

Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia

Norma Cecilia Serrano Díaz *
 María Carolina Páez Leal **
 María Paula Martínez Linares ***
 Juan Pablo Casas Romero †
 Laura Gil Urbano ††
 Álvaro Andrés Navarro Mancilla ***

Resumen

La preeclampsia es una enfermedad compleja, exclusiva de la gestación humana y responsable de una alta morbilidad perinatal. Ha sido denominada la enfermedad de las múltiples teorías, en la cual tanto factores medioambientales como genéticos se han asociado al desarrollo de la misma. Para la identificación de los genes candidatos asociados con la PE, se han empleado dos tipos de metodología, los estudios de asociación y los estudios de ligamiento. En el presente artículo se explica el fundamento de ambos estudios y se revisan los principales genes candidatos dentro de la fisiopatología de la enfermedad, entre los que se encuentran los que codifican para la enzimas metilenerahidrofolato reductasa, la lipoprotein lipasa y la óxido nítrico sintasa endotelial; el factor V de Leiden, el angiotensinógeno, el HLA-G y el factor de necrosis tumoral alfa. [Serrano NC, Páez MC, Martínez MP, Casas JP, Gil L, Navarro AA. Bases genéticas y moleculares de la preeclampsia. MEDUNAB 2002; 5(15): 185-94]

Palabras clave: Genética, preeclampsia, polimorfismos, estudios de ligamiento, estudios de asociación, metilenerahidrofolato reductasa, lipoprotein lipasa, óxido nítrico sintasa endotelial, factor V de Leiden, angiotensinógeno, HLA-G y factor de necrosis tumoral alfa.

Introducción

La preeclampsia (PE) es una enfermedad exclusiva de la gestación humana, que lleva a morbilidad perinatal elevada y que se caracteriza por el aumento de la presión arterial y proteinuria durante la segunda mitad de la gestación. Se presenta en todas las poblaciones con una incidencia general que varía entre el 5 y 7%; sin embargo, diferencias geográficas, socioeconómicas y raciales hacen que la incidencia en algunas áreas sea hasta tres veces mayor.¹

El diagnóstico actual de PE se basa en criterios clínicos y de laboratorio, según el reporte de la *National High Blood*

*Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy.*² Se define como preeclampsia a la presencia de una presión arterial sistólica \geq a 140 mm Hg ó presión arterial diastólica \geq a 90 mm Hg, asociada a proteinuria, considerada como una excreción \geq 0.3 g de proteínas en orina de 24 horas, que equivale a un valor \geq 30 mg/dl (\geq 1 + por tira reactiva) en una muestra al azar. Estos hallazgos deben ser detectados a partir de la semana 20 de gestación en una mujer previamente sana.

En Colombia, la PE se constituye en la principal causa de mortalidad materna con más del 42% de fallecimientos atribuibles a esta causa; además, se asocia con una mortalidad perinatal cinco veces mayor. Por lo tanto, el

* MD, MSc en Genética Humana. Coordinadora Académica y de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia.

** MD. Centro de Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia.

*** Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Bucaramanga, Colombia.

† MD. Centre for Clinical Pharmacology, BHF Laboratories, University College of London, Londres, Reino Unido.

†† MD, Residente de II año de Ginecología y Obstetricia, Instituto Materno Infantil, Santafé de Bogotá, Colombia.

Correspondencia: Dra. Serrano, Universidad Autónoma de Bucaramanga, Facultad de Medicina, Laboratorio de Biología Molecular, Calle 157 No. 19 - 55 Cañaveral Parque, Bucaramanga, Colombia; E-mail: nserrano@unab.edu.co

Recibido: noviembre 12 de 2002; aceptado: noviembre 25 de 2002

impacto económico y social en los países en vía de desarrollo es de gran importancia, aún más si consideramos que en Colombia la mortalidad materna es 10 veces mayor a la observada en Estados Unidos,³ alcanzando una tasa de 185 muertes maternas x 100.000 recién nacidos vivos.⁴

A pesar de la importancia de la PE en términos de salud pública, los mecanismos que la desencadenan no están totalmente determinados. Se propone que la PE es una enfermedad compleja, donde la susceptibilidad genética asociada a una diversa contribución de factores medio ambientales, determina la generación de una respuesta que conduce a la aparición de hipertensión, proteinuria y edemas, signos del desarrollo de la PE.

Factores de riesgo en preeclampsia

La PE se ha definido como la enfermedad de las múltiples teorías, dado que ninguna de ellas ha podido explicar en la totalidad su origen y desarrollo. Hay algunos hallazgos comunes y constantes en las pacientes que desarrollan PE, tales como invasión superficial del citotrofoblasto endovascular en las arterias espirales, una exagerada respuesta inflamatoria y una inapropiada activación de las células endoteliales.⁵ Pero los mecanismos detrás de estos hallazgos son desconocidos.

Estudios previos han mostrado que la presencia de bajo consumo de calcio en la dieta previo a la gestación,⁶ primigravides, incremento en la edad materna, hipertensión arterial crónica, obesidad, raza negra, diabetes gestacional, nivel socio económico bajo, antecedente personal de PE y gestación múltiple son factores de riesgo para el desarrollo de la PE. Recientemente se ha sugerido como factores de riesgo para presentar esta entidad el incremento de triglicéridos y colesterol LDL, la disminución del colesterol HDL, hiperhomocisteinemia, infecciones del tracto genitourinario y mala adaptación inmune;^{7,8} sin embargo, en conjunto ellos no explican el desarrollo de la enfermedad.

Genética y preeclampsia

Aunque la mayoría de casos de PE son esporádicos, se acepta que factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad; sin embargo, la forma de herencia no sigue los modelos clásicos de herencia Mendeliana. Estudios en familias han determinado que las familiares en primer grado de consanguinidad de una mujer con PE tienen 4 a 5 veces mayor riesgo de presentar la enfermedad. Igualmente las familiares en segundo grado tienen un riesgo incrementado de 2 a 3 veces, comparado con aquellas mujeres en cuyas familias no hay historia de PE.^{9,10} Este tipo de predisposición familiar apoya la definición de la PE como una enfermedad compleja, donde los factores

genéticos que contribuyen a su origen suelen ser múltiples, interactuando dos o más genes entre sí, *herencia poligénica*, o al interactuar dos o más genes con diferentes factores medio ambientales, *herencia multifactorial*, donde la heterogeneidad genética del individuo determina diferentes respuestas a un factor externo.

Para abordar el estudio de las enfermedades complejas se utilizan dos tipos de metodologías, por medio de estudios de asociación tratando de identificar genes candidatos implicados en el desarrollo de la enfermedad o por estudios de ligamiento genético identificando regiones cromosómicas en familias en las que se haya presentado la entidad a estudio. A continuación se explicará el fundamento de estos dos tipos de estudios y los principales hallazgos reportados en cada uno de ellos, con respecto a la genética de la PE.

Estudios de ligamiento

Los análisis de ligamiento han resultado ser una herramienta valiosa para el mapeo de los loci genéticos y por ende pueden servir de aproximación para identificar genes candidatos que expliquen el origen y fisiopatología de las enfermedades.¹⁰ La metodología incluye el estudio de segregación en grandes familias afectadas, utilizando marcadores polimórficos en cada uno de los cromosomas. Eventualmente un marcador será identificado cuando se cosegregue con la enfermedad con una frecuencia mayor a la esperada por el azar. El análisis matemático que se utiliza en esta clase de estudios tiende a ser complejo, particularmente si se utilizan muchos marcadores adyacentes, en un análisis denominado de ligamiento multipunto. No obstante, el principio subyacente implica el uso de razones de probabilidad, cuyos logaritmos se conocen como *LOD scores*, valor que por convenio debe ser mayor o superior a 3 para confirmar ligamiento; lo que significa que es muy probable que el gen candidato para la entidad se encuentre en la región estudiada.¹¹

Diferentes investigadores han buscado por medio de los estudios de ligamiento identificar regiones cromosómicas que se asocien a una mayor susceptibilidad de presentar preeclampsia y/o eclampsia. A continuación se describen sus principales hallazgos:

Moses¹² realizó un estudio en 366 individuos reclutados en un periodo de 15 años y pertenecientes a 26 familias australianas y ocho de Nueva Zelanda, dentro de las que existían pacientes con embarazo complicados con PE, eclampsia (E) e hipertensión gestacional transitoria (HGT). En esta población se estudiaron 400 marcadores microsatélites y después del análisis estadístico realizado con el software GENOTYPER, reportaron para un grupo general que incluía a pacientes con HGT, un *LOD score* máximo de 2.58 (valor $p < 0.05$) entre la región D2S112 –

D2S151 ubicado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q), que apoya lo reportado por Arngrimsson¹³ quien encontró un *LOD score* de 4.7 para esta misma región en un estudio realizado en Islandia. Sin embargo, al analizar el grupo estricto de PE/E el *LOD score* disminuyó significativamente a un valor aproximado de dos, lo que no confirmaría ligamiento. Los autores proponen como posible gen candidato relacionado el gen 1 pre-eclampsia eclampsia “PREF1”, pero al momento éste no ha sido clonado.

Por otra parte, Harrison¹⁴ reveló evidencia de asociación entre PE/E y una región D4S450 – D4S610 ubicado en el brazo largo del cromosoma 4, en población australiana, con un *LOD score* máximo de 2.9.

Finalmente, y después de estudiar 25 diferentes marcadores microsatélites en población australiana,¹⁵ se ha postulado que la región 7q36 (D7S1805) se asocia con PE/E con un *LOD score* de 3.53 ($p=0.002$). Estos resultados son bastante interesantes, si se tiene en cuenta que dicho marcador está muy cercano al gen que codifica para la sintasa endotelial de óxido nítrico, por lo tanto este gen se perfila como un posible candidato para estar relacionado con el origen y fisiopatología de la PE.

Estudios de asociación (EA)

Con el fin de establecer si las variantes de un genotipo están relacionadas con una mayor susceptibilidad a desarrollar determinadas patologías, se plantearon los EA, los cuales se basan en el diseño metodológico de los estudios de casos y controles. En este diseño, la frecuencia de un determinado alelo en pacientes enfermos o grupo “caso” es comparada con la frecuencia en personas sanas, “no afectadas” o grupo control. La alta frecuencia de la variante en el grupo de casos puede tomarse como evidencia de que el alelo o genotipo se asocia con el incremento del riesgo para sufrir determinada enfermedad, ya sea en forma directa o en combinación con otros componentes de su fisiopatología.¹⁶

Es importante reconocer que la distribución de las frecuencias alélicas en una población puede darse independientemente de la enfermedad y de acuerdo con los subgrupos que la constituyen en relación con su composición étnica, según el concepto de estratificación de población.^{17,18} Esto puede conducir a conclusiones erróneas de asociación o distorsionar la importancia de determinado gen como parte de la etiología de una enfermedad. Este aspecto limita la reproducción de los EA porque al no conocerse la distribución de las frecuencias alélicas de cada población se puede llegar a un error de interpretación, al concluir que la mayor proporción de un polimorfismo es un verdadero factor de riesgo asociado a la enfermedad.

Para disminuir el impacto de la estratificación de la población en los EA se han planteado dos opciones:^{19,20}

- Estudios en familias representativas basados en test de desequilibrio de transmisión (TDT).
- Estudios de casos y controles en diferentes grupos étnicos dentro de una población, donde se requiere que la asociación se presente en cada uno de los grupos étnicos analizados.

Genes candidatos

Son varios los genes asociados con el desarrollo de la PE; sin embargo, en la siguiente revisión sólo se incluyeron aquellos que han mostrado una asociación de forma consistente en diferentes poblaciones.

Metilendetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Esta enzima es una flavoproteína que interviene en la reacción de remetilación de la homocisteína. Es la encargada de catalizar la reducción de 5,10-metilendetrahidrofolato a 5-metilendetrahidrofolato (5-MTHF), que es la forma más importante de folatos en el organismo y que actúa como cofactor donando metilos para la remetilación de homocisteína a metionina, reacción catalizada por la enzima metionina sintasa y dependiente de vitamina B12 (Figura 1).²¹

Al disminuir la cantidad de este cofactor por déficit o alteración de la enzima MTHFR no se puede llevar a cabo la reacción de metilación de la homocisteína, lo que genera aumento en sus concentraciones plasmáticas, llevando al estado conocido como hiperhomocisteinemia (HHM).

La HHM genera una condición protrombótica y proaterogénica, debido a la estimulación de factores de la coagulación, como el factor XII y V,^{22,23} por disminución en la actividad de la proteína C y alteración de la agregación plaquetaria. Adicionalmente, los altos niveles de homocisteína estimulan la peroxidación lipídica generando mayor cantidad de radicales libres de oxígeno, los que a su vez provocan disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), llevando finalmente a disfunción endotelial.²⁴

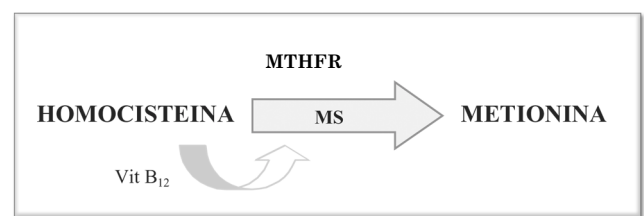


Figura 1. Reacción de metilación de homocisteína a metionina MS (Metionina Sintasa), MTHFR (Metilendetrahidrofolato reductasa)

Estudios posteriores reportaron que mujeres con preeclampsia – eclampsia (P/E) tenían valores elevados de homocisteína, sugiriendo el papel de esta molécula en la fisiopatología de la PE.²⁵⁻²⁷

Se ha descrito una mutación que determina la sustitución de una citosina por una timina en la posición 677 (G677T) del gen que codifica para la MTHFR, la cual genera disminución de la actividad enzimática (cerca del 50%) y aumento de la termolabilidad de esta molécula.²⁸ Estos hallazgos se correlacionan con una menor síntesis del cofactor (5-MTHF) indispensable para la reacción de metilación, que al no realizarse de manera adecuada desencadena la acumulación del sustrato, la homocisteína.

Se describió una segunda mutación de este gen, en la cual se sustituye una adenina por una citosina en la posición 1298 (A1298C). Esta variante también genera disminución de la actividad enzimática de la MTHFR, pero no se asocia con aumento de los niveles plasmáticos de homocisteína. Sin embargo, la coexistencia de estas dos alteraciones en forma heterocigota sí se relaciona con HHM y bajos niveles de folatos en plasma.²⁹

Estudios realizados en tres grupos poblacionales diferentes reportaron asociación entre el genotipo homocigoto para el C677T y pacientes con preeclampsia, tanto en mujeres japonesas³⁰ como italianas³¹ y húngaras.³² Sin embargo, estos hallazgos no han sido reproducibles en recientes trabajos realizados en población australiana,^{33,34} americana,³⁵ surafricana³⁶ y holandesa.³⁷

Factor V de Leiden. Diferentes estudios han demostrado que en la PE ocurre una marcada activación del sistema de coagulación, que asociada a lesión endotelial genera un estado de hipercoagulabilidad, que lleva a la formación de trombos en la placenta, hallazgo encontrado en cerca del 40% de las pacientes con historia de PE severa, lo cual es por lo menos cuatro veces mayor que lo reportado en pacientes sin este antecedente.³⁸

Se ha descrito una mutación común que lleva a la sustitución de una glutamina por una arginina en la posición 506 del Factor V;³⁹ este cambio le confiere a la molécula resistencia a la inactivación proteolítica por acción de la proteína C, característica que le permite conservar su actividad procoagulante y predisponer a desórdenes tromboembólicos.⁴⁰

Esta mutación está asociada con cerca del 60% de las complicaciones tromboembólicas del embarazo⁴¹ y teniendo en cuenta que las trombosis intervellosas asociadas a infartos placentarios son características en las placentas de mujeres con PE, se plantearon las mutaciones del Factor V como posibles factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad.

La resistencia a la actividad anticoagulante de la proteína C, más frecuentemente debida a la mutación puntual antes descrita, representa la causa genética más común de trombofilia. Esta mutación ha sido significativamente relacionada con complicaciones del embarazo asociadas a un estado de hipercoagulabilidad; por ejemplo, aumenta en 8 veces el riesgo de presentar trombosis venosa profunda durante el embarazo y en 10 veces el riesgo de desarrollar infartos placentarios que comprometan más del 10% de la placenta.⁴²

Otro estudio reportó que el 8.9% de las mujeres con diagnóstico de PE (14/158) eran portadoras heterocigotas para el polimorfismo, en comparación con el 4.3% de las pacientes sin esta enfermedad (17/403).⁴³ Sin embargo, al revisar las publicaciones que evalúan la existencia de asociación entre las diferentes variantes identificadas en este factor y PE, los resultados no son contundentes (Tabla 1).

Angiotensinógeno (AGT). El angiotensinógeno es el precursor de la hormona vasoactiva Angiotensina II, la cual juega un papel muy importante en la regulación de la presión sanguínea, del volumen de los fluidos corporales y en la remodelación vascular.^{57,58}

Tabla 1. Presentación de los trabajos de asociación entre preeclampsia y polimorfismos del gen que codifica para el Factor V de la coagulación

Referencia	Muestra		OR (IC 95%); p
	Casos	Controles	
D'Elia (2002) ⁴⁴	3/58 (5.2%)	4/74 (4.1%)	1.29 (0.17-10); p = 0.76
Livingston (2001) ⁴⁷	3/75 (4.4%)	4/92 (4.3%)	0.92 (0.13-5.61); p = 0.96
Kim (2001) ⁴⁸	15/250 (6.0%)	12/253 (4.7%)	1.28 (0.55 – 3.07); p=0.53
Rigo (2001) ⁴⁹	22/120 (18.3%)	3/101 (3.0%)	6.17 (1.90 – 20.02); p= 0.001
Kobashi (1999) ⁵⁰	0/71	0/109	Ninguna presentó el polimorfismo
De Groot (1999) ⁵¹	21/163 (12.9%)	16/125 (12.9%)	1.01 (0.48 – 2.17); p = 0.98
O'Shaughnessy (1999) ⁵²	15/283 (5.3%)	11/200 (5.5%)	0.96 (0.40 – 2.37); p = 0.92
Naggy (1999) ⁵³	13/69 (18.8%)	5/100 (5.0%)	4.41 (1.37 – 16.51); p= 0.004
Grandone (1997) ⁵⁴	10/96 (10.4%)	3/129 (2.3%)	4.9 (1.20 – 28.22); p=0.010
Dizzon-Townson (1996) ⁵⁵	14/158 (8.8%)	17/403 (4.21%)	2.21 (0.98 – 4.89); p= 0.03

Varios estudios han descrito la existencia de asociación entre polimorfismos del AGT y preeclampsia, con resultados contradictorios. En uno de ellos se encontró que hay asociación principalmente entre PE y la variante (M235T), donde se produce la sustitución de una metionina por una treonina en la posición 235 y que inicialmente se asoció con hipertensión esencial.⁵⁹ En otro estudio realizado en pacientes caucásicas, el 20% de las mujeres con el polimorfismo (M235T) desarrollaron PE, comparado con menos del 1% en pacientes que presentaban el genotipo normal o “protector”; este trabajo fue replicado en población japonesa⁶⁰ confirmando la asociación entre el polimorfismo M235T y PE. En concordancia con estos hallazgos, un trabajo reciente concluyó que el ser portador homocigoto para esta variante es un potente factor de riesgo independiente para PE, con un OR de 2.5.⁶¹ Sin embargo, otros estudios realizados en población china y australiana,⁶² japonesa⁶³ e hispánica⁶⁴ no han reportado asociación con ninguna variante de este gen.

Estudios posteriores identificaron otra variante del gen del AGT, ubicado en la región promotora A(-6)⁶⁵ y, curiosamente, todos los portadores de esta mutación eran igualmente portadores de la variante M235T. La coexistencia de esta alteración se asocia a una mayor expresión del gen tanto en vivo como *in vitro*,⁶⁶ lo que se relacionaría con mayores niveles locales de Angiotensina II. Este aspecto podría jugar un papel importante en los cambios de remodelación estructural de las arterias espirales, ya que a esta hormona se le otorgan propiedades mitogénicas sobre las células musculares lisas y se le ha adjudicado un posible papel aterogénico en diferentes tejidos.⁶⁷

Lipoprotein Lipasa (LPL). Esta enzima se encarga de la transformación de los triglicéridos de los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a glicerol y ácidos grasos libres, para su metabolismo final.

En la fisiopatología de múltiples enfermedades cardiovasculares incluyendo la PE, concentraciones plasmáticas elevadas de lípidos, asociado a bajos niveles de colesterol HDL, se relacionan con un aumento de la peroxidación lipídica y por ende estrés oxidativo, siendo ésta una causa importante de disfunción endotelial.

Teniendo en cuenta las alteraciones que se derivan de una disfuncionalidad de esta enzima, se han llevado a cabo diversos estudios para tratar de identificar asociaciones entre mutaciones del gen que codifica para la LPL con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y dislipidemias.^{68,69}

Considerando la PE como poseedora de un gran componente vascular y basados en el papel existente entre la peroxidación lipídica y la disfunción endotelial⁷⁰ como factor importante dentro de su fisiopatología, se realizó un estudio reciente que evaluó tres polimorfismos

comunes en el gen que codifica para la LPL⁷¹ (previamente asociados con enfermedades cardiovasculares), en pacientes con PE (Tabla 2).

Sus resultados mostraron que no hubo diferencia significativa en la presencia de la mutación entre casos y controles, lo que significa que es necesario reproducir este estudio con el fin de evaluar su real impacto en las pacientes con PE. Como hallazgo importante de este trabajo se reportó asociación entre la presencia de la variante Asn291Ser en el subgrupo de nulíparas y el posterior desarrollo del Síndrome de HELLP (Hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y disminución del recuento plaquetareo), lo cual sugiere que es necesario hacer estudios con poblaciones más grandes con el fin de clarificar si existe o no asociación entre este gen y la presentación de la entidad.

HLA – G. Dentro de las teorías estudiadas en la fisiopatología de la PE se encuentra la relacionada con el proceso de placentación. Durante etapas tempranas del embarazo, las células del trofoblasto invaden el lecho placentario en dos fases; inicialmente comprometen el endotelio de las arterias espirales y luego avanzan hacia el miometrio invadiendo progresivamente estos vasos hasta la media, con el único fin de proporcionar un máximo de dilatación vascular. Esto conlleva a una disminución de la resistencia vascular al flujo que garantiza una adecuada perfusión al lecho útero-placentario.⁷² En la PE la invasión trofoblástica se deteriora y el revestimiento endotelial y muscular de las arterias espirales no es remodelado en su totalidad, quedando limitada la invasión del trofoblasto a la parte decidual de dichas arterias.⁷³

En este proceso se encuentran implicados múltiples elementos, de los cuales han sido estudiados desde el punto de vista genético principalmente el HLA-G y el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (FNT- α). El primero de ellos, considerado como una molécula no clásica del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I, se expresa casi exclusivamente en el citotrofoblasto y le confiere a este tejido la capacidad de evadir el sistema inmune materno, al no permitir su reconocimiento e inhibir la actividad directa de las células asesinas naturales.

Tabla 2. Características y hallazgos reportados por Kim para los polimorfismos de la LPL en preeclampsia.⁴⁹

Polimorfismo	Localización	Polimorfismo positivo (%)		p
		Casos	Controles	
Asp9Asn	Exón 2	2.8	4	0.61
-936 Promotora	Región promotora del gen	4.5	5.5	0.74
Asn291Ser	Exón 6	4	3	0.72

Se ha propuesto que la disminución en la expresión del HLA-G es causa de una aberrante diferenciación del trofoblasto, lo que afectaría el recambio de las arterias espirales comprometiendo el flujo y desencadenando isquemia placentaria; estado que puede reconocerse como causa importante de disfunción endotelial. Por lo descrito anteriormente, se plantea que una mutación genética que altere la transcripción del gen del HLA-G puede jugar un papel importante dentro de la etiología de la PE. Es así como se estudiaron polimorfismos ubicados en el exón 8⁷⁴ y exón 3⁷⁵ de este gen, pero su frecuencia en pacientes preeclámpcticas no reportó diferencia al compararlas con pacientes no preeclámpcticas. En contradicción, un estudio realizado por O'Brien demostró un déficit en los niveles de transcripción del HLA-G3 en placentas de mujeres con preeclampsia moderada al compararlas con gestantes normales, valores que se correlacionan con el polimorfismo silencioso CAC-CAT ubicado en el exón 3 del gen que codifica para esta molécula.⁷⁶

Independientemente de lo contradictorio de estos hallazgos, estudios que evalúan la expresión del HLA-G en el trofoblasto extraveloso han encontrado disminución o ausencia de la expresión en casi la totalidad de las placentas de mujeres preeclámpcticas,^{77,78} lo que plantea la necesidad de profundizar en el papel real que juega esta molécula en la fisiopatología de la enfermedad.

Factor de Necrosis Tumoral Alfa (FNT- α). El FNT- α es una citoquina que participa en eventos celulares que mantienen la gestación; sin embargo, el papel exacto que desempeñan no ha sido totalmente dilucidado.⁷⁹ Por otra parte, la presencia de tejido fetal estimula la respuesta inmune materna, llevando a la producción de diferentes citoquinas (IL-1, IL-6, FNT- α); de éstas el FNT- α participa en el proceso de modulación del crecimiento vascular e invasión del trofoblasto mediante la activación de los leucocitos deciduales⁸⁰ y la alteración de la producción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento placentario.⁸¹

Diferentes estudios han demostrado la existencia de mayores concentraciones de estas citoquinas en pacientes con preeclampsia, lo que podría relacionarse con una alteración en la regulación del sistema inmune materno y por ende desencadenar una mayor respuesta inflamatoria.⁸²⁻⁸⁴ Además de las características ya nombradas, el FNT- α en concentraciones elevadas puede relacionarse con: aumento en la generación de trombina, de factor activador plaquetario y del factor activador del plasminógeno 1; puede alterar la permeabilidad de la célula endotelial; aumentar la producción de peroxinitrito por activación de la enzima xantina oxidasa; generar una mayor oxidación de las LDL a nivel endotelial y aumentar la expresión de moléculas de adhesión.⁸⁵

Por lo anterior, diferentes investigaciones han tratado de esclarecer el papel del FNT- α en la PE. Por una parte se ha encontrado un riesgo tres veces mayor para desarrollar PE en gestantes con altos niveles del receptor soluble para el FNT- α sTNFp55,⁸⁶ al igual que cuando se encuentra un incremento de su expresión a nivel placentario.⁸⁷ En contradicción con estos hallazgos, ninguno de los estudios de asociación ha mostrado relación con los polimorfismos estudiados en el gen que codifica para esta citoquina,⁸⁸⁻⁹⁰ lo que sugiere que su variabilidad genética no podría interpretarse como un factor de riesgo para el desarrollo de PE. Finalmente y para confirmar estos resultados, un estudio reciente realizado en Finlandia⁹¹ concluyó que el ser portador de la variante C-850T ubicada en la región promotora del gen en su forma heterocigota u homocigota puede interpretarse como un factor protector para el desarrollo de PE, con un OR 0.367 IC 95% (0.159 a 0.847).

Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (NOSe). La NOSe es la enzima encargada de sintetizar el NO a nivel endotelial.⁹² Se acepta que la gestación es un estado de vasodilatación mediado en parte por el NO;⁹³ sin embargo, el papel de éste durante la PE no es claro y los resultados sobre su producción han sido contradictorios. Algunos estudios reportan valores de NO disminuido o sin cambios,⁹⁴ mientras que en otros han reportado un aumento en su producción en pacientes preeclámpcticas comparadas con gestantes normotensas.⁹⁵⁻⁹⁷

Estos resultados controversiales han llevado a estudiar de manera más particular el endotelio en el ámbito placentario, buscando correlacionar la expresión diferencial de la NOSe entre pacientes normotensas durante el embarazo y aquellas que desarrollan PE. Analizando bloques de tejido placentario y cordón umbilical obtenidos de gestantes normotensas y gestantes con PE, el grado de expresión de NOSe fue significativamente menor en estas últimas. Este resultado sugiere una anomalía de la vía L-arginina:NO, puede estar implicado en la génesis de las alteraciones hemodinámicas en la circulación fetoplacentaria durante la PE.⁹⁸

Se ha descrito un polimorfismo común en el exon 7 del gen que codifica para la NOSe, donde un cambio de Guanina por Timina en la posición 894 del gen, lleva a la sustitución del aminoácido ácido glutámico por ácido aspártico en el residuo 298 de la enzima madura (Glu298Asp). Este polimorfismo se ha encontrado con una frecuencia mayor en pacientes con diferentes enfermedades cardiovasculares que tienen en común con la PE, disfunción endotelial.⁹⁹⁻¹⁰⁵

Se ha tratado de establecer el significado biológico de ser portador de esta variante genética. La primera aproximación se logró a través de los estudios *in vitro* realizados por Teasuro y cols, quienes trabajaron con

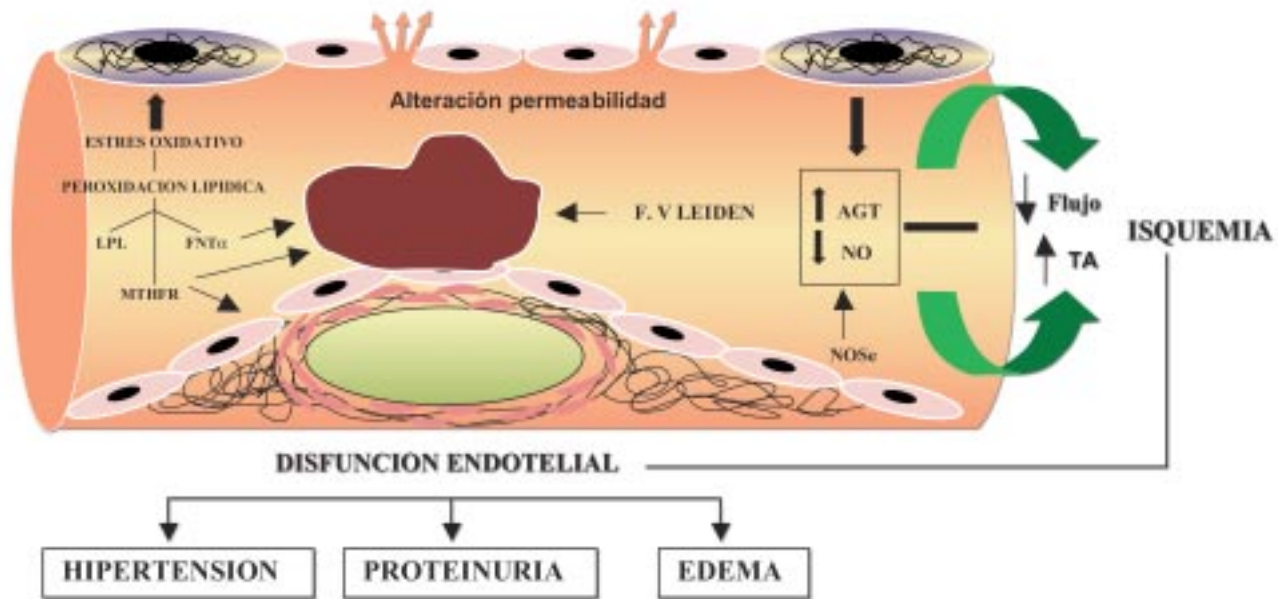


Figura 2. Esquema de disfunción endotelial en preeclampsia, en la que podrían intervenir diferentes factores analizados desde la perspectiva genética

células cardíacas y endoteliales humanas transfectadas con esta variante polimórfica que codifica para Asp298, encontrando que esta proteína era más susceptible de ser clivada por proteasas internas y por ende de ser rápidamente inactivada reduciendo la bioactividad del NO.¹⁰⁶ Soportando esta idea, recientemente se demostró que mujeres gestantes sanas portadoras del polimorfismo Glu298Asp, presentaban una reducción del 21% en la vasodilatación mediada por flujo (una respuesta mediada principalmente por NO) comparadas con las mujeres sin polimorfismo ($p < 0.002$).¹⁰⁷

Estudios realizados en población japonesa han reportado asociación entre la variante Glu298Asp y trastornos hipertensivos de la gestación. El primero de ellos identificó a esta variante como un potente factor de riesgo independiente para desarrollar hipertensión durante el embarazo, con un OR de 2.2¹⁰⁸ y el segundo reporta una asociación específica entre el polimorfismo y el riesgo de presentar preeclampsia severa, reportando una frecuencia de 28.8% en estas pacientes, comparadas con el 14.1% del grupo control ($p < 0.01$).¹⁰⁹

En este mismo gen se ha relacionado otro polimorfismo ubicado en el intrón 4 con un incremento en el riesgo para desarrollar PE,¹¹⁰ hallazgo respaldado por otro estudio realizado en población hispánica, donde las pacientes con PE portadoras del polimorfismo fueron 31.42%, en comparación con un 9% en las mujeres controles ($p = 0.003$).¹¹¹ Además, se observó que al momento del diagnóstico las pacientes preeclámpticas con el polimorfismo tenían menor edad gestacional y presentaban valores más elevados de presión arterial sistólica, en comparación con

las no portadoras ($p = 0.02$). Este aspecto es de importancia clínica pues el ser portador de la variante podría correlacionarse con un mayor grado de severidad de la enfermedad en estas pacientes.

La genética molecular está profundizando en la búsqueda de variantes que confieran mayor susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad, o aquellas que confieren protección a determinado evento; sin embargo, la discordancia en los resultados expuestos refleja vacíos dentro de la metodología de los estudios de asociación, posiblemente debido a la juventud de los mismos con respecto a variantes polimórficas.

Para las enfermedades complejas el lograr determinar factores de riesgo genéticos para la patología a estudio permitirá intervenir sobre los aspectos multifactoriales disparadores de la susceptibilidad, con el fin de prevenir o modificar el curso de la enfermedad; además, con este abordaje se pretende ampliar la posibilidad de establecer nuevas terapias dirigidas con base en impronta genética individual. Es así como se establecen nuevas áreas de estudio para el entendimiento y manejo de la preeclampsia, un claro modelo del concepto de enfermedades complejas.

Agradecimientos

Los autores de este artículo agradecen al Dr. Patricio López-Jaramillo por aportar con su conocimiento a la creación de diferentes líneas de investigación en la temática del papel biológico de la Vía L-Arginina: Óxido Nítrico, espacio que hoy reúne a profesionales y estudiantes en la comprensión e investigación de sus implicaciones clínicas.

Summary

Preeclampsia (PE) is a complex illness of the human gestation. It is responsible for a high perinatal morbimortality. It is the illness of the multiple theories; in one environmental and genetic factors are associated to explain it. To find genes candidates to be associated with PE, two methodology types are used: association and binding studies. In this paper we presented the foundation of both studies that explain the main genes candidates to involve in the genesis of this illness, like that ones that code for the methylenetetrahydrofolate reductase, lipoprotein lipase and endothelial nitric oxide sintase, Leiden's V factor, angiotensinogen, HLA-G, alpha tumoral necrosis factor.

Key words: Genetics, preeclampsia, polymorphisms, association studies, binding studies, methylenetetrahydrofolate reductase, lipoprotein lipase, endothelial nitric oxide sintase, Leiden's V factor, angiotensinogen, HLA-G, alpha tumoral necrosis factor.

Bibliografía

- López-Jaramillo P, Casas JP, Serrano N. Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanism. *Braz J Med Biol Res*: 2001;10: 1227-35.
- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183 :S1-S22.
- Gómez P, Ruiz N, Pulido J. Mortalidad materna en el Instituto Materno Infantil de Santafé de Bogotá D.C. 1985-1989. *Rev Col Obst Ginecol* 1993;44:39-47.
- Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (ENDES 2000). Disponible en: URL:<http://www.minsa.gov.pe/enfermedad/salud-materna.htm>
- Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1359-75.
- Atallah AN, Hofmeyr GJ, Duley L. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Library* number: CD001059.
- Dekker G, Sibai B. Primary, secondary and tertiary prevention of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357:209-15.
- Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001;357:53-6.
- Graves JV. Genomic imprinting, development and disease: is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod Fertil Dev* 1998;10:23-9.
- Ros HS; Lichtenstein P, Lipworth L, et al. Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet* 2000;91:256-60.
- Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405(15):847-56.
- Moses E, Lade J, Guo G, et al. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for Pre-eclampsia, on chromosome 2. *Am J Hum Genet*. 2000;67:1581-5.
- Arngrímsson R, Sigurardóttir S, Frigge ML, et al. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum Mol Genet* 1999;8:1799-1805.
- Harrison GA, Humphrey KE, Jones N, et al. A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *Am J Hum Genet* 1997;60:1158-67.
- Guo GL, Lade JA, Wilton AN, et al. Genetic susceptibility to pre-eclampsia and chromosome 7q36. *Hum Genet* 1999;105:641-7.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002;4(2):45-61.
- Cardon LR, Bell J. Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics* 2001;2:91-99.
- Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am J Hum Genet* 1999;65:220-8.
- Devlin B, Roeder K. Genomic control for association studies. *Biometrics* 1999;55:997-1004.
- Reich DE, Goldstein DB. Detecting association in case-control study while correcting for population stratification. *Genet Epidemiol* 2001;20:4-16.
- Refsum H, Veland PM, Nygard O. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
- Goddijn-Wessel TAW, Wouters M, Molen van der EF. Hyperhomocysteinemia risk factor for placental abruption or infarction. *Eur Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;66:23-9.
- Wouters MGAJ, Boers GHJ, Blom HJ et al. Hyperhomocysteinemia a risk factor in women with unexplained recurrent early pregnancy loss. *Fertil Steril* 1993;60:820-5.
- Jara-Prado A, Santa María A. Homocisteina: un nuevo factor de riesgo para enfermedades vasculares. *Arch Neurociencia* 2002;7(1):43-50.
- Rajkovic A, Catalano PM, Malinow MR. Elevated homocysteine levels with Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 1997;90:168-71.
- Rajkovic A, Mahomed K, Malinow MR et al. Plasma homocysteine concentrations in eclamptic and preeclamptic African women postpartum. *Obstet Gynecol* 1999;94:355-60.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
- van der Put NM, Grabreels F, Stevens EM. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
- Powers RW, Evans RW, Majors AK et al. Plasma homocysteine concentrations is increased in preeclamptic and is associated with evidence of endothelial activation. *Am J Obstet Gynecol* 1999;179:1605-11.
- Sohda S, Arinami T, Hamada H et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and preeclampsia. *J Med Genet* 1997;34:526-36.
- Grandone E, Margaglione M, Colarizzo D et al. Factor vV Leiden, C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997;77:1052-4.
- Nagy B, Toth T, Rigo J et al. Detection of factor V Leiden mutation in severe preeclampsia. Hungarian women. *Clin Genet* 1998;53:478-81.
- Kaiser T, Brennecke SP, Moses EK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms are not a risk factor for Preeclampsia – Eclampsia in Australian women. *Gynecol Obstet Invest* 2000;50:100-2.
- Lachmeijer Am, Arngrímsson R, Bastiaans EJ et al. Mutations in the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, homocysteine levels, and vitamin status in women with a history of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:394-402.
- Powers RW, Minich LA, Lykins DL et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate and susceptibility to preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest* 1999;6:74-9.
- Chikos AB, Moodley J, Pegoraro RJ et al. 5,10 methylenetetrahydrofolate polymorphisms in black South African women with preeclampsia. *Br Obstet Gynaecol* 1999;106:1219-20

37. Zousterzeel PLM, Visser W, Blom H et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in preeclampsia and HELLP syndrome. *Hypertension Preg* 2000;19(3):299-307.
38. van Pampus MG, Dekker GA, Wolf H et al. High prevalence of hemostatic abnormalities in women with a history of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(4):989-90.
39. Bertina R, Koelman B, Koster T et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
40. Dahlback B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis* 1994;24:139-51.
41. Bonnar J. Venous thromboembolism and pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1981;30:455-73.
42. Spina V, Aleandri V, Morini F. The impact of the factor V Leiden mutation on pregnancy. *Hum Reprod Update* 2000;6(3):301-6.
43. Dizon-Townson D, Nelson L, Easton K et al. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:902-5.
44. D'Elia AV, Driul L, Giacomello R, et al. Frequency of factor V, prothrombin and methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2002;53(2):84-7.
45. Watanabe H, Hamada H, Yamada N, et al. Association analysis of nine missense polymorphisms in the coagulation factor V gene with severe preeclampsia in pregnant Japanese women. *J Hum Genet* 2002;47(3):131-5.
46. Currie L, Peek M, McNiven M, Prosser I, Mansour J, Ridgway J. Is there an increased maternal-infant prevalence of Factor V Leiden in association with severe pre-eclampsia? *BJOG* 2002 Feb;109(2):191-6.
47. van Pampus MG, Wolf H, Koopman MM, van den Ende A, Buller HR, Reitsma PH. Prothrombin 20210 G: a mutation and Factor V Leiden mutation in women with a history of severe preeclampsia and (H)HELLP syndrome. *Hypertens Pregnancy* 2001;20(3):291-8.
48. Livingston JC, Barton JR, Park V, Haddad B, Phillips O, Sibai BM. Maternal and fetal inherited thrombophilias are not related to the development of severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Jul;185(1):153-7.
49. Kim YJ, Williamson RA, Murray JC, et al. Genetic susceptibility to preeclampsia: roles of cytosine-thymine substitution at nucleotide 677 of the gene for methylenetetrahydrofolate reductase, 68-base pair insertion at nucleotide 844 of the gene for cystathionine beta-synthase, and factor V Leiden mutation. *Am J Obstet Gynecol* 2001 May;184(6):1211-7.
50. Rigo J Jr, Nagy B, Fintor L, et al. Maternal and neonatal outcome of preeclamptic pregnancies: the potential roles of factor V Leiden mutation and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase. *Hypertens Pregnancy* 2000;19(2):163-72.
51. Kobashi G, Yamada H, Asano T, et al. The factor V Leiden mutation is not a common cause of pregnancy-induced hypertension in Japan. *Semin Thromb Hemost* 1999;25(5):487-9.
52. De Groot CJ, Bloemenkamp KW, Duvekot EJ, et al. Preeclampsia and genetic risk factors for thrombosis: a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1999 Oct;181(4):975-80.
53. O'Shaughnessy KM, Fu B, Ferraro F, Lewis I, Downing S, Morris NH. Factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase gene variants in an East Anglian preeclampsia cohort. *Hypertension* 1999 Jun;33(6):1338-41.
54. Nagy B, Toth T, Rigo J Jr, Karadi I, Romics L, Papp Z. Detection of factor V Leiden mutation in severe pre-eclamptic Hungarian women. *Clin Genet* 1998 Jun;53(6):478-81.
55. Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D, et al. Factor V Leiden, C > T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia. *Thromb Haemost* 1997 Jun;77(6):1052-4.
56. Dizon-Townson DS, Nelson LM, Easton K, Ward K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996 Oct;175(4 Pt 1):902-5.
57. Campbell D. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987;79:1-6.
58. Powell J, Clozel J-P, Muller R et al. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 1989;245:186-8.
59. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X et al. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genetics* 1993;4:59-61.
60. Kobashi G. A case - control study of pregnancy - induced hypertension with a genetic predisposition: Association of a molecular variant of AGT in the Japanese women. *Hok Ig Zasshi* 1995;70:649-57.
61. Kobashi G, Shido K, Hata A et al. Multivariate analysis of genetic and acquired factors; T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia. *Semin Thromb Hemost* 2001;27(2):143-7.
62. Suzuki Y, Tanemura M, Murakami I et al. Is angiotensinogen gene polymorphism associated with hypertension in pregnancy? *Hypertens Pregnancy* 1999;18:261-71.
63. Guo G, Wilton AN, Fu Y et al. Angiotensinogen gene variation in a population case-control study of preeclampsia/eclampsia in Australians and Chinese. *Electrophoresis* 1997;18:1646-9.
64. Morgan L, Baker P, Pipkin FB et al. Pre-eclampsia and the angiotensinogen gene. *BIOG* 1995;102:489-90.
65. Inoue F, Nakajima T, Williams C et al. A nucleotide substitution in the promoter of human AGT is associated with essential hypertension and effects basal transcriptions. *J Clin Invest* 1997;99:1786-97.
66. Morgan T, Craven C, Nelson L. Angiotensinogen T235 expression is elevated in decidual spiral arteries. *J Clin Invest* 1997;100:1406-15.
67. Morgan T, Ward K. New Insights into the genetics of preeclampsia. *Seminars in Perinatology* 1999;23(1):14-23.
68. Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN et al. Tabulations and expectations regarding the genetics human hypertension. *Kidney Int* 1994;45:s57-s64.
69. Kastelein JJP, Groenemeyer BE, Hallman DM et al. The Asn9 variant of lipoprotein lipase is associated with the -93G promoter mutation and an increased risk of coronary artery disease.
70. Walsh S. Lipid peroxidation in pregnancy. *Hypertens Preg* 1994;13:1-25.
71. Kim YJ, Williamson KC, Smith JL et al. Lipoprotein lipase gene mutations and the genetic susceptibility of preeclampsia. *Hypertension* 2001;38:992-6.
72. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K et al. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovascular Research* 2000;47:38-48.
73. Meekins JW, Pijnenborg R, Anssens M et al. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe preeclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynecol* 1994;101:669-74.
74. Humphrey KE, Harrison GA, Cooper DW et al. HLA-G deletion polymorphisms and preeclampsia/eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1995;102(9):707-10.
75. Birmingham J, Jenkins D, Mc Carthy T et al. Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in preeclampsia. *Biochem Soc Trans* 2000;28(2):215-9.
76. O'Brien M, McCarthy T, Jenkins D et al. Altered HLA-G transcription in pre-eclampsia is associated with allele specific inheritance: possible role of the HLA-G gene in susceptibility to the disease. *Cell Mol Life Sci* 2001 58(12-13):1943-9.
77. Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S et al. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration

- with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 1996;36(6):349-58
78. Goldman-Wohl DS, Ariel I, Greenfield C et al. Lack of human leukocyte antigen-G expression in extravillous trophoblast is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2000 Jan;6(1):88-95
 79. Terranova PF, Huntor VJ, Roby KF. Tumor necrosis factor-alpha in female reproductive tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;209:325-42.
 80. Hun JS, Chen HL, Miller L et al. Tumor necrosis factor: pivotal components of pregnancy? *Biol Reprod* 1996;4554-62.
 81. Wheler T, Evans PW, Anthony FW et al. Relationship between maternal serum vascular endothelia growth factor concentrations in early pregnancy and fetal and placental growth. *Hum Reprod* 1999;14:1619-23.
 82. Nevils B, Conrad K. Increased circulating levels of TNF-a in preeclampsia: A possible role for cytokines in the pathogenesis of the disease. *J Gynecol Invest* 1995;2:311.
 83. Conrad KP, Benyo DE. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:240-9.
 84. Li K, Wang L, Tong X. Study on tumor necrosis factor and pathogenesis of pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1999;34(6):339-41. [Medline](#)
 85. Dekker GA, Sibai BM. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1359-75.
 86. Williams MA, Farrand A, Mittendorf R et al. Maternal second trimester serum tumor necrosis factor-alpha-soluble receptor p55 (sTNFp55) and subsequent risk of preeclampsia. *Am J Epidemiol* 1999 Feb 15;149(4):323-9
 87. Rinehart BK, Terrone DA, Lagoo-Deenadayalan S et al. Expression of the placental cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin 1beta, and interleukin 10 is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(4):915-20.
 88. Dizon-Townson DS, Major H, Ward K. A promoter mutation in the tumor necrosis factor alpha gene is not associated with preeclampsia. *Reprod Immunol* 1998 Apr;38(1):55-61
 89. Livingston JC, Park V, Barton JR. Lack of association of severe preeclampsia with maternal and fetal mutant alleles for tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha genes and plasma tumor necrosis factor alpha levels. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(6):1273-7
 90. Lachmeijer AM, Crusius JB, Pals G et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha gene region and preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2001;98(4):612-9
 91. Heiskanen J, Romppanen EL, Hiltunen M. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene in women with preeclampsia. *J Assist Reprod Genet* 2002;19(5):220-3
 92. Palmer RM, Ferrige AG, Mocada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-26.
 93. Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. Nitric oxide and pregnancy. *Am J Physiol* 1997;272:441-463.
 94. Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1008-1013.
 95. Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, et al. Plasma nitric oxide levels in pregnant patients with preeclampsia and essential hypertension. *Gynecol Obstet Invest* 1996;41:189-193.
 96. Bartha JL, Comino Delgado R, Bedoya FJ, et al. Maternal serum nitric oxide levels associated with biochemical and clinical parameters in hypertension in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;82:201-207.
 97. Di Iorio R, Marinoni E, Emiliani S, et al. Nitric oxide in preeclampsia: lack of evidence for decreases production. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;76:65-70.
 98. Morris NH, Eaton BM, Dekker G. Nitric oxide, the endothelium pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynecol* 1996;103:4-15.
 99. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 1999;100:1515-20.
 100. Yoshimura M. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet* 1998;103:65-69.
 101. Yoshimura M et al. Genetic risk factor for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T786C and missense Glu298Asp variants. *J Invest Med* 2000;48:367-74.
 102. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32:3-8.
 103. Shoji M et al. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci* 2000;66:2557-62.
 104. Shimasaki Y, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;31:1506-10.
 105. McNamara DM, et al. The Asp298 variant of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) improves survival in patients with heart failure. *Circulation* 1999;100:1507.
 106. Teasuro M, Thompson WC, Rogliani P et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 97;2832-35
 107. Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy. *Hypertension* 2001 Dec 1;38(6):1289-93.
 108. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig* 2000 Jul-Aug;7(4):238-41
 109. Kobashi G, Yamada H, Ohta K et al. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am J Med Genet* 2001 Oct 15;103(3):241-4
 110. Tempfer C, Soebbing D, Dorman K et al. ANOS3 polymorphisms is associated with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(1 Pt 2):S18.
 111. Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW et al. Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001 Jun;184(7):1345-50; discussion 1350-1.