as oito variantes originadas a partir do mRNA da isoforma GR $\alpha$  (gerada através do processamento do exon 9), duas estão melhor estudadas: GR $\alpha$ -A e GR $\alpha$ -B. O códon iniciador AUG (Met-1) origina a variante A (777 aminoácidos), enquanto o códon AUG (Met-27) origina a variante B (751 aminoácidos) (Yudt & Cidlowski, 2001). Ribossomos eucarióticos apresentam uma seleção do códon de iniciação no mRNA através de um mecanismo de *scanner*. Um códon AUG pode ser classificado como forte ou fraco dependendo da aderência às sequências específicas circundantes ao códon, chamadas sequência Kozak. Uma base púrica na posição -3 e uma guanina na posição +4, relativos ao códon AUG (A é considerado como +1), são características de sequências iniciadoras fortes (Kozak, 1986). O gene *NR3C1* apresenta a sua primeira sequência Kozak – CTG ATG GAC – sem uma purina na posição -3, indicando ser um iniciador fraco. Já a segunda sequência Kozak – GAT ATG GAC – apresenta uma purina na posição -3 e uma guanina na posição +4, sendo assim um iniciador forte. Uma análise funcional das variantes GR $\alpha$ -A e B, em promotores responsivos a cortisol, mostrou que a variante GR $\alpha$ -B foi duas vezes mais efetiva na transativação gênica

quando comparada a variante A (Yudt & Cidlowski, 2001), podendo estar relacionado a uma distinta regulação em diferentes eventos fisiológicos.

Variantes polimórficas nos genes dos receptores de glicocorticóides podem induzir resistência ou hipersensibilidade ao cortisol (Gross *et al.*, 2009). Ambas alterações podem acarretar sérios danos ao organismo, alterando a ação do cortisol sobre seu receptor e modificando o mecanismo de retroalimentação negativa.

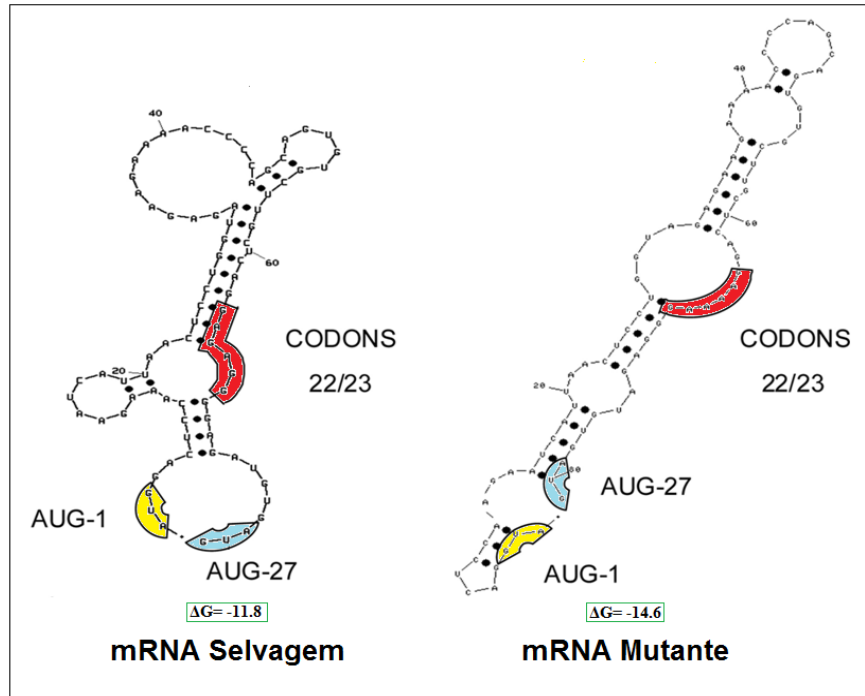
O polimorfismo *ER22/23EK* (rs6189/rs6190), presente em uma frequência populacional de aproximadamente 4,5% em holandeses, é caracterizado por duas trocas de bases nos códons 22 e 23 do éxon 2 no gene *GR* que estão em grande desequilíbrio de ligação ( $D'=1$ ). No códon 22 ocorre a troca de uma G por uma A, caracterizada como uma alteração sinônima, sendo que um ácido glutâmico continua sendo codificado. No códon 23 a troca de uma G por uma A altera o aminoácido arginina pelo aminoácido lisina na sequência proteica (van Rossum *et al.*, 2002). Este polimorfismo foi relacionado a uma diminuição da resposta à administração de 1mg de dexametasona (van Rossum *et al.*, 2002), sugerindo sua resistência ao cortisol.

O mecanismo molecular relacionado ao relativo decréscimo da sensibilidade ao cortisol na presença do polimorfismo *ER22/23EK* ainda é desconhecido. Sabe-se que este polimorfismo está muito próximo de ambas as sequências iniciadoras que originam as variantes A e B da isoforma  $GR\alpha$ . As alterações de bases na presença do polimorfismo *ER22/23EK* podem alterar a estrutura secundária do mRNA *GR* (Figura 7). Esta mudança estrutural torna o primeiro sítio de iniciação AUG mais acessível, resultando em uma maior tradução da variante  $GR\alpha$ -A, conseqüentemente reduzindo os níveis de  $GR\alpha$ -B. A variante  $GR\alpha$ -A está relacionada a uma menor transativação, originando um decréscimo na sensibilidade ao cortisol, tornando o receptor de glicocorticóide mais resistente (Russcher *et al.*, 2005).

A presença do polimorfismo *ER22/23EK* proporciona um melhor perfil metabólico e estudos já demonstraram sua associação com o aumento da sensibilidade a insulina, redução nos níveis de LDL (*low-density lipoprotein*) e colesterol total, o que resulta em um melhor perfil cardiovascular (van Rossum *et al.*, 2002). Pacientes portadores desta variante também tiveram uma redução de 50% nos níveis de proteína C reativa, a qual é produzida pelo fígado em resposta a inflamação (Russcher *et al.*, 2005). Crianças com déficit de atenção e fobia social apresentaram uma diminuição da resposta ao cortisol na presença do alelo A (van West *et al.*, 2010). Indivíduos heterozigotos



mostraram uma menor prevalência de hipertensão (Mora *et al.*, 2012). Dessa maneira, grávidas portadoras da variante *ER22/23EK* poderiam estar, de alguma maneira, sendo protegidas para o desenvolvimento de PE.



**Figura 7** Mudança na estrutura secundária do mRNA GR causada pelo polimorfismo *ER22/23EK*. Através do software *m-fold* pode-se fazer a predição de estruturas secundárias em ácidos nucleicos. Neste modelo é possível observar que o mRNA que contém o polimorfismo resulta em uma estrutura mais estável [menor energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ )] do que o mRNA selvagem, aparentemente aumentando a chance de seleção do primeiro códon de iniciação pelo ribossomo [adaptado de (Russcher *et al.*, 2005)].

O polimorfismo *BclI* (rs41423247), com a variante polimórfica presente em uma menor frequência alélica de aproximadamente 33% em holandeses, é caracterizado pela troca de um nucleotídeo citosina por um guanina, a 646 nucleotídeos *downstream* do exon 2 (van Rossum *et al.*, 2003). Indivíduos homozigotos (GG) e heterozigotos (CG) para o alelo polimórfico foram comparados com indivíduos selvagens (CC) e apresentaram um aumento da resposta ao ACTH e aos efeitos supressores do cortisol na presença de baixas doses de dexametasona (Huizenga *et al.*, 1998). A presença da variante G no gene *GR*, torna o receptor de glicocorticóide mais sensível (van Rossum *et al.*, 2003).

Muitos trabalhos evidenciam que variações genéticas no gene *GR* apresentam relação com várias doenças. Um estudo de 2004 avaliando a resposta adrenocortical ao estresse psicossocial demonstrou que, homens portadores da variante G do *BclII* apresentaram associação com a redução na produção de cortisol. Além disso, tanto os indivíduos heterozigotos quanto os homozigotos GG exibiram uma tendência para menores respostas de ACTH quando comparadas ao grupo controle (Wust *et al.*). Em uma pesquisa realizada com mulheres depressivas em fase pré-menopausa, o genótipo GG do *BclII* foi significativamente mais frequente quando comparado às mulheres controles (Krishnamurthy *et al.*, 2008). O genótipo GG também foi associado com o aumento da pressão arterial em indivíduos obesos e não obesos (Srivastava *et al.*, 2011), a um maior risco de crianças desenvolverem bulimia nervosa após abuso físico ou sexual (Steiger *et al.*, 2011), à progressão de doenças pulmonares em pacientes jovens com fibrose cística (Corvol *et al.*, 2007) e a menores níveis do hormônio luteinizante (LH) em mulheres com síndrome dos ovários policísticos (Valkenburg *et al.*, 2011).

Na síndrome de Cushing, caracterizada por aumento nos níveis de cortisol, frequentemente ocorrem sintomas depressivos. Em longo prazo, um aumento no cortisol circulante tem sido associado com o comprometimento cognitivo, principalmente no hipocampo. Déficits neuropsicológicos são frequentemente observados em pacientes depressivos e podem estar relacionados ao aumento da atividade do eixo HPA [revisado por (van Rossum *et al.*, 2006)]. Normalmente, uma excessiva ativação do eixo HPA é observada em aproximadamente metade dos indivíduos com depressão, sendo que esta super ativação pode ser corrigida por drogas antidepressivas (Holsboer, 2001).

Assim, variantes genéticas do gene *GR* têm sido relacionadas à alteração da sensibilidade ao cortisol e a seu efeito na susceptibilidade a depressão, o que pode estar correlacionado com o desenvolvimento de complicações gestacionais como a PE.

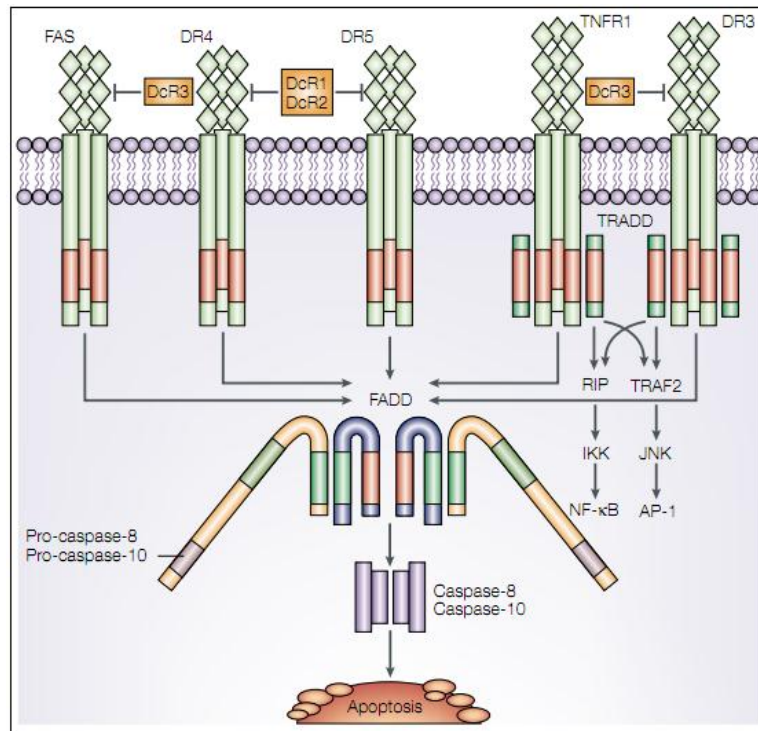
### **1.3 Apoptose e gestação**

No ano de 1972, três cientistas (Kerr, Wylie e Currie da Universidade de Aberdeen – Escócia) descreveram um mecanismo que controlava a morte celular, a qual pareceria ter um papel complementar, porém oposto ao papel da mitose na regulação da população celular. Este processo foi denominado de apoptose (*apo* = separação, *ptosis* = queda), termo que era utilizado para se referir à queda das folhas das árvores ou pétalas das flores (Kerr *et al.*, 1972). A apoptose é o mecanismo de morte celular programada

com função central no processo de homeostase do organismo, que ocorre tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. Este processo é essencial para o desenvolvimento de uma placenta normal, porém, em excesso, a apoptose está associada a diversas patologias gestacionais, incluindo a PE (Sharp *et al.*, 2010).

O processo apoptótico é caracterizado pela condensação do citoplasma e das organelas celulares e a dissociação da lâmina nuclear, resultando na clivagem do DNA. É um evento que depende de energia. Além disso, é necessária a remoção do material celular indesejado enquanto se evita uma resposta do sistema imunológico e o dano aos tecidos adjacentes. A ativação do processo apoptótico pode ocorrer por via extrínseca ou intrínseca [revisado por (Sharp *et al.*, 2010)]. A via extrínseca é mediada pela ativação dos chamados receptores de morte celular – *death receptors* – que estão presentes na superfície da célula e transmitem o sinal apoptótico após a união com ligantes específicos. Receptores de morte celular pertencem à superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNFR) capazes de induzir a apoptose em um mecanismo independente da proteína p53 (Figura 8) (Ashkenazi, 2002).

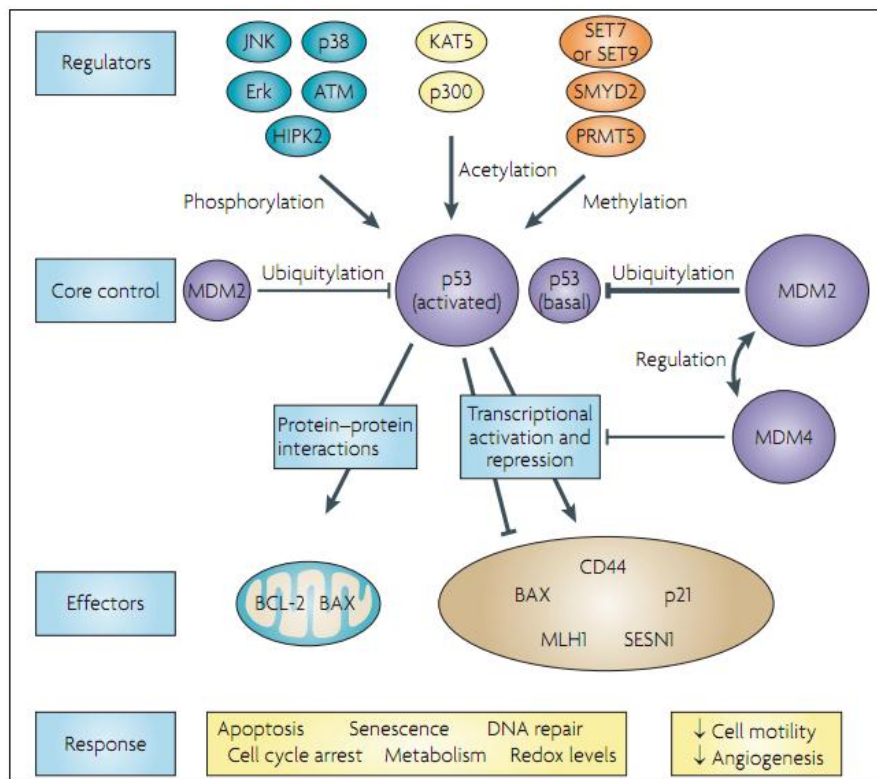
A proteína p53 – assim denominada por possuir um peso molecular de 53 kD – é codificada pelo gene *TP53* (*tumor protein p53*) e exerce um papel central na via intrínseca da apoptose (Whibley *et al.*, 2009) (Figura 9). Descrito pela primeira vez no ano de 1979, acreditava-se que o gene *TP53* era um oncogene. Ao longo dos anos, dados genéticos e funcionais auxiliaram na reclassificação deste gene, o qual passou a pertencer ao grupo de genes supressores tumorais por apresentar características como inibição do ciclo celular e indução da apoptose (Vogelstein *et al.*, 2000). Na espécie humana, o gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17, na posição 17p13. Somente os éxons 2-11 são codificantes (McBride *et al.*, 1986). Dois promotores estão presentes no gene, possibilitando a transcrição de diferentes isoformas protéicas (Wei *et al.*, 2012). Deleções ou mutações neste gene são fortemente associadas à susceptibilidade ao câncer (Murphy, 2006; Vousden & Lane, 2007). Apesar do papel supressor tumoral da p53 ser amplamente estabelecido, a sua função em condições normais ou na ausência de um alto nível de estresse ainda não foi completamente elucidada (Hu *et al.*, 2008).



**Figura 8 Ativação da via extrínseca da apoptose.** Depois da ligação de FASL ou APO2L/TRAIL (Apo2 ligante / fator de necrose tumoral tumor – TNF – relacionado à indução de apoptose), o receptor de morte FAS, DR4 ou DR5 monta um complexo sinalizador indutor de morte (DISC), através do adaptador de domínio de morte associado ao FAS (FADD). Este adaptador recruta e ativa as caspases 8 e/ou 10 (proteases iniciadoras da apoptose) induzindo a resposta celular específica: apoptose. Após a ligação do fator de necrose tumoral (TNF) o receptor de morte TNFR1 recruta TNFR associados ao domínio de morte (TRADD) como uma plataforma adaptadora e ativa complexos alternativos de sinalização através de adaptadores secundários. Um destes complexos é um DISC que envolve FADD e caspase 8, iniciando a apoptose de maneira similar aos outros receptores já citados. Outro complexo envolve proteínas que interagem com o receptor (RIP), que “desliga” o inibidor da cascata  $\kappa$ B-quinase (IKK) ativando o fator de transcrição NF- $\kappa$ B. O terceiro complexo envolve o fator 2 associado ao TNFR (TRAF2) que se acopla ao receptor JUN N-terminal quinase (JNK), estimulando o fator de transcrição AP-1. O receptor de morte DR3 tem o complexo de sinalização similar ao TNFR1. O receptor chamariz (DcR) é membro da família TNFR, sendo capaz de competir com os receptores de morte, inibindo a sua função. Domínios de morte são indicados em vermelho; domínios de morte efetora em azul; domínios de caspases são mostrados em verde [adaptado de (Ashkenazi, 2002)].

A síntese de DNA complementar – cDNA – do gene *TP53* foi realizada no ano de 1984 (Murphy, 2006) e quatro anos após o gene *TP53* ser clonado, um sequenciamento molecular revelou uma nova forma alélica. Essa nova forma alélica é responsável por uma alteração na mobilidade eletroforética da proteína p53 e foi identificada como resultado de um polimorfismo localizado no éxon 4 que codifica o

aminoácido 72, alterando uma prolina (CCC) por uma arginina (CGC) (Buchman *et al.*, 1988).



**Figura 9. Complexa via da p53** – A via da p53 é composta por pelo menos 50 diferentes enzimas com capacidade de mudar covalentemente a proteína resultando na alteração de sua estabilidade, localização celular ou atividade. Na ausência de estresse, a proteína Mdm2 controla negativamente a proteína p53, através de ubiquitinação. Danos ao DNA, estresse metabólico, hipóxia e ativação de oncogenes são alguns dos processos que podem ativar a p53 através de vários reguladores. Após níveis elevados de estresse, a interação entre Mdm2, Mdm4 e p53 é perturbada por modificações pós-traducionais. Estas alterações permitem a ativação da p53 para atuar como um fator transcricional, ativando ou reprimindo genes envolvidos na apoptose, na parada do ciclo celular e na senescência. A p53 também pode se deslocar para a mitocôndria, onde interage fisicamente com membros da família Bcl-2 para formar poros na membrana mitocondrial levando a liberação de citocromo C, desencadeando a apoptose. Alguns dos principais ativadores, reguladores e efetores da p53 são mostrados na figura. ATM, ataxia-telangiectasia mutante; BAX, X associado à BCL-2; HIPK2, proteína quinase 2 de interação a homeodomínio; JNK, quinase N-terminal de jun; KAT5, K (lisina) acetiltransferase 5; MLH1, homólogo a proteína MutL1; PRMT5, proteína arginina metiltransferase 5; SESN1, sestrin 1; SMYD2, domínio 2 contendo SET e MYND [adaptado de (Whibley *et al.*, 2009)].

Com o objetivo de avaliar as diferenças bioquímicas e biológicas das variantes p53<sub>Pro</sub> e p53<sub>Arg</sub>, um grupo de pesquisadores inseriu separadamente, através de vetores

virais, ambas variantes polimórficas do gene *TP53* em plasmídeos. Posteriormente, fibroblastos murinos foram infectados com estes plasmídeos mutantes e então expostos ao papiloma vírus (HPV-18) E6 humano. Por possuir a capacidade de ubiquitinar a proteína p53, o vírus HPV-18 impede a indução da apoptose e induz o desenvolvimento de tumores. Curiosamente, células infectadas pelo plasmídeo portador da variante que codifica a isoforma p53<sub>Arg</sub> foram significativamente mais susceptíveis a degradação quando expostas ao HPV-18 em relação a células p53<sub>Pro</sub>. Desta forma foi possível concluir que a presença do alelo G no polimorfismo *Pro72Arg* induz a apoptose com maior eficiência (Thomas *et al.*, 1999).

A variante *Pro72Arg* no gene *TP53* já foi relacionada ao desenvolvimento de complicações gestacionais. Mulheres que apresentaram fetos com crescimento intrauterino restrito (CIUR) mostraram um nível elevado de mRNA *TP53* em sinciciotrofoblastos (Heazell *et al.*, 2011). Um aumento no índice de desenvolvimento de endometriose em mexicanas foi relacionado com a presença da variante *Pro72Arg* (Gallegos-Arreola *et al.*, 2012). Porém, outros estudos na população brasileira (Bianco *et al.*, 2011) e italiana (Lattuada *et al.*, 2004) não encontraram associação entre a presença da variante *Pro72Arg* e o desenvolvimento de complicações gestacionais. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento de PE, como resistência a insulina e doenças do sistema cardiovascular também apresentaram associação com o polimorfismo *Pro72Arg* (Minamino *et al.*, 2009).

O regulador negativo do gene *TP53*, o gene *MDM2* (*transformed mouse 3T3 cell double minute 2*) teve sua descoberta instigada pela presença de grandes quantidades de *double minute* (DMs) na linhagem tumorogênica de camundongos 3T3DM (Fakharzadeh *et al.*, 1991). DMs, caracterizados como pequenos fragmentos de DNA circular extracromossomais e ateloméricos, estão presentes em uma fração substancial de tumores e manifestações citogenéticas de ampliações gênicas vantajosas para o crescimento e sobrevivência da célula tumoral (Itoh & Shimizu, 1998). O gene humano *MDM2* [*p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)*] está localizado no cromossomo 12 na posição 12q13-q14 e apresenta homologia com o gene *Mdm2* murino (HGNC, 2012). Após isolar e clonar os genes murinos candidatos *MDM1*, *MDM2* e *MDM3*, pesquisadores da Universidade da Pensilvânia transfectaram células com plasmídeos portadores destes genes. Como resultado, as células contendo os

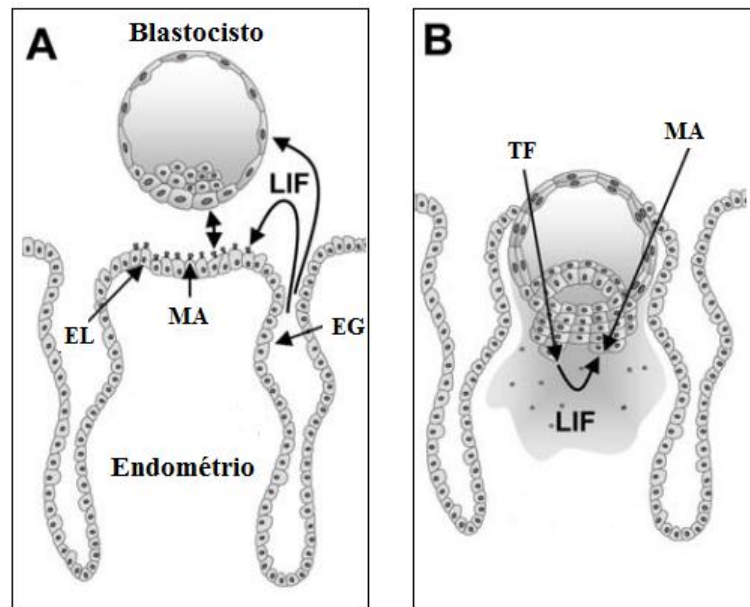
plasmídeos portadores do gene *MDM2* apresentaram um aumento no potencial tumorogênico (Fakharzadeh *et al.*, 1991).

A origem do potencial tumorogênico da proteína Mdm2 foi relacionada com sua capacidade de supressão da p53 (Momand *et al.*, 1992). A regulação negativa da p53 pode ocorrer de duas maneiras: 1) ligando-se ao domínio de transativação N-terminal do gene *TP53*, impedindo sua transcrição (Momand *et al.*, 1992), ou 2) assumindo o papel de ubiquitina ligase (E3). A Mdm2 ubiquitina a proteína p53, a qual é exportada para o citoplasma e sofre ação proteolítica pelos proteossomos (Freedman *et al.*, 1999; Grossman *et al.*, 2003).

No ano de 2004, o polimorfismo *SNP309* (rs2279744) no promotor do gene *MDM2* foi relacionado com o aumento dos níveis proteicos de Mdm2. O polimorfismo *SNP309* no gene *MDM2* apresenta uma transição de uma base T por uma G no primeiro éxon, que aumenta a afinidade entre o fator de transcrição Sp1 e a região promotora do gene (Bond *et al.*, 2004). Pelo fato de o fator de transcrição Sp1 reconhecer mais facilmente sequências CGs no DNA, a troca de bases favorece sua ação no gene polimórfico (Pugh & Tjian, 1990). Devido ao aumento da capacidade supressora na p53, a proteína Mdm2 é responsável por um marcante avanço no desenvolvimento de tumores em humanos (Bond *et al.*, 2004). O polimorfismo *SNP309* do gene *MDM2* também foi relacionado como um fator de risco para problemas gestacionais como aborto (Fang *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011) e câncer de endométrio (Ashton *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). Devido aos resultados já descritos pode-se supor que o polimorfismo *SNP309* poderia estar relacionado com o desenvolvimento de PE. Como o mecanismo de geração de elevada taxa de apoptose em complicações gestacionais ainda não foi completamente elucidado, estudos imunogenéticos que investiguem os mecanismos de regulação da p53 são de extrema importância.

No ano de 2007, a proteína p53 apresentou um papel totalmente inesperado: a regulação da reprodução materna através de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). LIF é uma citocina com papel fundamental na implantação do blastocisto (Hu *et al.*, 2007) e indispensável para o sucesso gestacional. Estudos em modelos de experimentação animal mostram que a expressão de mRNA *LIF* no útero murino não é induzida pela presença de embriões viáveis, mas sim pelos hormônios gonadais presentes no período pré-implantacional. Além do mais, os níveis de LIF caem drasticamente após a implantação blastocística (Bhatt *et al.*, 1991). Em mulheres, esta citocina normalmente

está presente em baixos níveis nas fases proliferativas. Durante o período de secreção do ovócito II, a detecção de mRNA *LIF* aumenta aproximadamente seis vezes, mostrando também uma significativa função na implantação blastocística humana (Figura 10) (Charnock-Jones *et al.*, 1994).



**Figura 10. Implantação blastocística.** (A) A secreção de LIF é realizada pelos epitélios luminal (EL) e glandular (EG) entre os dias 18-28 do ciclo menstrual de 28 dias. Sua secreção também é estimulada pela ativação dos linfócitos (que liberam IL-1 e TNF- $\alpha$ ) através do fluido seminal. LIF aumenta a capacidade de aderência entre as moléculas de adesão (MA) do endométrio primário e as moléculas presentes na camada trofoectoderma, localizada em torno do blastocisto; (B) À medida que o implante ocorre, LIF é produzido por trofoblastos extravilosos (TF) e por leucócitos deciduais, enquanto que os receptores de LIF estão presentes em trofoblastos intersticiais e endovasculares [adaptado de (Salamonsen *et al.*, 2010)].

LIF também foi descrito como indispensável para a adesão e diferenciação de células trofoblásticas. A ausência deste impede a diferenciação dos trofoblastos para fenótipos invasivos resultando em falha no remodelamento das artérias espirais, produzindo uma placentação anormal (Tapia *et al.*, 2008), fator marcante no desenvolvimento de PE.

Presente no cromossomo 22, o gene *LIF* está localizado na posição 22q12.2 e possui três éxons e dois íntrons (Stahl *et al.*, 1990). Foi descoberto em virtude de sua capacidade de induzir a diferenciação de macrófagos pertencentes à linhagem murina de leucemia mielóide M1 (Moreau *et al.*, 1988). O polimorfismo rs929271 presente no



gene *LIF* está localizado na região 3' não traduzida e é uma troca de uma base T por uma G. Embora poucas pesquisas com esse polimorfismo tenham sido realizadas, sabe-se que o alelo G é encontrado com uma frequência de 30% na população caucasiana. Os autores especulam que isto se deve ao fato de o alelo ter surgido nesta população após a saída do continente Africano. A presença da variante G do gene *LIF* foi relacionada à infertilidade de mulheres com idade inferior aos 35 anos (Kang *et al.*, 2009).

Diante dessas considerações, a presença das variantes genéticas dos genes *TP53*, *MDM2* e *LIF* alterariam o padrão apoptótico basal, ocasionando, dentre os diversos fatores, um déficit no remodelamento das artérias uterinas e redução da invasão dos trofoblastos. Devido à ausência de verificação do envolvimento destes polimorfismos com o desenvolvimento de PE, seria de fundamental importância um estudo de associação com esta condição.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo central deste trabalho é verificar a presença e frequência de polimorfismos nos diferentes genes envolvidos nas vias de estresse e apoptose em grávidas com PE.

### **2.2 Objetivos específicos**

Analisar as variantes polimórficas *BclI* (rs41423247) e *ER22/23EK* (rs6189/6190) no gene *NR3C1* e sua relação com o desenvolvimento de PE e seus diferentes desfechos;

Analisar a relação de polimorfismos em genes da cascata de apoptose (rs1042522, rs2279744 e rs929271 nos genes *TP53*, *MDM2* e *LIF*) no desenvolvimento de PE e seus desfechos.

### **3. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **3.1 The molecular role of glucocorticoid receptor polymorphisms in the development of preeclampsia**

Mauricio Busatto<sup>a</sup>, Diego Luiz Rovaris<sup>b</sup>, Bianca Telini<sup>a</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>a</sup> and Priscila Vianna<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Immunogenetics Lab, Department of Genetics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Genética Humana Molecular, Department of Genetics, Biosciences Institute, Porto Alegre, RS – Brazil

**Corresponding author:**

Priscila Vianna, PhD

Immunogenetics laboratory. Biosciences Institute, Department of Genetics.

Bento Gonçalves avenue - 9500, Campus do Vale. CEP 91501970, postcode: 15053.

Fone: +55 51 3316 6740; Fax: +55 51 3316 7311. Porto Alegre, RS – Brazil.

Email address: privianna@gmail.com\_(Vianna, P)

**Key words:** preeclampsia; glucocorticoid receptor; sensitivity and polymorphisms.

**Manuscrito em preparação.**

## **Abstract**

Pregnancy is marked by increased cortisol levels and often by disrupted functions of Hipotalamus-Pituitary-Andrenal (HPA) axis. Cortisol is a glucocorticoid hormone able to exert its effects by binding to glucocorticoids receptors (GR) presented in almost all body tissues. Preeclampsia (PE) is a pregnancy hypertension disease characterized by exacerbated inflammatory responses as well as by a disruption on the HPA axis. Some genetic variants of the GR gene alter the GR sensitivity to glucocorticoids (GC) and may participate in the induction of many diseases. We propose that GR gene polymorphisms (rs41423247 and rs6189/6190) correlate to PE development, since GC are key factors in pregnancy regulation. In order to evaluate this hypothesis, we genotyped 146 women presenting PE and 145 control subjects. The genotypic analysis were performed using PCR-RFLP. Our clinical features analysis revealed that PE women presented shorter pregnancy time, high body mass index (BMI) and high frequencies of cesarean delivery when compared to the control group. Besides, PE development was related to advanced maternal age. We also observed that PE women presented high frequencies of the allele encoding a hyper sensible GR when compared to control subjects. Instead, the control group showed elevated frequency of the allelic variant encoding the resistant GR. These results suggest that PE and control women respond in different manners to GC production. Also, when cases were subgrouped according to PE severity, a higher frequency of the GR allele was observed among women that developed mild PE. This could represent a more immediate induction of the effects of preeclampsia among PE women while the control women were more refractory to the PE inductors.

## Introduction

Pathological changes of mood often occur during pregnancy due to the constant fluctuation of gonadal hormones (Marcus, 2009). Both physical and psychosocial stress are able to trigger the release of glucocorticoid hormones (GC). These steroid hormones are produced through the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, being pivotal regulators of body functions and playing a role in stress responses. The main sources of GC are adrenals and thymus. Moreover, GC develops an important function in the metabolism of glucose, proteins, calcium, and in immune responses and cell growth. The effects of these hormones are mediated by binding to glucocorticoid receptors (GR) presented in the cytosol of all cell types (Tsigos & Chrousos, 2002). The binding of hormones to the GR results in its dimerization, activation and translocation to the nucleus where the GC/GR can associate to "Glucocorticoid Responsive Elements" (GRE) present in DNA or directly bind to different transcription factors, regulating target genes. Generally, the GC exerts anti-inflammatory effects and synthetic GC are one of the major drugs used in auto immune diseases treatment. The presence of stress conditions is often associated to complications during pregnancy like depression (Lancaster *et al.*, 2010), miscarriages (O'Hare & Creed, 1995), shorter length of gestation (Tegethoff *et al.*, 2010) and preeclampsia (PE) (Kurki *et al.*, 2000). Thus, it is essential to understand how the interaction between GC and its receptors can affect the pregnancy status.

PE is a hypertension disease in pregnancy, dangerous for both maternal and fetal health. It is characterized by gestational hypertension (systolic blood pressure  $\geq 140$  mmHg or diastolic blood pressure  $\geq 90$  mmHg) and significant proteinuria ( $>0.3\text{g}/24\text{h}$ ) (Steegers *et al.*, 2010). The PE symptoms should start after the 20th gestational week or disappear before 6 weeks postpartum. PE is classified as severe primarily when one or more of the following symptoms occur: blood pressure above 160/110 mmHg, maternal neurological disorders, acute pulmonary edema, proteinuria  $>0.5\text{g}/24\text{h}$ , thrombocytopenia ( $<100,000/\text{mm}^3$ ) and HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets) (Barra *et al.*, 2012; Uzan *et al.*, 2011). The etiological factors of PE development are not yet completely understood. It is believed that its pathophysiology involves genetic, immunological and angiogenic factors (Bdolah *et al.*, 2005). An increased risk for PE development is related to previous PE history, PE occurrence in first degree relatives, sexual partner change, longer intervals between

gestations and primiparity or advanced maternal age (Young *et al.*, 2010). Furthermore, some evidences support that emotional stress during pregnancy is also associated with the etiology of hypertension and PE (Leeners *et al.*, 2007)

The maternal cortisol levels increase through gestation and large quantities of cortisol during pregnancy are essential for fetal organs maturation (Mastorakos & Ilias, 2003). Until birth, 25% of all fetal cortisol are from maternal origin while 75% are produced by the fetus. Glucocorticoid receptors are expressed in fetal tissues from the 40<sup>th</sup> gestational day (Bertalan, 2009). However, high levels of cortisol exert antagonistic effects on maternal and fetal health. The bidirectional interactions between glucocorticoids and the immune system contribute to the susceptibility to pregnancy-related diseases (Wust *et al.*, 2004). During pregnancy, inflammatory immune responses have to be reduced, since it may lead to fetal rejection (Robinson & Klein, 2012). In addition, high levels of GC can induce an increase in blood pressure and endothelial dysfunction, both observed in women with PE.

Polymorphisms in the *NR3C1* gene, which encode GR (Encio & Detera-Wadleigh, 1991) have been associated with altered receptor sensitivity to GC (Gross *et al.*, 2009). Among several effects of cortisol, increased blood pressure (Lin *et al.*, 1999) and modified immune responses are some of the key actions that could be related with pregnancies complications like PE (Bdolah *et al.*, 2005). *NR3C1* gene encodes a GR molecule that belongs to the nuclear receptors 3 subfamily, group C, member 1 and is located on chromosome 5 at position 5q31.3. Polymorphic variants in *NR3C1* gene can lead to resistance or hypersensitivity to GC. Both changes can cause enormous damage to the body, altering the action of GC on its receptor and then modifying the mechanism of negative feedback (Gross *et al.*, 2009; van Rossum *et al.*, 2004b). An interesting genetic modification in the GR gene is the rs41423247 (*BclI*) polymorphism. Observed in a frequency of 33% in Netherlands population, this variant occurs in an intronic region (646bp downstream the start codon 2) and can modify mRNA splicing (Claes, 2009). This polymorphism is an exchange of a cytosine by a guanine nucleotide and the presence of the G allele was related to glucocorticoid receptor hypersensitivity to glucocorticoids (van Rossum *et al.*, 2003). Kumsta *et al.* (Kumsta *et al.*, 2007) and Wust *et al.* (Wust *et al.*, 2004) reported that man carrying the polymorphic variant G developed low HPA axis responses when exposed to psychosocial stress tests. Interestingly, women using oral contraceptives that carried the variant G showed high

levels of cortisol in response to the Trier Social Stress Test (Kumsta et al., 2007). Thus, the presence of the G allele in rs41423247 polymorphism has a sex-specific effect on the HPA axis activation. The GG genotype was also associated with high GC levels, reflecting a HPA axis deregulation. This genotype is related to increased abdominal obesity (Rosmond et al., 2000), reduced susceptibility to rheumatoid arthritis (van Oosten et al., 2010) and high risk for hypertension in young people (Watt et al., 1992). Increased GC levels affect blood pressure through two different mechanisms: 1) the first involves renal sodium retention that results in increased blood volume; 2) the second involves the increase of vasopressor responses to catecholamines and angiotensin II (Rhen & Cidlowski, 2005). These mechanisms can also be correlated to PE development.

Another molecular alteration in the *NR3C1* gene is the rs6189/6190 polymorphism (*ER22/23EK*). This involves alterations in both codons 22 and 23 of exon 2 (GAG AGG to GAA AAG) in a frequency of 4.5% in Netherlands population, that are in complete linkage disequilibrium. The first (rs6189) is a synonymous variant, coding to glutamic acid (E) while the second (rs6190) variant leads to a change from arginine (R) to lysine (K). This alteration results in a GR isoform more resistant to GC (van Rossum & Lamberts, 2004). Van Rossum *et al.* have shown that carriers of the rs6189/6190 polymorphism presented a resistance of the HPA axis feedback regulation, resulting in a favorable metabolic profile marked by higher serum concentrations of cortisol, low insulin levels, low LDL cholesterol and life expectancy (van Rossum *et al.*, 2002). Individuals carrying allele A of the rs6189/6190 polymorphism showed about 50% lower C-reactive protein levels (van Rossum *et al.*, 2004a) and low prevalence of hypertension (Mora *et al.*, 2012). Among children with attention deficit hyperactivity disorder, the allele A carriers presented lower mean salivary GC level in response to psychosocial stress, providing evidence for the relevance of this polymorphism in HPA axis regulation (van West *et al.*, 2010).

The susceptibility to stress is increased during pregnancy (Marcus, 2009). In response to stressful events, HPA axis enhances the production of CG that interacts with several organs and tissues, by binding to the GR, resulting in the control of several genes. The rs41423247 and rs6189/6190 polymorphisms in the *NR3C1* gene modulate GC sensitivity, potentially altering neuroimmunoendocrine responses to the stress. Here we hypothesized that pregnant women carrying the afore mentioned polymorphic

variants could respond in different ways to GC favoring (or not) the development of PE. In this work we analyzed the frequencies of polymorphisms in the GR gene in order to establish if they could be related to protection or susceptibility to PE development.



## Material and Methods

*Individuals:* The patients were recruited at the Maternity Unit of a public hospital in Southern Brazil (Hospital Nossa Senhora Conceição, Porto Alegre). We identified 145 healthy pregnant women with non-complicated pregnancies (controls) and 146 pregnant women who developed PE. The inclusion criteria for selecting patients were previously described by our group (Vianna *et al.*, 2007). All patients participating in this study gave their written informed consent, and the protocol was approved by the ethics committee of the Hospitalar Conceição Group (Porto Alegre, Brazil) and by the National Research Committee of Ethics (CONEP).

*Genotypic analysis:* To genotypic determination, we collected 5 ml of peripheral blood in EDTA. DNA extraction was performed using a salting out technique (Lahiri & Nurnberger, 1991). DNA samples were stored at -20°C.

*rs41423247 (BclI) polymorphism:* Genotyping was performed as previously described (van Rossum *et al.*, 2003). The C-G exchange at the nucleotide located 646bp downstream the start codon 2 of the *NR3C1* gene was evaluated by PCR-RFLP. The DNA were amplified using the following primers: 5'-GCTCACAGGGTTCTTGCCATA-3' and 5'-TTGCACCATGTTGACACCAAT-3' (*annealing temperature* = 62.0 °C). PCR-RFLP yields an 86bp fragment size subjected to restriction digestion with *BclI* enzyme at 50°C for 1 h. In the presence of allele G, cleavage resulted in a fragment of 43 bp. Fragments were visualized with ethidium bromide on a 8% acrylamide gel.

*rs6189/6190 (ER22/23EK) polymorphism:* Samples were genotyped for the functional GR polymorphisms *ER22/23EK* using a PCR-RFLP technique. The primers utilized were: 5'-GATTCGGAGTTAACTAAAAG-3' and 5'-ATCCCAGGTCATTTCCCATC-3' (*annealing temperature* = 52.0 °C) according to standard PCR protocols. The amplification generated a 442bp fragment. The PCR product was cleaved using the *MnII* enzyme at 37°C for 60 minutes. Wild type individuals presented the fragments 163+143+50+48+35+3bp, while heterozygous presented 178+163+143+50+48+35+3bp and the homozygous for the mutant allele presented the fragments 178+163+50+48+3bp. All fragments were visualized with ethidium bromide on 8% acrylamide gel.

*Statistical analysis:* The allele frequencies for the two *NR3C1* SNPs were evaluated for Hardy-Weinberg equilibrium, using Chi-square tests. Linkage

disequilibrium (LD) was assessed with the MLOCUS program (Long, 1999; Long *et al.*, 1995). Chi-square test and t-test were used to compare clinical parameters in different groups (control and PE). Binary and multinomial logistic regression analysis were used to calculate the effects of investigated SNPs (rs6189/6190 and rs41423247) on PE events, which were reported as odds ratio with 95% confidence interval (CI). Potential confounders (maternal age at delivery, maternal body mass index, smoking habit, ethnicity, gestational age, primiparity and number of previous miscarriages) were included as covariates when associated with the studied factors (at least one SNP) and outcome for a  $P < 0.20$ . The conventional 5% level was used to assess the significance.

## Results

The clinical characteristics of the studied group are listed in **Table 1**. Evaluating the genotype frequencies in both studied groups, all frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium (**Table 2**). Age and ethnicity were considered potential confounders, but maternal age at delivery, maternal body mass index, maternal smoking, primiparity and number of previous miscarriages did not. In the multiple binary logistic regression analysis, only age and the rs6189/6190 variant appeared to be predictors of PE (**Table 3**). The GA genotype was significantly more frequent in the control group (8.97%) than in the PE group (1.37%) [P = 0.012; OR: 0.14 (95 % CI: 0.03–0.65)]. No effect of rs41423247 SNP was detected. However, in the multinomial logistic regression model the rs41423247 GG genotype was associated with mild PE. Further, the GG genotype was significantly less frequent in the control group (8.3%) than in the mild PE group (21.6%) [P = 0.031; OR: 2.88 (95 % CI: 1.10 - 7.15), **Table 4**]. The rs6189/6190 variant turned out to be a significant predictor of mild PE.

## Discussion

Genetic alterations in *NR3C1* gene can modify the GR sensibility to GC. Single nucleotide polymorphisms in this gene can generate a more sensitivity or resistance isoform of GR to GC. These GR isoforms can affect the pregnancy profile by linking GC in different affinities. It is well known that pregnancy is marked by increased cortisol levels. This GC is able to induce fetal organ maturation, however, high cortisol levels could also be deleterious for mother and fetus health. We correlated the frequencies of SNPs in GR gene with PE development. To test our hypothesis, we analyzed 146 women presenting PE and 145 control women, with normal outcome in pregnancy. Our results suggested that rs6189/6190 polymorphism provides a protection to PE development, since it encodes a more resistant GR isoforma to GC. Otherwise, women that presented the rs41423247 polymorphism showed an elevated chance to the development of mild PE. Interestingly, the rs41423247 GG genotype is associated with a more sensitive GR isoform.

Analyzing the clinical characteristics of the studied groups we observed significant differences between PE and control subjects. PE women presented elevated BMI when compared to the healthy one. Our findings are in accordance to previous studies demonstrating a high incidence of PE in women with elevated BMI (Sohlberg *et al.*, 2012; Yazdani *et al.*, 2012). Besides, women with PE developed a shorter length gestation resulting in 36.11% of child presenting low-birth-weight (<2.500g). Tegethoff and collaborators have suggested that a shorter length of gestation is associated with prenatal stress, pointing out the role of stress in pregnancy (Tegethoff *et al.*, 2010). We also have previously suggested that distress conditions in pregnancy could induce the development of PE (Vianna *et al.*, 2011). In addition, PE increases the risk for fetal severe neonatal morbidity and mortality, which may be the result of placental ischemia (Villar *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2000). Another feature presented by the preeclamptic subjects was an elevated index of cesarean delivery when compared to the control group. It has been reported that PE contributes to the increased rate of cesarean delivery, since these women presented more pregnancy complications (Barber *et al.*, 2011).

After multiple binary logistic regression analysis we observed an increased chance of PE development related to maternal age, corroborating previous analyses (Stegers *et al.*, 2010). A similar result was observed in a large cohort of women from Latin American and Caribbean, in which the researchers speculated that the elevated

maternal age (>35 years) may be correlated to placental ischemia and the increase of sclerotic lesions in the myometrium arteries (Conde-Agudelo & Belizan, 2000). Another population study including 8,514 primiparous women showed that younger mothers (<16 years) had significantly decreased risk of developing PE (de Vienne *et al.*, 2009).

We also investigated the relationship between the rs6189/6190 polymorphism and PE outcome. This polymorphism was already related to a resistant isoform of GR to GC as well as resistance of the feedback regulation of the HPA axis (van Rossum *et al.*, 2002). Women carrying the allele A were less frequent in the group with PE when compared with the homozygous for the G allele. The variant A of the rs6189/6190 polymorphism could minimize the risk of gestational complications via different forms, such as: 1) inducing a better metabolic profile (van Rossum *et al.*, 2002), 2) reducing the vascular damage (Mora *et al.*, 2012), 3) reducing weight gain during pregnancy (Bertalan *et al.*, 2009a) and 4) significantly inhibiting cortisol responses against psychosocial stress (van West *et al.*, 2010). However, a Hungarian study composed by 300 healthy pregnant women and 150 PE women did not observe an association between the presence of the A allele in rs6189/6190 polymorphism and the PE development (Bertalan *et al.*, 2009b). These contradictory results suggest that more studies should be conducted to verify the potential action of this *NR3C1* gene polymorphism and its real interaction with different phenotypes.

We classified the PE subjects in three subgroups: women that developed mild PE, severe PE and previous hypertension. In a multinomial logistic regression model, we observed that women presenting the GG genotype of the rs41423247 polymorphism showed an elevated chance to develop the mild form of PE when compared with the control group. The presence of the variant G of the rs41423247 polymorphism was associated with hypersensitivity to glucocorticoids (van Rossum *et al.*, 2003) and with a worse metabolic profile (Rosmond *et al.*, 2000; Watt *et al.*, 1992). Maternal metabolic factors as high body mass index and low total vascular resistance have been highly related to the mild form of PE, while the origin of severe preeclampsia is often associated with an abnormal placentation (Conde-Agudelo & Belizan, 2000; Valensise *et al.*, 2008). In this way, we suggested that the rs41423247 polymorphism plays a fundamental role in the development of mild PE.

Proceeding with the analysis of logistic regression, we observed that Caucasian women are less prone to develop the severe form of PE when compared with women with African ancestry. The increased risk of PE development in African-descendants may be related to the high prevalence of hypertension in this ethnic group (Eskenazi *et al.*, 1991). Van der Tuuk *et al.*, have shown that non-Caucasian women with gestational hypertension or mild PE presented an odds ratio 2.05 of progression to a high risk situation (van der Tuuk *et al.*, 2011).

In summary, we suggest that the A allele in rs6189/6190 polymorphism provides a protection against the development of PE while the genotype GG of rs41423247 polymorphism enhanced the predisposition to develop the mild form of PE. Besides, Caucasian women are less prone to develop severe PE when compared with African-descendants. In addition, women who already have hypertension previously the gestation were more likely to develop the severe form of PE and that characteristic was associated to age. This was the first study in the American continent which demonstrated the relationship between polymorphisms in *NR3C1* gene and PE development. However, future advances in understanding the process of onset of PE should be provided. The evaluation of salivary cortisol levels as well as studies of functionality of the GR in women with PE may shed light on the outcome of the complex neuroimmunendocrine network presents in this disease.

## References

- Marcus SM. Depression during pregnancy: rates, risks and consequences--  
Motherisk Update 2008. *Can J Clin Pharmacol* 2009,**16**:e15-22.
- Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002,**53**:865-871.
- Lancaster CA, Gold KJ, Flynn HA, Yoo H, Marcus SM, Davis MM. Risk factors for depressive symptoms during pregnancy: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2010,**202**:5-14.
- O'Hare T, Creed F. Life events and miscarriage. *Br J Psychiatry* 1995,**167**:799-805.
- Tegethoff M, Greene N, Olsen J, Meyer AH, Meinlschmidt G. Maternal psychosocial adversity during pregnancy is associated with length of gestation and offspring size at birth: evidence from a population-based cohort study. *Psychosom Med* 2010,**72**:419-426.
- Kurki T, Hiilesmaa V, Raitasalo R, Mattila H, Ylikorkala O. Depression and anxiety in early pregnancy and risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000,**95**:487-490.
- Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010,**376**:631-644.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R, Ayoubi JM. Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 2011,**7**:467-474.
- Barra S, Cachulo MD, Providencia R, Leitao-Marques A. Hypertension in pregnancy: The current state of the art. *Rev Port Cardiol* 2012 **31**(6):425---432.
- Bdolah Y, Karumanchi SA, Sachs BP. Recent advances in understanding of preeclampsia. *Croat Med J* 2005,**46**:728-736.
- Young BC, Levine RJ, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 2010,**5**:173-192.
- Leeners B, Neumaier-Wagner P, Kuse S, Stiller R, Rath W. Emotional stress and the risk to develop hypertensive diseases in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2007,**26**:211-226.
- Mastorakos G, Ilias I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci* 2003,**997**:136-149.

Bertalan R. Molecular mechanisms influencing glucocorticoid and estrogen activity during the pregnancy. 2009.

Wust S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH. Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**:565-573.

Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav* 2012. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.02.023

Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1991;**266**:7182-7188.

Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2009;**300**:7-16.

Lin RC, Wang WY, Morris BJ. Association and linkage analyses of glucocorticoid receptor gene markers in essential hypertension. *Hypertension* 1999;**34**:1186-1192.

van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW, *et al.* Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;**61**:573-581.

Claes S. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *Ann N Y Acad Sci* 2009;**1179**:216-228.

van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, *et al.* Identification of the BclII polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;**59**:585-592.

Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, Wust S. Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 2007;**62**:863-869.

Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, *et al.* A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res* 2000;**8**:211-218.



van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, *et al.* Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010,**12**:R159.

Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, *et al.* Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 1992,**10**:473-482.

Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005,**353**:1711-1723.

van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 2004,**59**:333-357.

van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, *et al.* A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 2002,**51**:3128-3134.

van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, *et al.* Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med* 2004,**117**:158-162.

Mora M, Sanchez L, Serra-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, *et al.* Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataro Ageing Study. *Age (Dordr)* 2012,**34**:553-561.

van West D, Del-Favero J, Deboutte D, Van Broeckhoven C, Claes S. Associations between common arginine vasopressin 1b receptor and glucocorticoid receptor gene variants and HPA axis responses to psychosocial stress in a child psychiatric population. *Psychiatry Res* 2010,**179**:64-68.

Vianna P, Dalmaz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JA. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* 2007,**68**:668-674.

Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991,**19**:5444.

Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 1995,**56**:799-810.

Long JC. Multiple Locus Haplotype Analysis, Version 3.0. *Software and Documentation Distributed by the Author. Department of Human Genetics, University of Michigan, Ann Arbor.* 1999.

Yazdani S, Yosofniyapasha Y, Nasab BH, Mojaveri MH, Bouzari Z. Effect of maternal body mass index on pregnancy outcome and newborn weight. *BMC Res Notes* 2012,**5**:34.

Sohlberg S, Stephansson O, Cnattingius S, Wikstrom AK. Maternal body mass index, height, and risks of preeclampsia. *Am J Hypertens* 2012,**25**:120-125.

Vianna P, Bauer ME, Dornfeld D, Chies JA. Distress conditions during pregnancy may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Med Hypotheses* 2011,**77**:188-191.

Xiong X, Demianczuk NN, Buekens P, Saunders LD. Association of preeclampsia with high birth weight for age. *Am J Obstet Gynecol* 2000,**183**:148-155.

Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqeel H, *et al.* Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol* 2006,**194**:921-931.

Barber EL, Lundsberg LS, Belanger K, Pettker CM, Funai EF, Illuzzi JL. Indications contributing to the increasing cesarean delivery rate. *Obstet Gynecol* 2011,**118**:29-38.

Conde-Agudelo A, Belizan JM. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG* 2000,**107**:75-83.

de Vienne CM, Creveuil C, Dreyfus M. Does young maternal age increase the risk of adverse obstetric, fetal and neonatal outcomes: a cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009,**147**:151-156.

Bertalan R, Patocs A, Boyle B, Rigo J, Racz K. The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy. *Gynecol Endocrinol* 2009,**25**:379-382.

Bertalan R, Patocs A, Nagy B, Derzsy Z, Gullai N, Szappanos A, *et al.* Overrepresentation of BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene in pregnant women with HELLP syndrome. *Clin Chim Acta* 2009,**405**:148-152.

Kuningas M, Mooijaart SP, Slagboom PE, Westendorp RG, van Heemst D. Genetic variants in the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and cardiovascular disease risk. The Leiden 85-plus Study. *Biogerontology* 2006,**7**:231-238.

Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G, Novelli GP. Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension* 2008,**52**:873-880.

Eskenazi B, Fenster L, Sidney S. A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA* 1991,**266**:237-241.

van der Tuuk K, Koopmans CM, Groen H, Aarnoudse JG, van den Berg PP, van Beek JJ, *et al.* Prediction of progression to a high risk situation in women with gestational hypertension or mild pre-eclampsia at term. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2011,**51**:339-346.

Alarcon GS, Friedman AW, Straaton KV, Moulds JM, Lisse J, Bastian HM, *et al.* Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. LUpus in MInority populations: NAture vs. Nurture. *Lupus* 1999,**8**:197-209.

Chappell LC, Enye S, Seed P, Briley AL, Poston L, Shennan AH. Adverse perinatal outcomes and risk factors for preeclampsia in women with chronic hypertension: a prospective study. *Hypertension* 2008,**51**:1002-1009.

**Table 1** - Clinical characteristics of the study group

<b>Characteristics</b>	<b>PE (n= 146)</b>	<b>Control (n=145 )</b>	<b>P</b>
Maternal age at delivery (years) (M ± S.D)	30.50 ± 7.70	28.22 ± 7.36	0.011
Maternal body mass index (BMI) (M ± S.D)	32.80 ± 6.12	28.25 ± 4.72	<b>&lt;0.001</b>
Maternal smoking ( n; %)	27 (19.01)	31 (22.14)	0.516
Ethnic origin (n; % Caucasian)	101 (69.65)	112 (78.32)	0.094
Gestational age (week) (M ± S.D)	35.34 ± 3.81	38.37 ± 3.40	<b>&lt;0.001</b>
Birth weight of child (g) (M ± S.D)	2675.41 ± 923.91	3075.46 ± 708.27	<b>&lt;0.001</b>
Low birth weight (<2500 g) (n; %)	39 (36.11)	14 (16.09)	<b>0.001</b>
Cesarean delivery (n; %)	84 (69.42)	48 (39.35)	<b>&lt;0.001</b>
Vaginal delivery (n; %)	37 (30.58)	74 (60.65)	<b>&lt;0.001</b>
Primiparous women (n; %)	40 (27.77)	32 (22.38)	0.291
Miscarriages (n; %)			
yes	32 (22.53)	35 (25.18)	0.603
no	110 (77.47)	104 (74.82)	0.704

Data are represented as mean (M) ± S.D (standard deviation) or n (sample size) and frequency (%).

**Table 2** Genotype distribution and frequencies of the alleles

<i>PE Women</i> (%) <i>n =146</i>		<i>P</i>	<i>Controls</i> (%) <i>n=145</i>		<i>P</i>
<b>rs41423247 (<i>BclI</i>)</b>					
CC	64 (43.84)		CC	62 (42.76)	
CG	66 (45.21)	0.868 <sup>a</sup>	CG	70 (48.27)	0.278 <sup>a</sup>
GG	16 (10.95)		GG	13 (8.97)	
C allele	0.664		C allele	0.669	
G allele	0.336		G allele	0.331	
<b>rs6189/6190 (<i>ER22/23EK</i>)</b>					
GG	144 (98.63)		GG	132 (91.03)	
GA	2 (1.37)	0.933 <sup>a</sup>	GA	13 (8.97)	0.572 <sup>a</sup>
AA	0		AA	0	
G allele	0.993		G allele	0.955	
A allele	0.007		A allele	0.045	

<sup>a</sup> P value of the Hardy-Weinberg equilibrium test.

**Table 3** Effect of genotypes in the development of preeclampsia

Multiple binary logistic regression		
Variables	B (SE)	Odds Ratio (CI <sub>95%</sub> )
rs41423247 ( <i>Bcl1</i> )		
CC	0	1
CG	0.133 (0.423)	1.142 (0.499 - 2.617)
GG	-0.039 (0.260)	0.962 (0.578 - 1.601)
rs6189/6190 ( <i>ER22/23EK</i> )		
GG	0	1
GA	<b>-1.953 (0.778)</b>	<b>0.142 (0.031 - 0.652)<sup>a</sup></b>
Ethnicity		
African descent	0	1
Caucasian	-0.480 (0.283)	0.619 (0.355 - 1.078)
Age	<b>0.043 (0.016)</b>	<b>1.043 (1.010 - 1.078)<sup>b</sup></b>

The preeclampsia sample was coded as 1 and the control sample as 0 (reference category). <sup>a</sup>*P* = 0.012; <sup>b</sup>*P* = 0.010. Goodness of fit: Hosmer and Lemeshow, *P* = 0.960; Pseudo R Square: Nagelkerke: 0.086.

**Table 4** Multinomial logistic regression model for three preeclampsia categories and controls

Variable	Mild PE x Control		Severe PE x Control		Previous hypertension x Control	
	B (SE)	OR (CI <sub>95%</sub> )	B (SE)	OR (CI <sub>95%</sub> )	B (SE)	OR (CI <sub>95%</sub> )
<i>rs41423247 (BclII)</i>						
CC	0	1	0	1	0	1
CG	0.219 (0.368)	1.245 (0.605 - 2.563)	0.202 (0.355)	1.223 (0.610 - 2.452)	-0.437 (0.365)	0.646 (0.316 - 1.320)
GG	<b>1.058 (0.490)</b>	<b>2.880 (1.103 - 7.519)<sup>a</sup></b>	-0.115 (0.630)	0.892 (0.260 - 3.062)	-1.668 (1.069)	0.189 (0.023 - 1.533)
Ethnicity						
African descent	0	1	0	1	0	1
Caucasian	-0.350 (0.382)	0.705 (0.333 - 1.490)	<b>-0.895 (0.362)</b>	<b>0.409 (0.201 - 0.830)<sup>b</sup></b>	-0.243 (0.414)	0.784 (0.348 - 1.767)
Age	0.021 (0.022)	1.022 (0.977 - 1.068)	(0.017 (0.022)	1.017 (0.974 - 1.062)	<b>0.103 (0.025)</b>	<b>1.108 (1.054 - 1.165)<sup>c</sup></b>

<sup>a</sup> $P = 0.031$ ; <sup>b</sup> $P = 0.013$ ; <sup>c</sup> $P < 0.001$ . Goodness of fit: Pearson,  $P = 0.960$ ; Pseudo R Square: Nagelkerke: 0.135. PE sample N = 146; 51 mild PE,

49 severe PE and 46 previous hypertension; Control sample N = 145. Because only two *ER22/23EK* heterozygotes were identified in PE group,

we no include this polymorphism in analyze.

### **3.2 Apoptosis in preeclampsia: are there any effects of *TP53*, *MDM2* and *LIF* polymorphisms in disease development?**

Mauricio Busatto, BsC<sup>1\*</sup>, Lucas Fraga BsC<sup>2,3\*</sup>, Diego Luiz Rovaris, BsC<sup>4</sup>, Juliano André Boquett BsC<sup>2,3</sup>, Lavínia Schuler Faccini, PhD<sup>2,3</sup>, José Artur Bogo Chies, PhD<sup>1</sup> and Priscila Vianna, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Immunogenetics Lab, Department of Genetics, Biosciencias Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS,

<sup>2</sup>Department of Genetics, Biosciencias Institute, UFRGS, Porto Alegre, RS,

<sup>3</sup>National Institute of Science and Technology in Populational Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, RS,

<sup>4</sup>Laboratório de Genética Humana Molecular, Department of Genetics, Biosciencias Institute, Porto Alegre, RS, – Brazil

\* Both authors equally contributed to this work

**Correspondence to: (Priscila Vianna, PhD).** Rio Grande do Sul Federal University, Biosciencias Institute, Department of Genetics, Immunogenetic lab. Bento Gonçalves av – 9500, Campus do Vale. Cep 91501970, postcode: 15053.

Fone: +55 51 3316 6740; Fax: +55 51 3316 7311. - PORTO ALEGRE, RS – Brazil. Email address: privianna@gmail.com\_(Vianna, P)

**Conflict of interest statement:** the authors declare no conflict of interest

**Type:** brief Communications

**Manuscrito em preparação.**



## **Abstract**

Preeclampsia (PE) is a multisystemic disorder and its exact physiology is not well known. PE is responsible by great maternal/fetal mortality and morbidity. Hypertension and proteinuria are the major players in this pathology. Apoptosis has a pivotal role in PE development, since an elevated rate of cell death is related to the development of PE. We evaluated for the first time the frequency of three polymorphisms in central genes of the apoptosis pathway (*MDM2* rs2279744, *TP53* rs1042522 and *LIF* rs929271) and PE development. We genotyped 119 women suffering PE and 99 age-matched women without preeclampsia. The genotyping was performed by allelic discrimination using a Taqman SNP genotype analyzer. Logistic regression analyses were used to calculate the effects of clinical features. After logistic regression analyses no relationship among the studied polymorphisms and PE development was observed. Although we were not able to evidence associations between the genetic variants studied and preeclampsia development, we cannot rule out a role of these polymorphisms on hypertensive disorders of pregnancy, like PE.

**Keywords:** apoptosis; preeclampsia; p53 polymorphisms

## Introduction

Preeclampsia (PE) is one of the most important hypertensive disorders during pregnancy, being responsible for almost 26% of maternal deaths in Latin America and the Caribbean. Its etiology and pathogenesis involve a combination of maternal-fetal genetic and immunological factors (Stegers *et al.*, 2010). However, the exact cause of PE remains unknown. PE has a complex pathophysiology, involving abnormal placentation and implantation impairment. This pathology is related to increased prevalence of predisposing disorders, such as chronic hypertension, diabetes, and obesity. Another factor related to PE is the presence of immune cells secreting inflammatory cytokines which induces apoptosis of the extravillous cytotrophoblast (Uzan *et al.*, 2011). Despite the fact that the exact mechanisms of PE development are not yet known, pathways related to the immune system, apoptosis and angiogenesis have been the subject of studies as potential etiological factors of PE development.

Apoptosis, a form of programmed cell death, is a central process in organism homeostasis, being important in tissue remodeling and elimination of unwanted cells. During pregnancy, the trophoblast cells invade the maternal decidua and remodel the spiral arteries, allowing stability to the placenta. In normal pregnancies, apoptosis play a role in the appropriate placental development. However, exacerbated apoptosis is often related to complications of pregnancy (Sharp *et al.*, 2010).

Apoptosis is regulated by a wide range of proteins, acting in a coordinated process. The tumor suppressor protein p53 (p53) is a powerful transcription factor that regulates a set of target genes that initiate and control cellular responses including cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis and angiogenesis (Hu, 2009). Its activation is determined by stress events, such as hypoxia. The P53 protein can be negatively modulated by its inhibitor, the Mdm2 protein, that downregulates p53 through ubiquitination, leading to its degradation. Moreover, p53 plays a role in reproduction, regulating the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) during the implantation process. LIF is a multifunctional cytokine secreted into the uterine lumen that binds to its receptors on the surface of epithelial cells, preparing the uterus to be receptive to blastocyst implantation (Dimitriadis E, 2010). Moreover, LIF is an important factor for gestational success controlling integrin molecules presented at the extravillous trophoblast and by remodeling blood vessels.

Considering the involvement of p53 in the apoptosis pathway and the fact that PE is a disorder characterized by exacerbated apoptosis, genes coding for proteins involved on such pathway are good candidates to association studies with this condition. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in genes at critical nodes in the apoptotic pathway, including *TP53*, *MDM2* and *LIF*. A well recognized SNP in the *TP53* gene at codon 72 [RefSNP accession ID (rs)1042522], results in either an arginine (R72) or a proline (P72) residue. The p53 P72 allele is weaker than the R72 allele in inducing apoptosis. Regarding the *MDM2* gene, an important SNP (SNP309) (rs2279744) consisting in a T to G change in intronic promoter region, increases Mdm2 expression protein levels and leads to attenuation of p53 function. Moreover, a SNP (a T to G change) at 3'UTR of human *LIF* gene (rs929271) has been associated with human reproduction, where an enrichment of the G allele (the minor allele) is observed among patients searching for *in vitro* fertilization (IVF). Besides, in the presence of p53 P72 allele LIF levels are significantly reduced, linking both molecules and pregnancy (Hu, 2009).

We suggest that molecular control of apoptosis is critical for the development of PE. Given that the p53 protein is a pivotal regulatory molecule of apoptosis, polymorphisms at the *TP53* gene could generate a less functional protein, altering apoptosis during PE. In addition, *MDM2* SNP309 polymorphism could result in increased Mdm2 protein levels, reducing the rate of apoptosis (Hu *et al.*, 2008), favoring a regulated environment during PE. In contrast, the *LIF* polymorphism may induce a deficient remodeling of vessels in placenta, allowing a hypoxic environment, resulting in activation of *TP53* gene, triggering apoptosis. Therefore, analyses of such variants in preeclamptic women could shed light on the mechanisms of apoptosis and tissue remodeling that occurs at the placenta during pregnancy.

Although some studies have already addressed the role and effects of different p53 protein levels on apoptosis, there are no studies evaluating polymorphisms in genes of apoptosis pathway and its correlation with PE development. Thus, the goal of the present study was to evaluate, for the first time, the aforementioned polymorphisms in the context of preeclampsia.

## Methods

*Subjects:* Patients were recruited at the Maternity Unit of a public hospital (Hospital Nossa Senhora da Conceição) in Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil. We selected 99 healthy pregnant women with non-complicated pregnancies (controls) and 119 subjects presenting PE. The inclusion/exclusion criteria for selecting controls included: no rise in blood pressure, no hypertension or proteinuria, similar age (healthy women  $28.08 \text{ yrs} \pm 7.37$  and PE women  $30.32 \text{ yrs} \pm 7.46$ ), no biological relationship and a delivery date as close as possible to the delivery date(s) of the matched patient group. Controls were followed up for at least three months after delivery. If hypertension and/or proteinuria were observed during this follow up period, this specific control individual was excluded. Preeclampsia was defined as the presence of hypertension and proteinuria. Hypertension is characterized by blood pressure of at least 140 mm Hg (systolic) or at least 90 mm Hg (diastolic), on at least two occasions and 4–6 h apart following the 20th week of gestation in women known to be normotensive beforehand (Brown *et al.*, 2000; Sibai, 2003). Proteinuria is defined as an excretion of 300 mg or more of protein every 24 h. If 24-h urine samples were not available, proteinuria was defined as a protein concentration of 300 mg/L or more ( $\geq 1+$  on dipstick) in at least two random urine samples taken at least 4–6 h apart following the 20th week of gestation (Sibai, 2003). The PE was classified as severe when there was a blood pressure  $\geq 160/110$  mmHg; or urinary protein excretion  $\geq 5\text{g}$  per 24h; a platelet count of  $<100\ 000\text{mm}^{-3}$  in at least two samples; the combination of haemolysis, abnormal liver enzymes associated with persistent epigastric or upper right quadrant pain; persistent and severe symptoms as altered mental status, headaches, blurred vision or blindness; presence of multiorgan involvement such as pulmonary edema, oliguria ( $<500\text{mL}$  per day) (Lowe *et al.*, 2009; Milne *et al.*, 2005). Women who had chronic hypertension, renal disease, collagen vascular diseases, cancer or thrombosis were not included in the study. All patients gave their written informed consent, and the procedures were approved by the local ethics committee of the Hospital Nossa Senhora da Conceição and by CONEP (National Committee of Ethics on Research, Brazil).

*Genotypic analysis:* To genotypic determination, 5 ml of peripheral blood was collected in EDTA and DNA extraction was performed by a salting out technique, followed by phenol-chloroform extraction (Lahiri & Nurnberger, 1991). SNPs from the *TP53* (P72R, rs1042522), *MDM2* (SNP309, rs2279744) and *LIF* (3'UTR - T>G, rs929271)

genes were genotyped by allelic discrimination using a Taqman SNP genotype analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, California, US), according to manufacturer directions.

*Statistical analysis:* Chi-square test and t-Test were used to characterize and compare clinical parameters in different groups (control and case). Logistic regression analyses were used to calculate the effects of investigated factors (rs1042522, rs2279744 and rs929271) on preeclampsia events, which were reported as odds ratio with 95 % CI (confidence intervals). Potential confounders (maternal age at delivery, maternal body mass index, maternal smoking, ethnicity, gestational age, primiparity and number of previous miscarriages) were included as covariates when associated with the studied groups (or at least one of them) and with the outcome for a  $P < 0.20$ . Statistical significance was considered when  $P < 0.05$ . The statistical analyses were performed with SPSS 17.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, US) or with GraphPad Software (San Diego, California, US).

## **Results**

It is important to note that our sample was well characterized according to clinical parameters, which is highlighted by the fact that PE women presented high index of cesarean, primiparity and elevated frequencies of low birth weight when compared to control pregnant women (cesarean: 72.28% in PE vs 41.17% in control,  $p < 0.05$ ; primiparity: 28.57% in PE vs 18.19% in control,  $p < 0.05$ ; low birth weight: 36.11% in PE vs 16.09% in control,  $p < 0.05$ ). Genotypic frequencies for all tested polymorphisms do not deviate from Hardy-Weinberg expectations (*TP53*:  $\chi^2=0.695$ ;  $p=0.404$ ; *MDM2*:  $\chi^2=0.386$ ;  $p=0.534$  and *LIF*:  $\chi^2=0.073$ ;  $p=0.787$ ) in both PE and control groups. Ethnicity was associated with PE in simple regression analysis, suggesting and confirming that afro-derived women are more prone to develop PE (Caughey *et al.*, 2005) (OR= 1.662, CI= 1.008-2.740,  $p=0.046$ , Table 1). However, this significance was lost after multiple logistic regression analyses. No association was observed between all apoptotic genes polymorphisms analyzed and PE development (Table 1) through simple or multiple logistic regression.

## **Discussion**

Some studies already described the importance of polymorphisms in apoptotic genes pathway on pregnancy diseases and/or the reproduction profile. Focusing on the role of *TP53* polymorphisms in regulation of reproduction, Fang *et al.* related the presence of allele C (codon 72 *TP53* gene) with an increase risk of occurrence of missed abortion in Asian women (Fang *et al.*, 2011). However, no association between this *TP53* polymorphism and PE was observed in the present study (Table 1), suggesting that this allele is not a good predictor for PE development. Corroborating our results, Coulam *et al.* described that the p53 codon 72 polymorphism is not a susceptibility factor in recurrent pregnancy loss (Coulam *et al.*, 2006).

Despite the fact that the *MDM2* GG genotype have already been associated with human reproduction (missed abortion) (Fang *et al.*, 2011), our results did not correlate the occurrence of the studied *MDM2* polymorphism with PE. In a classical study, Cheung *et al.* (Cheung *et al.*, 1999) also found no association between *MDM2* polymorphisms and clinical progress of patients with hydatidiform moles. Concerning the *LIF* polymorphism, Ei Hasegawa *et al.* (Ei Hasegawa, 2012) suggested that mRNA levels of LIF are decreased in women with abnormal uterine cavities, addressing the role of LIF in pregnancy establishment. However, no association between rs929271 and PE development was observed in our sample.

Given that this is the first study correlating the polymorphisms in apoptotic genes and preeclampsia, we cannot ignore the existence of a relationship between PE and polymorphic alterations in these genes. In addition, the absence of association here observed could reflect post-transcriptional events that could affect the mRNA viability/stability as well as the protein formation. Besides, the limited sample size could favor the risk of a type II error. The power to detect an odds ratio of 1.25 was only 50% ( $\alpha = 0.05$ ).

Although we were not able to evidence associations between the genetic variants studied and preeclampsia development, we cannot rule out a role of these polymorphisms on hypertensive disorders of pregnancy, like PE. Analyses on placental tissues could elucidate the local interactions between the molecules coded by those apoptosis pathway genes and PE development. In this way, further studies are necessary to clarify the exact molecular mechanisms involved in the regulation of apoptotic genes and PE development.

**Acknowledgements:** This study was supported by “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq, Brazil) and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES, Brazil).

## References

- Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, Peek MJ, Rowan JA and Walters BN (2000) The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 40:133-138.
- Caughey AB, Stotland NE, Washington AE and Escobar GJ (2005) Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 106:156-161.
- Cheung AN, Shen DH, Khoo US, Chiu MP, Tin VP, Chung LP and Ngan HY (1999) Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumor suppressor gene in gestational trophoblastic disease: correlation with mdm2, proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Int J Gynecol Cancer* 9:123-130.
- Coulam CB, Kay C and Jeyendran RS (2006) Role of p53 codon 72 polymorphism in recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 12:378-382.
- Dimitriadis E ME, Salamonsen LA, Paiva P (2010) LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *placenta* 31 Suppl:S99-104.
- Ei Hasegawa HI, Fumiko Hasegawa, Keiko Hatano, Masahiro Kazuka, Saburo Usuda and Keiichi Isaka (2012) Expression of leukemia inhibitory factor in the endometrium in abnormal uterine cavities during the implantation window. *Fertility and Sterility*:953-958.
- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D and Qu X (2011) The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion. *Hum Reprod* 26:1252-1258.
- Hu W (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001073.
- Hu W, Feng Z, Atwal GS and Levine AJ (2008) p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle* 7:848-852.
- Lahiri DK and Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lowe SA, Brown MA, Dekker GA, Gatt S, McLintock CK, McMahan LP, Mangos G, Moore MP, Muller P, Paech M *et al.* (2009) Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 49:242-246.



Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C, de Swiet M, Fletcher G, Jokinen M, Murphy D *et al.* (2005) The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ* 330:576-580.

Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP and Mor G (2010) Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol* 64:159-169.

Sibai BM (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 102:181-192.

Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ and Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. *Lancet* 376:631-644.

Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R and Ayoubi JM (2011) Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 7:467-474.

**Table 1 | Effect of genotypes in the development of preeclampsia (n=119 PE and n=99 control)**

Variables	Simple Analysis					Multiple Analysis <sup>a,b,c</sup>				
	B	S.E.	Odds Ratio (CI 95%)	P	B	S.E.	Odds Ratio (CI 95%)	P		
rs1042522 ( <i>TP53</i> )										
CC			I				I			
CG	0.108	0.287	1.114 (0.635-1.954)	0.708	-0.087	0.298	0.917 (0.511-1.646)	0.772		
GG	0.607	0.423	1.834 (0.801-4.199)	0.151	0.592	0.461	1.808 (0.733-4.459)	0.198		
rs2279744 ( <i>MDM2</i> )										
TT			I				I			
TG	0.389	0.290	1.476 (0.836-2.604)	0.179	0.521	0.302	1.683 (0.931-3.044)	0.085		
GG	-0.175	0.419	0.839 (0.369-1.908)	0.676	-0.075	0.430	0.927 (0.399-2.156)	0.861		
rs929271 ( <i>LIF</i> )										
TT			I				I			
TG	0.327	0.285	1.387 (0.793-2.425)	0.251	0.446	0.301	1.562 (0.866-2.819)	0.139		
GG	-0.020	0.440	0.980 (0.414-2.322)	0.964	0.093	0.458	1.097 (0.448-2.691)	0.839		
Ethnicity	0.508	0.255	1.662 (1.008-2.740)	<b>0.046</b>	0.334	0.316	1.397 (0.751-2.597)	0.291		

The preeclampsia sample was coded as 1 and the control sample as 0 (reference category).

*TP53*, tumor protein p53 gene; *MDM2*, p53 binding protein homolog gene; *LIF*, leukemia inhibitory factor gene.

<sup>a</sup>Hosmer and Lemeshow test,  $P = 0.533$  (chi-square 7.038, degrees of freedom = 8); pseudo- $R^2$ : Cox & Snell = 0.041, Nagelkerke = 0.055; significance of model: Omnibus test,  $P = 0.242$  (chi-square 9.149, degrees of freedom = 7).

<sup>b</sup>Interaction terms between SNPs were analyzed (manual backward elimination), but none was significant.

<sup>c</sup>The homozygous for minor alleles were grouped with heterozygous and all logistic regression models were repeated. No change of results was

#### 4. DISCUSSÃO DA DISSERTAÇÃO

A PE é uma doença multifatorial cuja completa etiologia ainda não foi esclarecida. Dentre vários fatores, o desenvolvimento de PE tem sido relacionado com componentes genéticos, imunológicos e angiogênicos (Bdolah *et al.*, 2005). Um elevado índice de proteínas apoptóticas em células da placenta também tem sido descrito como fator de risco para o desenvolvimento de complicações gestacionais, como a PE (Heazell *et al.*, 2011). Na América latina 16% das grávidas desenvolvem PE (Duley, 2009). No estado do Rio Grande do Sul 18,5% das mortes obstétricas diretas estão relacionadas com doenças hipertensivas (Freitas *et al.*, 2006), mostrando que esta doença é altamente incidente. É de fundamental importância a sequência da investigação dos fatores associados a esta desordem hipertensiva com o objetivo de elucidar os mecanismos imunogenéticos envolvidos e prevenir sua ocorrência.

Tanto o estresse físico quanto o psicossocial aumentam a produção de cortisol, através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O cortisol é um importante hormônio regulador, atuando em quase todos os tecidos do corpo humano e seus efeitos são mediados pela ligação aos receptores de glicocorticóides (GR). Polimorfismos no gene *NR3C1*, que codifica o receptor de glicocorticóide, já foram associados com o aumento da sensibilidade e resistência do receptor ao cortisol. Dentre os diversos efeitos do cortisol, o aumento da pressão arterial e sua imunorregulação são alguns dos principais fatores que poderiam estar relacionados com o desenvolvimento de pré-eclâmpsia. Desta forma, resolvemos investigar se as frequências dos polimorfismos rs6189/6190 (*ER22/23EK*) e rs41423247 (*BclII*) no gene *NR3C1* poderiam estar relacionadas ao desenvolvimento de PE.

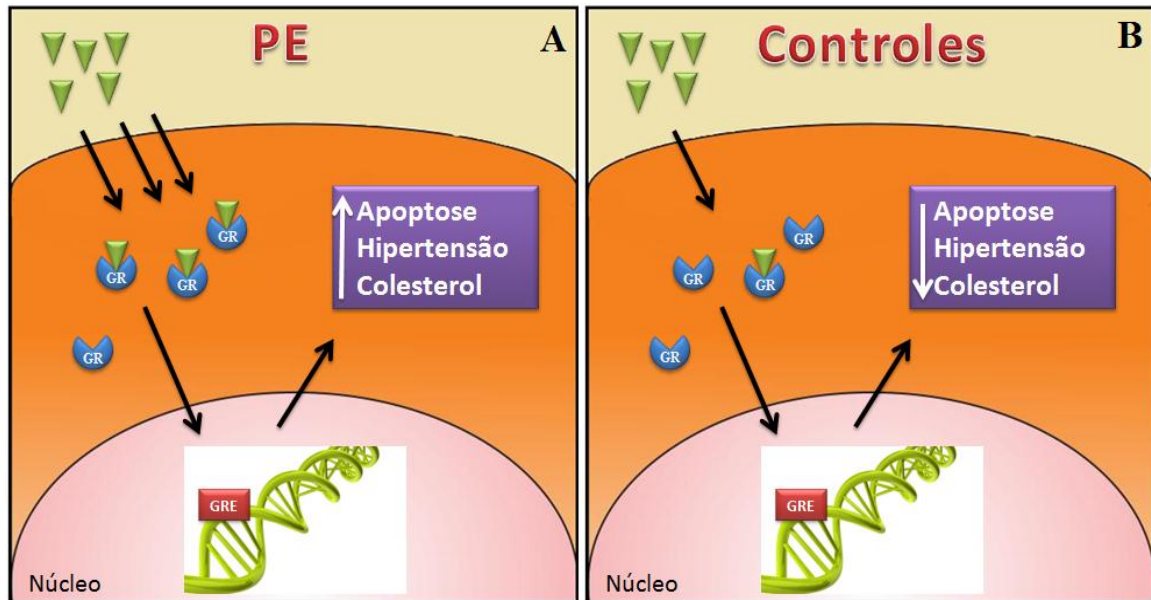
Observamos que a presença do polimorfismo rs6189/6190 em mulheres que não desenvolveram PE foi significativamente maior. A variante relacionada com um receptor de glicocorticóide mais resistente é mais frequente em pessoas com um melhor perfil metabólico (van Rossum *et al.*, 2002). Menores níveis tensionais (Mora *et al.*, 2012), aumento da sensibilidade à insulina e níveis reduzidos de LDL e colesterol total (van Rossum *et al.*, 2002) estão associados com a variante do códon 23, podendo reduzir as chances de se desenvolver complicações gestacionais como a PE. Discutimos este resultado com cautela, já que a PE é uma doença multifatorial e que apenas a presença de

uma alteração gênica seria um fator improvável na completa proteção das gestantes contra o desenvolvimento desta patologia.

Já o polimorfismo rs41423247 está relacionado com um receptor de glicocorticóide mais sensível, ou seja, mesmo em menores níveis de cortisol o GR será ativado (van Rossum *et al.*, 2003). Estudos associam a presença da variante G com um aumento na pressão arterial (Srivastava *et al.*, 2011), pior perfil metabólico (Watt *et al.*, 1992), obesidade abdominal e um efeito sexo específico na desregulação do eixo HPA em mulheres (Rosmond *et al.*, 2000). Desta forma, propusemo-nos a estudar a presença deste polimorfismo nos grupos de pacientes com PE e controles. Nenhuma diferença significativa foi observada entre casos e controle, porém observamos uma frequência significativamente elevada do mesmo em pacientes com PE leve. Acreditamos que a relação entre o desenvolvimento de PE leve e a presença da variante G se deva ao fato de que, o desfecho menos agressivo da doença poderia estar relacionado com o perfil metabólico. Como o alelo G tem sido associado a fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de PE, como o aumento da pressão arterial e dos níveis de colesterol, sua maior frequência no grupo que desenvolveu PE leve pode estar relacionado ao fato do alelo caracterizar um perfil metabólico desbalanceado, enquanto que a forma grave da PE está associada a fatores como a falha no desenvolvimento normal da placenta, que resulta em uma menor perfusão sanguínea desencadeando assim disfunções endoteliais e inflamação (Valensise *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 1992).

Embora essencial para uma placentação normal, a apoptose em excesso tem sido relacionada ao desenvolvimento de diversas patologias gestacionais, como a PE (Sharp *et al.*, 2010). Mulheres durante a gestação são mais vulneráveis ao estresse (Marcus, 2009) e este é considerado um fator de risco para doenças gestacionais (Lancaster *et al.*, 2010). Sabe-se que níveis elevados de cortisol, em resposta ao estresse, estão associados ao início da cascata apoptótica via ativação da transcrição de genes específicos. O receptor de glicocorticóide ativado se liga diretamente por *cis*-ativação nos elementos responsivos ao glicocorticóide (GRE), os quais agem como elementos aceleradores (*enhancer*). Esta indução da transcrição leva ao aumento da expressão de genes envolvidos na sinalização da apoptose (Greenstein *et al.*, 2002). Dessa forma, lançamos a hipótese (Figura 11) de que mulheres grávidas, que naturalmente apresentam uma maior predisposição ao estresse, quando desenvolvem PE exibem um significativo aumento de cortisol que poderia

contribuir para uma taxa apoptótica exacerbada. Porém, a comprovação desta hipótese vai além de estudos moleculares, abrangendo a inclusão de estratégias que mensurem os níveis de cortisol urinário ou salivar, além de uma completa avaliação psicológica.



**Figura 11. Hipótese.** (A) Devido à forma hipersensível do GR, as gestantes com PE são mais responsivas aos efeitos da ligação GC/GR no núcleo, sendo mais propensas a desenvolver PE. Quando ativado, o GR se liga à região no DNA que contém os elementos responsivos ao glicocorticóide (GRE). Estes elementos induzem a expressão de genes envolvidos na sinalização da apoptose e de genes responsáveis por um pior perfil metabólico. (B) Grávidas controles apresentam um GR mais resistente e mesmo na presença de grandes quantidades de cortisol, as células não se tornam tão responsivas e um melhor perfil metabólico é verificado.

A proteína p53 é amplamente conhecida como ativadora da via da apoptose (Whibley *et al.*, 2009) e em condições celulares normais é regulada negativamente pela proteína Mdm2 (Itoh & Shimizu, 1998). Mulheres com complicações gestacionais apresentaram um aumento significativo de mRNA *TP53* em sinciotrofoblastos (Heazell *et al.*, 2011), células fundamentais para a implantação e remodelamento das artérias espirais (Zhou *et al.*, 1997). Recentemente, a p53 foi descrita na regulação de LIF, citocina que medeia o processo de implantação blastocística no endométrio (Hu *et al.*, 2007). LIF também auxilia na diferenciação dos trofoblastos para fenótipos invasivos que participam no processo de remodelamento das artérias espirais para uma perfusão placentária normal (Tapia *et al.*, 2008).

Polimorfismos nos genes *TP53*, *MDM2* e *LIF* tem sido associados com doenças ginecológicas e obstétricas como a endometriose (Gallegos-Arreola *et al.*, 2012), aborto (Fang *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011), câncer de endométrio (Ashton *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011) e infertilidade em mulheres com idade inferior a 35 anos (Kang *et al.*, 2009). Com base nos trabalhos descritos na literatura, acreditamos que a presença dos polimorfismos rs1042522, rs2279744 e rs929271 (nos genes *TP53*, *MDM2* e *LIF*, respectivamente) poderiam contribuir para uma falha no remodelamento placentário favorecendo uma resposta inflamatória e consequente disfunção endotelial (Borzychowski *et al.*, 2006) podendo estar relacionados a um aumento nas chances do desenvolvimento de PE.

Nosso estudo não encontrou associação entre os polimorfismos em genes da cadeia apoptótica e PE, sugerindo que esta abordagem molecular não seja preditora de risco para o desenvolvimento de PE. Apesar de o polimorfismo no gene *MDM2* já ter sido associado com aborto recorrente (Fang *et al.*, 2011), a ausência de relação do mesmo com este desfecho também foi verificada (Coulam *et al.*, 2006). Em um estudo clássico, este mesmo polimorfismo não foi associado com o desenvolvimento de mola hidatiforme (Cheung *et al.*, 1999). Considerando o polimorfismo no gene *LIF*, um decréscimo nos níveis de mRNA *LIF* foi descrito em mulheres com cavidades uterinas anormais (Ei Hasegawa, 2012), porém avaliando nosso grupo amostral, não obtivemos associação entre o polimorfismo de *LIF* e o desenvolvimento de PE.

Por mais que não tenhamos encontrado relação significativa em nossos resultados avaliando os genes apoptóticos, não descartamos a importância destes polimorfismos no desenvolvimento de PE. A análise molecular em uma amostra populacional mais robusta, além de, em diferentes etnias pode contribuir para a compreensão de um provável papel destes polimorfismos no desenvolvimento da PE. Nossos resultados representam mais um passo em direção à resolução da complexa etiologia da PE. Como perspectivas, sugerimos análises dos níveis de expressão de mRNA e das alterações epigenéticas em tecidos da placenta, além da dosagem de cortisol e quantificação de marcadores de estresse oxidativo em grávidas que apresentem níveis elevados de cortisol circulante. Ressaltamos ainda que análises do perfil psicológico das gestantes serão de extrema relevância.

## 5. REFERÊNCIAS

- Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2:420-430.
- Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds I, McEvoy M, Attia J, Gilbert M, Hamann U and Scott RJ (2009) Polymorphisms in TP53 and MDM2 combined are associated with high grade endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 113:109-114.
- Barber EL, Lundsberg LS, Belanger K, Pettker CM, Funai EF and Illuzzi JL (2011) Indications contributing to the increasing cesarean delivery rate. *Obstet Gynecol* 118:29-38.
- Barra S, Cachulo MD, Providencia R and Leitao-Marques A (2012) Hypertension in pregnancy: The current state of the art. *Rev Port Cardiol*.
- Baschant U and Tuckermann J (2010) The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 120:69-75.
- Bauer ME, Gauer GJ, Luz C, Silveira RO, Nardi NB and von Muhlen CA (1995) Evaluation of immune parameters in depressed patients. *Life Sci* 57:665-674.
- Bdolah Y, Karumanchi SA and Sachs BP (2005) Recent advances in understanding of preeclampsia. *Croat Med J* 46:728-736.
- Bell E (2004) Reproductive immunology: A bad combination. *Nat Rev Immunol* 4.
- Bertalan R (2009) Molecular mechanisms influencing glucocorticoid and estrogen activity during the pregnancy.
- Bertalan R, Patocs A, Boyle B, Rigo J and Racz K (2009a) The protective effect of the ER22/23EK polymorphism against an excessive weight gain during pregnancy. *Gynecol Endocrinol* 25:379-382.
- Bertalan R, Patocs A, Nagy B, Derzsy Z, Gullai N, Szappanos A, Rigo J, Jr. and Racz K (2009b) Overrepresentation of BclII polymorphism of the glucocorticoid receptor gene in pregnant women with HELLP syndrome. *Clin Chim Acta* 405:148-152.
- Bhatt H, Brunet LJ and Stewart CL (1991) Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11408-11412.
- Bianco B, Christofolini DM, Brandes A, Lerner TG, Goncalves-Filho RP, Souza AM and Barbosa CP (2011) [Analysis of codon 72 polymorphism of the TP53 gene in infertile women with and without endometriosis]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 33:37-42.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P *et al.* (2004) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591-602.
- Borzychowski AM, Sargent IL and Redman CW (2006) Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med* 11:309-316.
- Brown MA, Hague WM, Higgins J, Lowe S, McCowan L, Oats J, Peek MJ, Rowan JA and Walters BN (2000) The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: executive summary. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 40:133-138.
- Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP and Georgiev GP (1988) A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 70:245-252.
- Bulla R, Bossi F, Radillo O, de Seta F and Tedesco F (2003) Placental trophoblast and endothelial cells as target of maternal immune response. *Autoimmunity* 36:11-18.

- Cao-Lei L, Leija SC, Kumsta R, Wust S, Meyer J, Turner JD and Muller CP (2011) Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions. *Hum Genet* 129:533-543.
- Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J and Rouas-Freiss N (2008) HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends Immunol* 29:125-132.
- Caughey AB, Stotland NE, Washington AE and Escobar GJ (2005) Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 106:156-161.
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P and Smith SK (1994) Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time. *J Reprod Fertil* 101:421-426.
- Cheung AN, Shen DH, Khoo US, Chiu MP, Tin VP, Chung LP and Ngan HY (1999) Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumor suppressor gene in gestational trophoblastic disease: correlation with mdm2, proliferation index, and clinicopathologic parameters. *Int J Gynecol Cancer* 9:123-130.
- Chrousos GP and Kino T (2009) Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1179:153-166.
- Claes S (2009) Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. *Ann N Y Acad Sci* 1179:216-228.
- Conde-Agudelo A and Belizan JM (2000) Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. *BJOG* 107:75-83.
- Corvol H, Nathan N, Charlier C, Chadelat K, Le Rouzic P, Tabary O, Fauroux B, Henrion-Caude A, Feingold J, Boelle PY *et al.* (2007) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms associated with progression of lung disease in young patients with cystic fibrosis. *Respir Res* 8:88.
- Coulam CB, Kay C and Jeyendran RS (2006) Role of p53 codon 72 polymorphism in recurrent pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 12:378-382.
- de Vienne CM, Creveuil C and Dreyfus M (2009) Does young maternal age increase the risk of adverse obstetric, fetal and neonatal outcomes: a cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 147:151-156.
- Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS and Spencer RL (1995) Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 154:5511-5527.
- Dimitriadis E ME, Salamonsen LA, Paiva P (2010) LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *placenta* 31 Suppl:S99-104.
- Duley L (2009) The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 33:130-137.
- Ei Hasegawa HI, Fumiko Hasegawa, Keiko Hatano, Masahiro Kazuka, Saburo Usuda and Keiichi Isaka (2012) Expression of leukemia inhibitory factor in the endometrium in abnormal uterine cavities during the implantation window. *Fertility and Sterility*:953-958.
- Encio IJ and Detera-Wadleigh SD (1991) The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 266:7182-7188.
- Eskenazi B, Fenster L and Sidney S (1991) A multivariate analysis of risk factors for preeclampsia. *JAMA* 266:237-241.



- Fakharzadeh SS, Trusko SP and George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 10:1565-1569.
- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D and Qu X (2009) MDM2 309 polymorphism is associated with missed abortion. *Hum Reprod* 24:1346-1349.
- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D and Qu X (2011) The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion. *Hum Reprod* 26:1252-1258.
- Freedman DA, Wu L and Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 55:96-107.
- Freitas F, Martins-Costa S, Ramos JGL and Magalhães JA, 2006 Rotinas em Obstetrícia pp. in *artmed*.
- Gallegos-Arreola MP, Figuera-Villanueva LE, Puebla-Perez AM, Montoya-Fuentes H, Suarez-Rincon AE and Zuniga-Gonzalez GM (2012) Association of TP53 gene codon 72 polymorphism with endometriosis in Mexican women. *Genet Mol Res* 11:1401-1408.
- Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR and Granger JP (2008) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H541-550.
- Gobinet J, Poujol N and Sultan C (2002) Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198:15-24.
- Goldman-Wohl D and Yagel S (2002) Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol* 187:233-238.
- Gotlieb. RLMHPdMJSLD (2004) A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativas de um fator de reajuste. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:446-460.
- Gross KL, Lu NZ and Cidlowski JA (2009) Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 300:7-16.
- Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y and Livingston DM (2003) Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300:342-344.
- Hall G (2002) Tratado de Fisiologia Médica. Guanabara Koogan.
- Heazell AE, Sharp AN, Baker PN and Crocker IP (2011) Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. *Apoptosis* 16:135-144.
- HGNC (2012) HUGO Gene Nomenclature Committee. <http://www.genenames.org/>.
- Holsboer F (2001) Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62:77-91.
- Hu W (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001073.
- Hu W, Feng Z, Atwal GS and Levine AJ (2008) p53: a new player in reproduction. *Cell Cycle* 7:848-852.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK and Levine AJ (2007) p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 450:721-724.
- Huizenga NA, Koper JW, De Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, Grobbee DE, Brinkmann AO, De Jong FH and Lamberts SW (1998) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 83:144-151.

- Itoh N and Shimizu N (1998) DNA replication-dependent intranuclear relocation of double minute chromatin. *J Cell Sci* 111 ( Pt 22):3275-3285.
- Kanasaki K and Kalluri R (2009) The biology of preeclampsia. *Kidney Int* 76:831-837.
- Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ and Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9761-9766.
- KC Vollebregt MvdW, H Wolf, TGM Vrijkotte, K Boer, GJ Bonsel (2007) Is psychosocial stress in first ongoing pregnancies associated with pre-eclampsia and gestational hypertension? *Maternal medicine*.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
- Kimura K, Wakamatsu A, Suzuki Y, Ota T, Nishikawa T, Yamashita R, Yamamoto J, Sekine M, Tsuritani K, Wakaguri H *et al.* (2006) Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res* 16:55-65.
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
- Krishnamurthy P, Romagni P, Torvik S, Gold PW, Charney DS, Detera-Wadleigh S and Cizza G (2008) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms in premenopausal women with major depression. *Horm Metab Res* 40:194-198.
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH and Wust S (2007) Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 62:863-869.
- Kurki T, Hiilesmaa V, Raitasalo R, Mattila H and Ylikorkala O (2000) Depression and anxiety in early pregnancy and risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol* 95:487-490.
- Lahiri DK and Nurnberger JI, Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lancaster CA, Gold KJ, Flynn HA, Yoo H, Marcus SM and Davis MM (2010) Risk factors for depressive symptoms during pregnancy: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 202:5-14.
- Langat DK, Sue Platt J, Tawfik O, Fazleabas AT and Hunt JS (2006) Differential expression of human leukocyte antigen-G (HLA-G) messenger RNAs and proteins in normal human prostate and prostatic adenocarcinoma. *J Reprod Immunol* 71:75-86.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R and Prydz H (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13:1095-1107.
- Lattuada D, Vigano P, Somigliana E, Abbiati A, Candiani M and Di Blasio AM (2004) Analysis of the codon 72 polymorphism of the TP53 gene in patients with endometriosis. *Mol Hum Reprod* 10:651-654.
- Leeners B, Neumaier-Wagner P, Kuse S, Stiller R and Rath W (2007) Emotional stress and the risk to develop hypertensive diseases in pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 26:211-226.
- Li Y, Zhao H, Sun L, Huang L, Yang Q and Kong B (2011) MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer susceptibility: a meta-analysis. *Hum Cell* 24:57-64.
- Lin RC, Wang WY and Morris BJ (1999) Association and linkage analyses of glucocorticoid receptor gene markers in essential hypertension. *Hypertension* 34:1186-1192.

- Long JC (1999) Multiple Locus Haplotype Analysis, Version 3.0. Software and Documentation Distributed by the Author. Department of Human Genetics, University of Michigan, Ann Arbor.
- Long JC, Williams RC and Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799-810.
- Lowe SA, Brown MA, Dekker GA, Gatt S, McLintock CK, McMahon LP, Mangos G, Moore MP, Muller P, Paech M *et al.* (2009) Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 49:242-246.
- Lu NZ and Cidlowski JA (2004) The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1024:102-123.
- Lu NZ and Cidlowski JA (2006) Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 16:301-307.
- Marcus SM (2009) Depression during pregnancy: rates, risks and consequences-- Motherisk Update 2008. *Can J Clin Pharmacol* 16:e15-22.
- Mastorakos G and Ilias I (2003) Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci* 997:136-149.
- McBride OW, Merry D and Givol D (1986) The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:130-134.
- Milne F, Redman C, Walker J, Baker P, Bradley J, Cooper C, de Swiet M, Fletcher G, Jokinen M, Murphy D *et al.* (2005) The pre-eclampsia community guideline (PRECOG): how to screen for and detect onset of pre-eclampsia in the community. *BMJ* 330:576-580.
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H *et al.* (2009) A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med* 15:1082-1087.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D and Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245.
- Mora M, Sanchez L, Serra-Prat M, Palomera E, Blanco J, Aranda G, Falcon I, Cadenas I, Boquet X, Oriola J *et al.* (2012) Hormonal determinants and effect of ER22/23EK glucocorticoid receptor gene polymorphism on health status deterioration in the participants of the Mataro Ageing Study. *Age (Dordr)* 34:553-561.
- Moreau JF, Donaldson DD, Bennett F, Witek-Giannotti J, Clark SC and Wong GG (1988) Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 336:690-692.
- Murphy ME (2006) Polymorphic variants in the p53 pathway. *Cell Death Differ* 13:916-920.
- Myatt L and Webster RP (2009) Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost* 7:375-384.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ and Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- O'Hare T and Creed F (1995) Life events and miscarriage. *Br J Psychiatry* 167:799-805.
- Oakley RH and Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286:3177-3184.

- Pregnancy RotNHBPEPWGoHBPi (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy *Am J Obstet Gynecol* 183:S1-S22.
- Pugh BF and Tjian R (1990) Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61:1187-1197.
- Rhen T and Cidlowski JA (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 353:1711-1723.
- Robinson DP and Klein SL (2012) Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Horm Behav*.
- Rosmond R, Chagnon YC, Holm G, Chagnon M, Perusse L, Lindell K, Carlsson B, Bouchard C and Bjorntorp P (2000) A glucocorticoid receptor gene marker is associated with abdominal obesity, leptin, and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Obes Res* 8:211-218.
- Russcher H, van Rossum EF, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW and Koper JW (2005) Increased expression of the glucocorticoid receptor-A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol Endocrinol* 19:1687-1696.
- Salamonsen A, Menkhorst E and Dimitriadis E (2010) Leukemia Inhibitory Factor and Human Endometrial Receptivity. *Indian J Physiol Pharmacol*.
- Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP and Mor G (2010) Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol* 64:159-169.
- Sibai B, Dekker G and Kupferminc M (2005) Pre-eclampsia. *Lancet* 365:785-799.
- Sibai BM (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 102:181-192.
- Sohlberg S, Stephansson O, Cnattingius S and Wikstrom AK (2012) Maternal body mass index, height, and risks of preeclampsia. *Am J Hypertens* 25:120-125.
- Srivastava N, Prakash J, Lakhan R, Agarwal CG, Pant DC and Mittal B (2011) Influence of Bcl-1 Gene Polymorphism of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1, rs41423247) on Blood Pressure, Glucose in Northern Indians. *Indian J Clin Biochem* 26:125-130.
- Stahl J, Gearing DP, Willson TA, Brown MA, King JA and Gough NM (1990) Structural organization of the genes for murine and human leukemia inhibitory factor. Evolutionary conservation of coding and non-coding regions. *J Biol Chem* 265:8833-8841.
- Stanton BAK, Bruce M. (2009) *Fisiologia*. 6<sup>a</sup> ed.
- Stegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ and Pijnenborg R (2010) Pre-eclampsia. *Lancet* 376:631-644.
- Steiger H, Bruce K, Gauvin L, Groleau P, Joober R, Israel M, Richardson J and Kin FN (2011) Contributions of the glucocorticoid receptor polymorphism (Bcl1) and childhood abuse to risk of bulimia nervosa. *Psychiatry Res* 187:193-197.
- Tapia A, Salamonsen LA, Manuelpillai U and Dimitriadis E (2008) Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Hum Reprod* 23:1724-1732.
- Tegethoff M, Greene N, Olsen J, Meyer AH and Meinlschmidt G (2010) Maternal psychosocial adversity during pregnancy is associated with length of gestation and offspring size at birth: evidence from a population-based cohort study. *Psychosom Med* 72:419-426.

- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L and Matlashewski G (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 19:1092-1100.
- Trogstad L, Magnus P and Stoltenberg C (2011) Pre-eclampsia: Risk factors and causal models. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.
- Tsigos C and Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- Turner JD, Alt SR, Cao L, Vernocchi S, Trifonova S, Battello N and Muller CP (2010) Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem Pharmacol* 80:1860-1868.
- Uzan J, Carbonnel M, Piconne O, Asmar R and Ayoubi JM (2011) Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag* 7:467-474.
- Valensise H, Vasapollo B, Gagliardi G and Novelli GP (2008) Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension* 52:873-880.
- Valkenburg O, Uitterlinden AG, Themmen AP, de Jong FH, Hofman A, Fauser BC and Laven JS (2011) Genetic polymorphisms of the glucocorticoid receptor may affect the phenotype of women with anovulatory polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 26:2902-2911.
- van der Tuuk K, Koopmans CM, Groen H, Aarnoudse JG, van den Berg PP, van Beek JJ, Copraij FJ, Kleiverda G, Porath M, Rijnders RJ *et al.* (2011) Prediction of progression to a high risk situation in women with gestational hypertension or mild pre-eclampsia at term. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 51:339-346.
- van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, Wouters JM, Hazes JM, Lamberts SW and Feelders RA (2010) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:R159.
- van Rossum EF, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, Salyakina D, Lamberts SW and Holsboer F (2006) Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry* 59:681-688.
- van Rossum EF, Feelders RA, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Janssen JA, Ester W, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, Pols HA *et al.* (2004a) Association of the ER22/23EK polymorphism in the glucocorticoid receptor gene with survival and C-reactive protein levels in elderly men. *Am J Med* 117:158-162.
- van Rossum EF, Koper JW, Huizenga NA, Uitterlinden AG, Janssen JA, Brinkmann AO, Grobbee DE, de Jong FH, van Duyn CM, Pols HA *et al.* (2002) A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 51:3128-3134.
- van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, Janssen JA, Brinkmann AO, de Jong FH, Grobbee DE *et al.* (2003) Identification of the BcII polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)* 59:585-592.
- van Rossum EF and Lamberts SW (2004) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 59:333-357.
- van Rossum EF, Roks PH, de Jong FH, Brinkmann AO, Pols HA, Koper JW and Lamberts SW (2004b) Characterization of a promoter polymorphism in the glucocorticoid

- receptor gene and its relationship to three other polymorphisms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61:573-581.
- van West D, Del-Favero J, Deboutte D, Van Broeckhoven C and Claes S (2010) Associations between common arginine vasopressin 1b receptor and glucocorticoid receptor gene variants and HPA axis responses to psychosocial stress in a child psychiatric population. *Psychiatry Res* 179:64-68.
- Vianna P, Bauer ME, Dornfeld D and Chies JA (2011) Distress conditions during pregnancy may lead to pre-eclampsia by increasing cortisol levels and altering lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Med Hypotheses* 77:188-191.
- Vianna P, Dalmaz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I and Chies JA (2007) Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol* 68:668-674.
- Villar J, Carroli G, Wojdyla D, Abalos E, Giordano D, Ba'aqueel H, Farnot U, Bergsjö P, Bakketeig L, Lumbiganon P *et al.* (2006) Preeclampsia, gestational hypertension and intrauterine growth restriction, related or independent conditions? *Am J Obstet Gynecol* 194:921-931.
- Vogelstein B, Lane D and Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
- Vousden KH and Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:275-283.
- Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, Connor JM, Lever AF and Fraser R (1992) Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 10:473-482.
- Webster JC and Cidlowski JA (1999) Mechanisms of Glucocorticoid-receptor-mediated Repression of Gene Expression. *Trends Endocrinol Metab* 10:396-402.
- Wei J, Zaika E and Zaika A (2012) p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J Nucleic Acids* 2012:687359.
- Whibley C, Pharoah PD and Hollstein M (2009) p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* 9:95-107.
- Wust S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R and Hellhammer DH (2004) Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab* 89:565-573.
- Xiong X, Demianczuk NN, Buekens P and Saunders LD (2000) Association of preeclampsia with high birth weight for age. *Am J Obstet Gynecol* 183:148-155.
- Yazdani S, Yosofniyapasha Y, Nasab BH, Mojaveri MH and Bouzari Z (2012) Effect of maternal body mass index on pregnancy outcome and newborn weight. *BMC Res Notes* 5:34.
- Yonkers KA, Wisner KL, Stewart DE, Oberlander TF, Dell DL, Stotland N, Ramin S, Chaudron L and Lockwood C (2009) The management of depression during pregnancy: a report from the American Psychiatric Association and the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Gen Hosp Psychiatry* 31:403-413.
- Young BC, Levine RJ and Karumanchi SA (2010) Pathogenesis of preeclampsia. *Annu Rev Pathol* 5:173-192.
- Yudt MR and Cidlowski JA (2001) Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 15:1093-1103.

Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M and Damsky CH (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 99:2139-2151.