

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM NEFROLOGIA
LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA – INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS

MARTA RIBEIRO HENTSCHE

**PRÉ-ECLÂMPSIA:
AVALIAÇÃO DE ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS**

Porto Alegre

2014

MARTA RIBEIRO HENTSCHKE

PRÉ-ECLÂMPsia:
AVALIAÇÃO DE ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS

Tese apresentada como requisito para a obtenção de título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadores: Carlos Eduardo Poli de Figueiredo (PUCRS)

Lucilla Poston (KCL)

Coorientador: Bartira Ercília Pinheiro da Costa (PUCRS)

Porto Alegre

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

H527p Hentschke, Marta Ribeiro

Pré-eclâmpsia : avaliação de aspectos fisiopatológicos e clínicos / Marta Ribeiro Hentschke. – Porto Alegre, 2014.
274 f. : il.

Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde - Área de Concentração em Nefrologia) – Faculdade de Medicina, PUCRS.

Orientadores: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo (PUCRS); Prof.^a Dr.^a Lucilla Poston (KCL).

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Bartira Ercília Pinheiro da Costa (PUCRS).

1. Nefrologia. 2. Pré-Eclâmpsia. 3. Pré-Eclâmpsia/fisiopatologia.
4. Placenta. 5. Citocinas. 6. Lipoproteínas. I. Poli-de-Figueiredo, Carlos Eduardo. II. Poston, Lucilla. III. Pinheiro da Costa, Bartira Ercília.
IV. Título.

CDD 618.75
NLM WQ215

**Ficha Catalográfica elaborada por
Vanessa Pinent
CRB 10/1297**

MARTA RIBEIRO HENTSCHKE

PRÉ-ECLÂMPsia:
AVALIAÇÃO DE ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS

Tese apresentada como requisito para a obtenção de título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nelson Sass – UNIFESP

Prof. Dr. Sérgio Hofmeister de Almeida Martins Costa – UFRGS

Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen – USP

Prof. Dr. Ivan Carlos Antonello – PUCRS

Porto Alegre

2014

Dedico esta Tese a todas as pacientes que durante uma fase tão especial de suas vidas se prontificaram a participar deste estudo, em prol da ciência.

AGRADECIMENTOS

À Dulce Maria Feijó Ribeiro, uma pessoa que sonhou junto comigo, desde o dia em que eu escolhi a medicina, e desde então sempre me deu força nas mais variadas decisões da minha vida. Sem seu apoio e sua parceria eu não teria conseguido chegar até aqui. Mãe, muito obrigada.

Ao meu pai, Roberto Hentschke, que sempre me ensinou a lutar com perseverança e a vencer obstáculos, sempre com bom humor, fosse a dificuldade que existisse, a quem tenho muito carinho e admiração.

Aos meus irmãos, Roberta Ribeiro Hentschke e Fernando Ribeiro Hentschke, pelo carinho e compaixão pelos meus eternos estudos. Ter uma família como essa na retaguarda me faz encarar desafios na certeza de que braços queridos estarão me segurando onde quer que eu vá.

Ao meu namorado, Rafael Costa e Campos, por me dar força e ter sido muito companheiro nas duas grandes decisões da minha vida acadêmica: o início doutorado antes da graduação em medicina e o doutorado sanduíche.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e à professora Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa, meus eternos orientadores na pesquisa e na vida. Ambos foram, desde o ano de 2006, meu pai e minha mãe dentro da Faculdade de Medicina e na pós-graduação.

Ao Giovani Gadonski, um grande médico, cientista e amigo, por todos os ensinamentos em relação à doença hipertensiva gestacional durante os últimos oito anos de convívio no ambulatório de hipertensão.

A todos os colegas do Laboratório de Nefrologia da PUCRS: alunos de Iniciação Científica que me ajudaram com as coletas e processamento das amostras das pacientes e com quem eu tive a honra de partilhar grandes momentos, em especial Alex Sussela, já farmacêutica, Amanda G. Guwzinski, já médica, Fernanda Borsato Caruso, Fernando Sontag, Jeziel Basso, Luciana Pizzutti, Luiza Silveira Lucas, já médica, Mariane Amado de Paula, Patricia Schumacher, já médica, Sílvia Mattos e Vicente Brentando. Às técnicas Júlia Motta e Vanessa Fay, pela grande ajuda no laboratório no meu último ano de doutorado.

Aos colegas de pós-graduação, pela grande amizade que criamos e por todos os dias que ajudamos uns aos outros nos mais variados temas da ciência e da vida, em especial Adriana Comparsi, Annerose Barros, Bruna Krauspenhar, Daniela Moraes, Dra. Letícia Germany Paula, Matias Costa Vieira e Mariza Vieira.

A todo o grupo de médicos, residentes, doutorandos, enfermeiros e técnicos de enfermagem do Centro Obstétrico e do Alojamento Conjunto do Hospital São Lucas da PUCRS que apoiaram a pesquisa. Um agradecimento especial à enfermeira líder Lisiane Moitin Quaresma e sua equipe, ao professor Dr. João Steibel e ao professor Dr. Breno Acauan Filho e sua equipe, pelo grande apoio à pesquisa em hipertensão na gestação nos últimos anos.

Ao prof. Dr. Mário B. Wagner, por todo o seu apoio e dedicação na análise estatística deste trabalho. Obrigada pela paciência e por todos os aprendizados.

À Profa. Dra. Magda Lahorgue Nunes, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e aos funcionários da Faculdade de Medicina e da Pós-Graduação, Vanessa Regina dos Santos e Ernesto Carlos Amaral da Silva, por todo apoio durante o meu doutorado.

Ao prof. Dr. Eurico Camargo Neto, pela confiança em nosso trabalho, nos abrindo espaço no laboratório Nobel para análise de moléculas deste estudo, permitindo que parte deste projeto fosse realizada. Ao técnico de laboratório André Costa, que conduziu o processamento das amostras sempre com muita competência e determinação.

À minha orientadora externa, professora Lucilla Poston, uma grande cientista, que me deu a oportunidade de passar um ano no Departamento de Saúde da Mulher do *King's College London* (KCL), em 2012.

À professora Fiona Broughton Pipkin, uma das pesquisadoras mais incríveis que já conheci, e com quem tive a honra de conviver e aprender durante meu estágio sanduíche na Inglaterra.

Um agradecimento muito especial a todos os meus colegas de pós-graduação e funcionários do Departamento de Saúde da Mulher do KCL, em especial ao Dr. Hiten Mistry, um grande pesquisador, por todos os aprendizados e orientações que me possibilitaram realizar grande parte deste trabalho. À Anna Czajka, Kate Bramham, Kate Smith-Jackson Lesia Kurlak e Lucy Chappell pelos trabalhos que desenvolvemos juntas, a amizade que criamos, e os ensinamentos que me foram passados ao longo do ano de 2012. À Anabela Guedes, Cally Gill, Evonne Chin-Smith, Funso Adegoke, Hannah Powles, Joaquim Pombo, Katharina Dorothea, Ksanthi Maragkoudaki, Laima White, Melanie Griffin, May Ching Soh, Pei Lai, Rima Patel, Ruth Cate, Steven Lynham e Yosef Mansour, por terem me ajudado em todos os momentos que precisei, sempre com muito carinho por mim e pela minha família. Muito obrigada pela amizade e acolhimento de todos.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que deu oportunidade para que o programa MD-PhD da CAPES fosse implantado na Faculdade de Medicina, com o qual eu fui contemplada.

À Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Hospital São Lucas da PUCRS, que propiciam um curso de pós-graduação de excelência no Brasil, do qual eu tive a honra de fazer parte durante quatro anos.

Aos órgãos de fomento do Laboratório de Nefrologia do HSL: Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e principalmente Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que me concedeu a bolsa de doutorado integral e de doutorado sanduíche. Agradeço ainda ao fomentador do Departamento de Saúde da Mulher do KCL, Tommy's Charity.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto. Muito Obrigada!

RESUMO

Pré-eclâmpsia: Avaliação de aspectos fisiopatológicos e clínicos

A pré-eclâmpsia é uma das principais causas de mortalidade materna no mundo. Embora alguns fatores etiológicos, tais como má placentação, disfunção endotelial, inflamação materna exacerbada, angiogênese deficiente e hipoxia placentária têm sido propostos, a etiologia da pré-eclâmpsia ainda não foi completamente compreendida. A teoria da má adaptação imune sugere que a pré-eclâmpsia pode estar envolvida com um desbalanço Th1/Th2 prejudicial à gestação, com liberação de citocinas e fatores de crescimento na circulação materna. A presença desses mediadores parece desempenhar um papel na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, resultando nos sinais clínicos da doença: a hipertensão e a proteinúria. Assim, este estudo pretendeu analisar diferentes vias metabólicas durante a gestação, a fim de tentar elucidar um biomarcador para a doença. Nossa hipótese é a de que moléculas relacionadas ao sistema inflamatório estariam aumentadas no plasma materno e na placenta de mulheres com pré-eclâmpsia e diminuídas no plasma fetal. O estudo foi realizado no Hospital São Lucas da PUCRS, Brasil, onde fizemos a coleta das amostras para o projeto “Moléculas mediadoras e a pré-eclâmpsia”, e no *St Thomas’ Hospital*, em Londres, Reino Unido, onde os projetos “Lipoproteínas e a pré-eclâmpsia” e “Proteínas das cavéolas e a pré-eclâmpsia” foram desenvolvidos. No HSL/PUCRS, amostras de plasma materno-fetal e placenta foram coletadas de 117 gestantes com e sem pré-eclâmpsia no terceiro trimestre da gestação. As moléculas (Endocan-1, PIGF, IL-6, TNF α , MCP-1, NGF, LIGHT e Leptina) foram dosadas por ensaio de detecção multiplex. Em Londres, um estudo com 51 gestantes foi realizado analisando expressão placentária das seguintes moléculas: receptores e mediadores de lipoproteínas (LRP-1, LDL-R, SRB1, ABCA1, MTTP e PDIA2) e proteínas do complexo das cavéolas (Caviolina-1-3, Cavins 1-4, eNOS e iNOS), que foram analisadas por PCR-TR e imuno-histoquímica. Resumidamente, encontramos altos níveis de Endocan-1 e TNF α no plasma materno, baixos níveis de IL-6 no plasma fetal de pacientes com pré-eclâmpsia, no ensaio de citocinas. Ainda, foi encontrada uma correlação entre o gene LRP-1 e recém-nascidos pequenos para a idade gestacional, no grupo com pré-eclâmpsia, no ensaio de receptor de lipoproteínas. E, por fim, uma redução da expressão de Caveolina-1 na placenta pré-eclâmpsica foi observada e parece ter resultado numa ativação compensatória crônica da eNOS para tentar atenuar a vasoconstrição observada na pré-eclâmpsia. Concluindo, nossos resultados mostraram novos dados em relação à pré-eclâmpsia, que podem ser úteis para o entendimento de sua fisiopatologia.

Palavras-chave: Gravidez. Hipertensão. Placenta. Endotélio. Citocinas. Lipoproteínas. Óxido Nítrico Sintase. Cavéolas.

ABSTRACT

Pre-eclampsia: Evaluation of pathophysiological and clinical aspects

Pre-eclampsia is one of the leading cause of maternal mortality worldwide. Although some etiological factors such as poor placentation, endothelial dysfunction, excessive maternal inflammation, poor angiogenesis, and placental hypoxia have been proposed, the etiology of pre-eclampsia has not been fully understood. An immune maladaptation theory suggests that pre-eclampsia might be involved in an inappropriate regulation of normally Th2-deviated maternal immune response, leading to a shift toward harmful Th1 immunity, delivering a large amount of cytokines and growth factor molecules through maternal circulation. The presence of these mediators seems to play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia, resulting in the clinical signs of the disease: hypertension and proteinuria. Thus, this study pretended to analyze different pathways during gestation in order to try to elucidate a biomarker for the disease. We hypothesize that molecules related to inflammatory system would be up-regulated in maternal plasma and placenta from women with pre-eclampsia and down regulated in fetal plasma. The study was performed at Hospital São Lucas of PUCRS, Brazil, where we made “Mediating molecules and pre-eclampsia”, and at St Thomas’ Hospital, London, UK, where “Lipoproteins and pre-eclampsia” and “Caveola proteins and pre-eclampsia” projects were developed. At HSL/PUCRS, maternal/fetal plasma and placenta samples were collected from 117 pre-eclampsia and normal pregnant women in third trimester pregnancy, after informed written consent. The cytokines (Endocan-1, PlGF, IL-6, TNF α , MCP-1, NGF, LIGHT, Leptina) were measured by multiplex detecting assay. In London, a study with 51 pregnant women was conducted analysing placenta expression of the following molecules: lipoproteins pathway (LRP-1, LDL-R, SRB1, ABCA1, MTTP and PDIA2) and protein caveolae complex (Caveolin-1-3, caveolins 1-4, eNOS and iNOS) which were performed by PCR-RT and immunohistochemistry. Briefly we found high levels of Endocan-1 and TNF α in pre-eclamptic maternal plasma, low levels of IL-6 in fetal plasma in cytokines assay. Also a correlation between LRP-1 gene and small for gestational age infants in lipoproteins receptor assay was found. Finally, a reduction expression of Caveolin-1 found in pre-eclamptic placenta seems to result in a compensatory chronic activation of eNOS to attenuate vasoconstriction seen in pre-eclampsia. In conclusion, our results showed new data in relation to pre-eclampsia, which might be helpful for the understanding of its pathophysiology.

Keywords: Pregnancy. Hypertension. Placenta. Endothelium. Cytokines. Lipoproteins. Nitric Oxide Synthase. Caveolae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –Remodelação placentária em gestantes normais e com pré-eclâmpsia.....	27
Figura 2 – Transporte placentário de nutrientes (barreira materno-fetal)	29
Quadro 1 –Classificação da doença hipertensiva gestacional (NHBPEPWG, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; ISSHP, 2011).	32
Quadro 2 – Fatores de risco para síndrome de pré-eclâmpsia.....	34
Quadro 3 –Critérios de gravidade para a pré-eclâmpsia	35
Figura 3 – Fisiopatologia da pré-eclâmpsia: isquemia placentária edisfunção endotelial	37
Figura 4 –O modelo de dois estágios da pré-eclâmpsia	39
Quadro 4 –Biomarcadores da pré-eclâmpsia (PE)	40
Figura 5 – Ilustrações de coleta de amostras: plasma materno, plasma fetal e placenta.....	54
Quadro 5 – Dosagens de moléculas mediadoras no plasma materno-fetal e placenta entre gestantes normais (GN) <i>versus</i> síndrome de pré-eclâmpsia (SPE)	63
Figura 6 – Gráficos de média e barra de erros representando os intervalos de confiança de 95% para a comparação das gestantes normotensas <i>versus</i> gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, para os níveis de citocinas em valores logarítmicos no plasma materno, plasma fetal e na placenta, após aplicação do teste de ANCOVA.....	64
Figura 7 – Gráficos de <i>boxplot</i> representando, em escala linear, os valores das citocinas nas gestantes normais (GN) <i>versus</i> gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) no plasma materno (a), no plasma fetal (b) e na placenta (c).	65
Quadro 6 –Quadro representativo dos valores de <i>p</i> correspondentes à Análise de Covariância realizadas após a estratificação do grupo síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) de acordo com idade gestacional (IG), pressão arterial sistólica (PAS), proteinúria (Pr) e pré-eclâmpsia sobreposta (PES).	68
Quadro 7 – Representação dos valores de média geométrica (mG), razão das médias (RM) e intervalo de confiança (IC) de 95% para aquelas citocinas que apresentaram significância estatística após a estratificação do grupo de síndrome de pré-eclâmpsia.....	69
Quadro 8 –Análise de correlação da idade gestacional no parto, peso do RN e peso placenta em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia	72
Quadro 9 –Análise de correlação do peso inicial, peso final e diferença de pesos em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia.....	73

Quadro 10 –Análise de correlação do IMC do peso inicial, IMC do peso final e diferença de IMC em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia	74
Quadro 11 –Correlação citocinas com pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e proteinúria em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia.....	75
Quadro 12 –Correlações fortes e muito fortes entre as citocinas em estudo em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia.....	76
Figura 8 –Representação esquemática das correlações encontradas entre as citocinas nas diferentes amostras, e entre as amostras para uma mesma citocina	77
Quadro 13 –Correlação dos níveis de citocinas entre as diferentes amostras (plasma materno, plasma fetal e placenta) em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia	78
Figura 9 – Figura ilustrativa da função dos receptores, mediadores e transportadores da rota metabólica do colesterol, no fígado	97
Figura 10 – Figura representativa do ponto de coleta do tecido placentário.....	103
Figura 11 – Figura ilustrativa dos estágios térmicos de um ciclo da reação em cadeia de polimerase (PCR)	105
Figura 12 – Exemplo de um processo de elaboração da curva padrão para análise de RNAm utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR).....	110
Figura 13 – Análise da concentração lipoproteica sérica na circulação materna e fetal, de pacientes controles e com pré-eclâmpsia.....	114
Figura 14 – Ilustração da análise da expressão placentária dos genes em estudo utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real	115
Figura 15 – Ilustração do imunoensaio da proteína LRP-1 em placentas de pacientes com pré-eclâmpsia, em relação ao percentil fetal.....	116
Figura 16 – Representação em <i>boxplot</i> da expressão placentária proteica de LRP-1 em pacientes com pré-eclâmpsia com neonatos adequados para a idade gestacional <i>versus</i> pequenos para a idade gestacional.....	117
Quadro 14 – Correlações entre receptores, mediadores e transportadores do colesterol estudados, no grupo de gestantes normais (a) e no grupo com pré-eclâmpsia (b)	118
Figura 17 – Ilustração do complexo cavéola, suas proteínas e possíveis funções	128
Figura 18 – Esquema representativo da relação das proteínas da cavéola com a óxido nítrico sintase	129

Figura 19 – Ilustração de exemplos de testes de diluições para a técnica Western Blot para diferentes concentrações e moléculas específicas	135
Figura 19a – Ilustrações de quatro diferentes concentrações - análise da técnica Western Blot	135
Figura 19b – Ilustração de exemplos de testes com amostras com a técnica Western Blot para as moléculas de iNOS e Cavin-2	136
Figura 19c – Ilustração de exemplos de testes com amostras com a técnica Western Blot para as moléculas de Caveolina-2, Cavin-2 e Caveolina-3	136
Figura 20 – Ilustração de exemplo de teste de diluições para análise imuno-histoquímica de uma proteína específica, no exemplo a óxido nítrico sintase indizível	137
Figura 21 – Ilustração das concentrações finais das proteínas Cavin-2-4, Caveolina-2, Caveolina-3 e iNOS para análise com imuno-histoquímica.....	138
Figura 22 –Expressão placentária normalizada de RNAm de Caveolina-1 a 3, Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS em gestantes normais e pacientes com pré-eclâmpsia	140
Figura 23 –Expressão e localização das proteínas Caveolina-1 a 3, Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS em placenta de gestantes normais e com pré-eclâmpsia.....	142
Figura 24 – Ilustração da análise de correlação entre expressões de RNAm das moléculas estudadas em relação a gestantes normotensas, pré-eclâmpicas e no grupo como um todo .	143
Figura 25 – Ilustração da análise de correlação entre expressões de proteína das moléculas estudadas em relação a gestantes normotensas, pré-eclâmpicas e no grupo como um todo .	144
Quadro 15 – Análise de correlação entre moléculas mediadoras de lipoproteínas com aquelas do complexo das cavéolas em gestantes normais e com pré-eclâmpsia.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Análise dos dados das características maternas: anamnese e exame físico em relação a gestantes normais (GN) e com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE).....	59
Tabela 2 –Análise dos dados de IMC estratificado por categorias conforme a idade gestacional em gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia	59
Tabela 3 –Análise de dados do parto: parâmetros maternos e fetais em relação a gestantes normais (GN) e com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE)	60
Tabela 4 – Análise dos exames laboratoriais maternos em relação a gestantes normais (GN) e com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE).....	61
Tabela 5 –Detalhes da sequência dos <i>primers</i> dos sete genes de interesse: LDL-R, LRP-1, SRB1, PON-1, ABCA1,MTTP, PDIA2	107
Tabela 6 – Dados clínicos e bioquímicos das pacientes em relação a gestantes normais e com pré-eclâmpsia.....	113
Tabela 7 – Expressão placentária de RNAm dos receptores, transportadores e mediadores analisados em gestantes normais e com pré-eclâmpsia	115
Tabela 8 –Detalhe da sequência dos <i>primers</i> dos nove genes de interesse no estudo dos componentes da cavéola em pacientes com pré-eclâmpsia	132
Tabela 9 – Descrição dos anticorpos primários e suas diluições para ensaio de Western Blot e imuno-histoquímica	134
Tabela 10 – Dados clínicos e bioquímicos dos sujeitos do estudo em relação a gestantes normais e com pré-eclâmpsia	139
Tabela 11 – Análise imuno-histoquímica. Expressão placentária de Caveolinas, Cavin, iNOS e eNOS em gestantes controles e com pré-eclâmpsia.	141

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABCA1	Transportador ABCA1 – ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	Transportador ABCG1 – ATP-binding cassette transporter G1
ADAM12	A desintegrina e metaloproteinase Domínio 12
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AIG	Adequado para a idade gestacional
ANCOVA	Análise de covariância
Apo	Apolipoproteínas
AT ₁ -AA	Autoanticorpos do receptor de angiotensina II tipo 1
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAV	Caveolina
CEP	Comitê de ética e pesquisa
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CIUR	Crescimento intrauterino restrito
cNOS	NOS constitutiva
Cols	Colaboradores
CTN	Controles negativos
CT	Colesterol total
DHG	Doença hipertensiva gestacional
DM	Diabete mellitus
DMF	Dilatação mediada por fluxo
DMG	Diabete mellitus gestacional
DM2	Diabete mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDCF	Fatores de contração derivados do endotélio
EDRF	Fatores de relaxamento derivados do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Endocan-1/ESM-1	Molécula específica de célula endotelial
eNOS	NOS endotelial
ET-1	Endotelina-1
FABPpm	<i>Fatty acid binding protein</i>
FAT	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP	<i>Fatty acid transport protein</i>
fβ-hCG	Subunidade livre β da gonadotrofina coriônica humana
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GIG	Grande para a idade gestacional
GLUTs	Transportadores de glucose
GMP	Guanosina monofosfato
GN	Gestantes normais
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HC	Hipertensão crônica
hCG	Hormônio coriônico gonadotrófico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HELLP	<i>Hemolytic anemia; Elevated Liver enzymes; LowPlatelet count</i>
hLP	Hormônio lactogênio placentário

HSL	Hospital São Lucas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IG	Idade gestacional
IGO	Idade gestacional obstétrica
IGP	Idade gestacional pediátrica
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IQR	Intervalo interquartil
ISSHP	<i>International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy</i>
ITU	Infecção do trato urinário
KCL	<i>King's College London</i>
kDa	Quilodalton
KTTP	Tempo de tromboplastina parcial ativada
LDH	Lactato desidrogenase
LDL-R	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LE	Lipase endotelial
LIGHT	LIGHT – membro da superfamília TNF
LLP	Lipase lipoproteica
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LRP-1	Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
mG	Média geométrica
MMP	Metaloproteinases
MMV	Membrana microvilosa
MPB	Membrana plasmática basal
MTTP	Maior subunidade da proteína de transferência de triglicerídeos microsomal
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NHBPEPWG	<i>National high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy</i>
NGF	Fator de crescimento neural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PAPPA-2	Papalisina A-2
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
Pb	Par de bases
P/C	Proteinúria em amostra sobre creatinúria em amostra
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-TR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PCSK9	Proteína convertase <i>subtilisin/kexin</i> do tipo 9
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PDIA2	Proteína dissulfeto isomerase família A, membro 2

PE	Pré-eclâmpsia
PES	Pré-eclâmpsia sobreposta
PIG	Pequeno para a idade gestacional
PIGF	Fator de crescimento placentário
PGL ₂	Prostaciclina
PON	Paraoxonase
PP-13	Proteína Placentária 13
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
PTX3	Pentraxin 3
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RM	Razão das médias
RN	Recém-nascido
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RVP	Resistência vascular periférica
sEng	Endoglina solúvel
sFlit-1	Fms-like tirosina quinase solúvel 1
SNC	Sistema nervoso central
SPE	Síndrome de pré-eclâmpsia
SRA	Sistema renina angiotensina
SRB1	Receptor scavenger classe B tipo 1
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TG	Triglicerídeos
TGF-β	Fator transformador de crescimento beta
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TLG	Lipase de triglicéridos
TP	Tempo de protrombina
TRP	Potencial receptor transiente
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	23
1.2 A GESTAÇÃO	25
1.2.1 A Gestação – ‘Estado Interessante’	25
1.2.2 Da embriogênese à placentação.....	25
1.2.3 A importância da placenta e as trocas placentárias	27
1.2.4 A nutrição do embrião e do feto	28
1.3 A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	31
1.5 PRÉ-ECLÂMPسيا.....	33
1.5.1 Pré-eclâmpسيا: epidemiologia.....	33
1.5.2 Pré-eclâmpسيا: fatores de risco	33
1.5.3 Pré-eclâmpسيا: critérios de gravidade.....	35
1.5.4 Pré-eclâmpسيا: fisiopatologia	36
1.5.5 Pré-eclâmpسيا: o endotélio vascular	38
1.5.6 Pré-eclâmpسيا: o modelo de dois estágios	38
1.5.7 Pré-eclâmpسيا: descobertas recentes e possíveis biomarcadores.....	40
1.5.8 Pré-eclâmpسيا: condutas	43
1.6 OBJETIVOS	44
1.6.1 Objetivo Geral	44
1.6.2 Objetivos específicos	44
2 DESENVOLVIMENTO.....	47
2.1 BLOCO 1: MOLÉCULAS MEDIADORAS E A FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPسيا	47
2.1.1 Introdução.....	47
2.1.2 Objetivos.....	49
2.1.2.1 Objetivo geral	49
2.1.2.2 Objetivos específicos.....	49
2.1.3 Metodologia.....	50
2.1.3.1 Delineamento do estudo	50
2.1.3.2 Seleção de pacientes	50
2.1.3.3 Critérios de exclusão	50
2.1.3.4 Cálculo amostral	51
2.1.3.5 Definição operacional da pré-eclâmpسيا.....	51

2.1.3.6 Coleta das amostras	52
2.1.3.7 Exames laboratoriais	55
2.1.3.8 Preparação das amostras	55
2.1.3.9 Moléculas em estudo	56
2.1.3.10 Seleção das citocinas	56
2.1.3.11 Ensaio multiplex	57
2.1.3.12 Análise dos dados demográficos maternos e fetais	57
2.1.3.13 Análise estatística	58
2.1.4 Resultados.....	59
2.1.4.1 Sujeitos do estudo.....	59
2.1.4.4 Estratificação da amostra.....	67
2.1.4.5 Estimativa da magnitude da diferença entre os grupos	67
2.1.4.6 Análise de correlações	70
2.1.5 Discussão.....	79
2.1.5.1 Os sujeitos do estudo: anamnese e exame físico materno	79
2.1.5.2 Os dados do parto: parâmetros maternos e fetais	81
2.1.5.3 Exames laboratoriais em gestantes normais e com pré-eclâmpsia	82
2.1.5.4 As moléculas em estudo	83
2.1.6 Conclusão	90
2.1.6.1 Considerações finais	91
2.2 BLOCO 2: PROJETO A: LIPOPROTEÍNAS E A PRÉ-ECLÂMPسيا E PROJETO B: PROTEÍNAS DAS CAVÉOLAS E A PRÉ-ECLÂMPسيا	94
2.2.1 Projeto A: Lipoproteínas e a pré-eclâmpsia	94
2.2.1.1 Lipídios, lipoproteínas e a gestação.....	94
2.2.1.2 Introdução – lipoproteínas e a gestação.....	95
2.2.1.2.1 Metabolismo lipídico.....	95
2.2.1.2.2 Lipoproteína – estrutura e função.....	95
2.2.1.2.3 Efluxo de colesterol: HDL, SRBI, PON-1 e ABCA1.....	97
2.2.1.2.4 Receptores da família LDL: LDL-R e LRP-1	98
2.2.1.2.5 MTTP e PDIA2	99
2.2.1.2.6 Lipídios e a placenta humana	99
2.2.1.2.6.1 Princípios de transferência placentária e transporte de lipídios	99
2.2.1.2.6.2 Triglicerídeos e ácidos graxos	100
2.2.1.2.6.3 Lipoproteínas	100

2.2.1.2.6.4 Receptores, mediadores e transportadores de colesterol	101
2.2.1.3 Objetivos.....	101
2.2.1.4 Metodologia.....	102
2.2.1.4.1 Pacientes e critério de seleção	102
2.2.1.4.2 Coletas de amostras para o estudo	102
2.2.1.4.3 Dosagens das amostras	103
2.2.1.4.4 Técnicas utilizadas para análise das amostras	104
2.2.1.4.4 1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real	104
2.2.1.4.4 2 Ensaio de imuno histoquímica.....	111
2.2.1.5 Resultados.....	112
2.2.1.5.1 Sujeitos do estudo.....	112
2.2.1.5.2 Análise bioquímica	113
2.2.1.5.3 Lipoproteínas em soro materno, fetal e placenta.....	114
2.2.1.5.4 Expressões placentária de receptores, mediadores e transportadores.....	115
2.2.1.5.5 Relação da expressão placentária com a pré-eclâmpsia	115
2.2.1.5.6 Expressão de lipoproteína placentária e neonatos pequenos para a idade gestacional	116
2.2.1.5.7 Análise de correlações	118
2.2.2 Bloco 2: Projeto B: Proteínas das cavéolas e a pré-eclâmpsia	125
2.2.2.1 O endotélio vascular e o óxido nítrico.....	125
2.2.2.2 Óxido nítrico Sintases.....	125
2.2.2.3 Óxido nítrico, gestação e pré-eclâmpsia.....	126
2.2.2.4 Complexo da cavéola e a pré-eclâmpsia.....	127
2.2.2.5 Objetivo	131
2.2.2.6 Metodologia.....	131
2.2.2.6 1 Dosagens das amostras	131
2.2.2.6 2 Técnicas utilizadas para análise das amostras	132
2.2.2.6 3 Análise estatística	138
2.2.2.7 Resultados.....	138
2.2.2.7.1 Sujeito do estudo	138
2.2.2.7.2 Expressão placentária de RNAm.....	139
2.2.2.7.3 Expressão placentária proteica	141
2.2.2.7.4 Análise de correlações	143
2.2.2.7.4.1 Correlação Projeto A com Projeto B	145

2.2.2.8 Discussão	146
2.2.2.9 Conclusão	148
2.2.2.9.1 Perspectivas	148
3 CONCLUSÃO GERAL	150
3.1 COMENTÁRIOS FINAIS	154
REFERÊNCIAS	160
APÊNDICES	180
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HSL/PUCRS para uso na linha de Pesquisa em Nefrologia.....	181
APÊNDICE B - Protocolo de coleta padronizado da linha de Pesquisa em Nefrologia - Hipertensão na gestação. Laboratório de Nefrologia/IPB	183
APÊNDICE C – Protocolo para preparação das amostras - Ensaio Multiplex.....	184
APÊNDICE D – Quadro representativo da Análise de Covariância - Estratificação do grupo de Síndrome de Pré-eclâmpsia por prematuridade.....	185
APÊNDICE E- Protocolo do ensaio de Reação em cadeia da Polimerase em tempo Real (PCR-TR).....	186
APÊNDICE F - Protocolos para a Realização do ensaio de Imunohistoquímica	188
APÊNDICE G - Protocolos para ensaio de Western Blot.....	190
APÊNDICE H - Ficha de avaliação inicial usada na assistência das pacientes que consultam no ambulatório de hipertensão na gestação (laboratório de Nefrologia). 192	
APÊNDICE I – Artigos publicados/submetidos como primeira autora.....	200
ANEXOS	268
ANEXO A - Aprovação do Projeto pela Comissão Científica do HSL/PUCRS	269
ANEXO B - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUCRS.....	270
ANEXO C – Bula do Inibidor de Protease utilizado no ensaio Multiplex.....	271
ANEXO D – Relatórios do Doutorado Sanduíche pelos orientadores Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo e Prof. Lucilla Poston.	272

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este estudo é parte integrante das pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) em colaboração com o Serviço de Obstetrícia do Hospital São Lucas (HSL) e com o Departamento de Saúde da Mulher do *King's College London* (KCL). É parte do Programa MD-PhD da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (edital 14/2008), que visa à formação de pesquisadores altamente qualificados e fortemente motivados para uma carreira que contemple tanto a atividade médica prática quanto a pesquisa científica. No Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS, quatro acadêmicos de medicina foram contemplados, dentre os quais a autora do presente trabalho.

Esta tese de doutorado está inserida na linha de pesquisa que estuda os distúrbios hipertensivos da gestação. O grupo tem estudado pacientes com e sem pré-eclâmpsia (PE) e avaliado vários aspectos da via L-arginina/óxido nítrico, da função endotelial, do polimorfismo genético, do transporte de membrana celular e dos aspectos imunológicos que poderiam estar envolvidos na fisiopatologia dessa doença. Dos achados mais relevantes até então estão as alterações na via L-arginina/óxido nítrico, em especial o aumento da atividade fosfodiesterásica no plasma de gestantes com PE e do potencial envolvimento de citocinas inflamatórias na fisiopatologia da PE. Além das pesquisas laboratoriais, estabeleceu-se um ambulatório para seguimento dessas mulheres com o objetivo de verificarmos os desfechos clínicos em longo prazo.

A estrutura da tese segue as orientações formais do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS. Conforme as instruções, a tese deve ser dividida em *parte externa* e *parte interna*. A parte interna deve ser composta de elementos pré-textuais, textuais e pós-textuais. As sessões obrigatórias dos elementos textuais devem ser introdução, desenvolvimento e conclusão. Assim, o 'Desenvolvimento' desta tese foi composto de dois blocos. O Bloco 1, com foco nas citocinas inflamatórias e em outros fatores endoteliais que podem estar envolvidos na PE; e o Bloco 2, dividido em 'A' e 'B'. O Bloco '2A' tem como foco o estudo das lipoproteínas e seus receptores placentários na PE, já o

Bloco '2B' visa identificar fatores relacionados à mediação de enzimas e proteínas do complexo das cavéolas que poderiam estar relacionadas à PE.

Ao final da tese, no setor 'Apêndices', da parte pós-textual, estão retratados trabalhos e publicações do Grupo de Pesquisa em Nefrologia da PUCRS nos quais a doutoranda teve grande participação durante o período do doutorado, mas que não fizeram parte do objetivo principal desta da tese. A opção de adicionar aos Apêndices artigos publicados durante o período do doutorado foi uma opção da autora juntamente com seus orientadores, visto que tais projetos foram desenvolvidos ao longo do curso de Medicina e finalizados durante o doutorado, contemplando os objetivos do programa MD-PhD.

A estrutura desta tese segue o modelo para apresentação de trabalhos acadêmicos, teses e dissertações elaborado pela Biblioteca Central Irmão José Otão, PUCRS (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL, 2011).

1.2 A GESTAÇÃO

1.2.1 A Gestação – ‘Estado Interessante’

Os antigos chamavam a gravidez de “estado interessante”. Naquele período, o *interessante* era observar o corpo das mulheres se transformando, por nove meses, até a chegada de um novo ser, como qualquer outro mamífero. Atualmente, o *interessante* passou a ser também o estudo detalhado dessa mudança, desde suas condições fisiológicas mais bem documentadas e brilhantes até seus desfechos mais inesperados e intrigantes.

1.2.2 Da embriogênese   placentac o

A placenta é essencial não apenas para o sucesso da gestação, mas também para o desenvolvimento da Doença Hipertensiva Gestacional (DHG). Dessa forma, esta seção reportar  de forma resumida o desenvolvimento normal da placenta.

Fisiologicamente, após a fecundação de um ovócito secundário com um espermatozoide, inicia o processo contínuo de desenvolvimento embrionário humano. De zigoto a um organismo humano multicelular, passando por clivagens, formação dos blast meros e blastocisto e, enfim, a *Nida o* (implantação), o binômio mãe-feto vai se adaptando às transformações anat micas, fisiológicas e bioquímicas de uma gravidez (SIBAI e FRANGIEH, 1995; KEITH L.MOORE, 2011; REZENDE, 2013). O blastocisto apresenta dois conjuntos de células: o trofoblasto e o botão embrionário. Assim que o blastocisto se implanta no epitel o endometrial, as células do trofoblasto emitem prolongamentos, as vilosidades cori nicas, que se implantam no endométrio uterino e iniciam a digestão enzimática dos vasos sanguíneos, formando lacunas cheias de sangue materno. O trofoblasto viloso que fica então em contato direto com o sangue materno forma a barreira placentária entre o tecido materno e o fetal, dando início   formação da placenta humana.

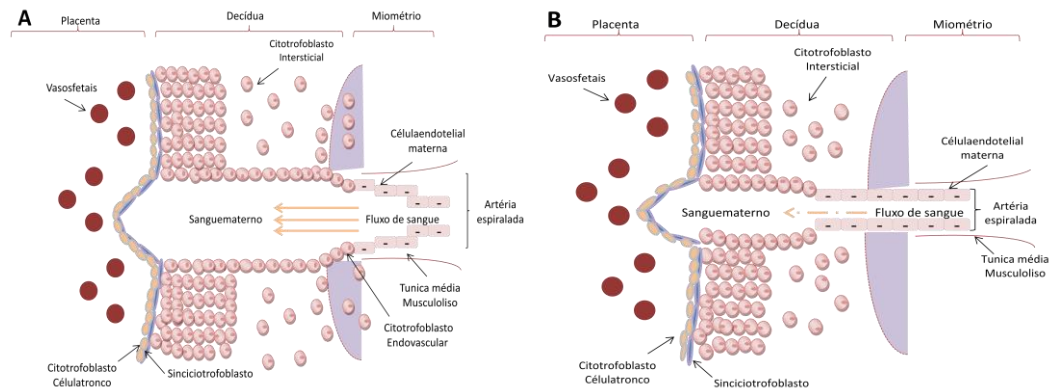
A implantação normalmente está finalizada no final da segunda semana após a concepção. A diferenciação do trofoblasto é essencial para a implantação correta e contínuo da invasão trofoblástica uterina. Durante esse período, estruturas extra embrionárias, como cavidade amniótica, saco vitelínico e coriônico, são também formadas.

As células do trofoblasto se diferenciam e proliferam rapidamente, dividindo-se em três conjuntos principais de células, com funções distintas: 1) o *sinciciotrofoblasto*—o principal componente endócrino da placenta, que forma o revestimento epitelial das

vilosidades placentárias e é responsável pelo transporte de gases, nutrientes, metabólitos e pela produção de hormônios (estrogênio, progesterona, glicocorticoides, hormônio lactogênio placentário – hLP, Hormônio Coriônico Gonadotrófico – hCG) que irão participar no controle metabólico fetal, materno e placentário ao longo da gravidez; 2) o *citotrofoblasto viloso*, que se prolifera ao longo da gravidez e se funde com o sinciciotrofoblasto viloso; e 3) o *trofoblasto extraviloso*, que são as células responsáveis pela invasão placentária, de forma a ancorar a placenta à decídua e ao miométrio (MISTRY, 2013).

A invasão trofoblástica endovascular ocorre em dois estágios (“ondas de invasão”), que são necessários para o sucesso da gestação (HUPPERTZ, 2012). A primeira onda de migração, a partir de oito semanas, atinge apenas o segmento decidual das artérias espiraladas, e a segunda onda de migração, que se inicia em torno de 16 semanas, alcança a zona de junção miometrial. Por volta de 18 semanas, substitui-se o endotélio vascular, e as artérias espiraladas passam a apresentar trofoblasto endovascular incorporado na parede dos vasos (MISTRY, 2013). Assim, as artérias espiraladas são decidualizadas e se convertem em artérias uteroplacentárias, o que resulta no circuito hemodinâmico de baixa resistência entre as artérias radiais e o espaço interviloso. A remodelação só é finalizada no início do segundo trimestre gestacional. Na gestação normal, os efeitos desse fenômeno são a conversão desses vasos em vasos flexíveis de parede fina que não respondem a estímulo vasoconstritor, permitindo, assim, um fluxo máximo sanguíneo para a placenta. Entretanto, de forma “*inesperada e intrigante*”, a remodelação pode estar comprometida tanto na PE (Figura 1) como no crescimento intrauterino restrito (CIUR). Sabe-se que a remodelação das artérias espiraladas ocorre em 95% dos vasos existentes no leito placentário e em menor número na periferia, formando, no começo do quinto mês, a placenta hemocorial profunda humana (REZENDE, 2013). Na PE e no CIUR parece haver uma invasão trofoblástica deficiente que não atinge a zona de junção miometrial (ausência de segunda onda de migração), deixando intocada a estrutura arterial, predispondo-a à aterosose aguda, com grande limitação do fluxo uteroplacentário. Acredita-se que apenas 10% das artérias espiraladas sofrem remodelação completa na PE, o que leva o nome de “implantação anômala superficial” (PIJNENBORG *et al.* 1991; REZENDE, 2013).

Figura 1–Remodelação placentária em gestantes normais e com pré-eclâmpsia



Fonte: Hentschke (2013) (MISTRY, 2013, p.11). 1A) Remodelação das artérias espiraladas em gestantes normais. 1B) Remodelação das artérias espiraladas em pacientes com pré-eclâmpsia.

1.2.3 A importância da placenta e as trocas placentárias

Um dos papéis fundamentais da placenta é o transporte de nutrientes maternos para o feto e o recebimento de produtos residuais do feto para ser passado para a mãe. No entanto, a circulação materna e a fetal são independentes, não havendo, em condições normais, comunicação alguma entre elas (REZENDE, 2013).

Anatomicamente, na placenta humana, há duas camadas de células entre o sangue materno e a circulação fetal: o epitélio transportador – sinciciotrofoblasto– e o endotélio do capilar fetal (REZENDE, 2013). Os capilares da placenta humana apresentam fendas paracelulares, o que possibilita a transferência irrestrita de moléculas, como a glicose e os aminoácidos, através da parede capilar. Por outro lado, a placenta possui duas membranas plasmáticas polarizadas no sinciciotrofoblasto, que representam a barreira primária da transferência de nutrientes e da maioria dos íons. A membrana plasmática diretamente em contato com o sangue materno é a membrana microvilosa (MMV), enquanto a membrana plasmática basal (MPB) aponta para os capilares fetais.

1.2.4 A nutrição do embrião e do feto

Até a quarta semana de gravidez, a fonte de material nutritivo para o feto se dá através de nutrientes existentes na luz tubária e uterina, muco das glândulas endometriais e reservas de vesícula vitelina até o início da nutrição hemotrófica pela penetração dos capilares. Após a quarta semana, inicia-se a nutrição por sangue materno pela decídua capsular, e em torno da nona semana da gestação, já se inicia o período fetal (BURTON, JAUNIAUX e CHARNOCK-JONES, 2007). Acredita-se que aproximadamente metade da gordura corporal fetal é proveniente de fontes maternas que atravessam a placenta durante a gestação; as demais, provavelmente, vêm da atividade lisogênica fetal no fígado e em outros tecidos, como adrenal e testículos (DESOYE, GAUSTER e WADSACK, 2011).

A glicose fetal regula a secreção e as concentrações de insulina fetal, que, em paralelo com a gordura fetal, são mais elevados na diabetes mellitus gestacional (DMG) e inferiores em fetos com CIUR (ECONOMIDES, PROUDLER e NICOLAIDES, 1989; WOLF *et al.*, 2000). A insulina estimula o crescimento de adipócitos fetais e a síntese de triglicérides, a principal fonte de ácidos graxos (AG) para o feto (SZABO e SZABO, 1974).

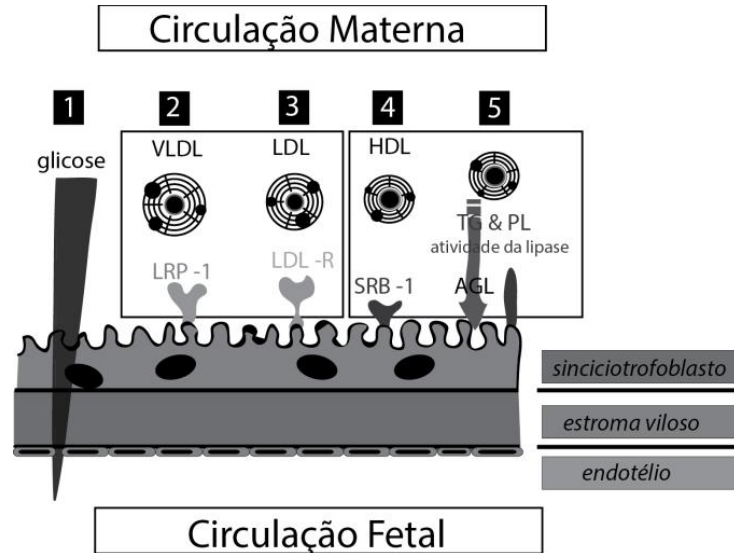
Em relação aos hormônios, as concentrações de hLP crescem rapidamente no primeiro e segundo trimestre e alcançam seu máximo nas últimas quatro semanas de gravidez. O efeito diabetogênico do hLP resulta na mobilização de lipídios na forma de ácidos graxos livres (AGL), os quais servem como fonte de energia, poupando glicose e aminoácidos.

No terceiro trimestre, após a administração de glicose, observa-se hiperinsulinismo pós-prandial à conta dos fatores contra-insulares. O efeito inibitório da insulina na lipólise está significativamente reduzido durante o terceiro trimestre quando comparado ao de outras fases do ciclo gestatório. Assim, a gravidez avançada é caracterizada por mudanças em seu metabolismo, no sentido de preservar a glicose à custa da utilização de lipídios.

Enfim, o fluxo de nutrientes através da placenta é determinado por diversos fatores placentários e extraplacentários (JONES, POWELL e JANSSEN, 2007). A Figura 2 resume o transporte placentário dos principais nutrientes responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento fetais: transporte de glicose através de transportadores de glicose (GLUTs); transporte de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Esses nutrientes se ligam aos seus respectivos receptores: Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionada 1 (LRP-1), Receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL-R) e Receptor Scavenger classe B tipo 1 (SRB1). Também ocorre o transporte de triglicérides (TG) e fosfolipases, que, em contato

com a placenta, são hidrolisados por lipases lipoprotéicas (LLP) em AGL e, dessa forma, atravessam a placenta por difusão simples.

Figura 2 – Transporte placentário de nutrientes (barreira materno-fetal)



Fonte: Grams e Hentschke (2013), adaptado de Desoyse (2011). 1) Glicose – GLUT; 2) VLDL-LRP-1; 3) LDL-LDL-R; 4) HDL-SRB-1; 5) TG e PL. AGL: Ácidos graxos livres. GLUT: Transportadores de Glicose; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; LRP-1: Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; LDL-R: Receptor de lipoproteína de baixa densidade; HDL: Lipoproteína de alta densidade; SRB-1: Receptor Scavenger classe B tipo 1; TG: Triglicerídeos. PL: Fosfolipases.

O entendimento do transporte placentário é fundamental para novas estratégias de intervenções clínicas em condições associadas com alteração do crescimento fetal, como ocorre na PE (JONES, POWELL e JANSSON, 2007). Esses fatores estão intimamente associados com o aumento de morbidades perinatais e possuem impactos na saúde ao longo da vida (JONES, POWELL e JANSSON, 2007). Nesta tese, no Bloco 2, Projeto A, o transporte placentário de lipídios e lipoproteínas será devidamente detalhado.

1.2.5 Mortalidade materna – fatores epidemiológicos

A razão de mortalidade materna é calculada pelo número de óbitos maternos por 100.000 nascidos vivos. No Brasil e no Rio Grande do Sul o número encontrado em 2011 foi de 64,8/100.000 e 48,7/100.000, respectivamente (DATASUS, 2012). Em um levantamento realizado em 2007, as principais causas de mortes maternas registradas no Brasil foram as desordens hipertensivas (23%), sepsis (10%), hemorragia (8%), complicações relacionadas ao aborto (8%) e desordens placentárias (5%) (VICTORIA, 2011).

Em 2013, o número total de morte materna no País foi de 1142 mortes/ano. Aquelas atribuídas a causas obstétricas diretas relacionadas à hipertensão foram 251 mortes/ano no Brasil (22%), 6 mortes/ano no Rio Grande do Sul, 2 em Porto Alegre, sendo umas delas no HSL/PUCRS. A hipertensão foi a principal causa de morte obstétrica direta, seguida das hemorragias, infecções puerperais e abortos (SIM, 2013).

Na cidade de Porto Alegre, as principais causas de morte materna de 1996 a 2004 foram: patologias clínicas que coincidem com o período gravídico-puerperal (17%), SIDA (15%), doença hipertensivada gestação (15%) e infecção puerperal (15%), doenças cardiovasculares (12,5%), aborto (12%) (PORTO ALEGRE, 2006).

No ano 2000, após a Cúpula do Milênio, da Organização das Nações Unidas (ONU), foram estabelecidos oito objetivos de desenvolvimento do milênio pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A quinta meta, “*Improve maternal health*”, visa reduzir a mortalidade materna no mundo em 75% até 2015 (WHO, 2008).

Uma das mudanças mais discutidas no estado de saúde da população mundial nos últimos 30 anos é o aumento na prevalência de obesidade entre as mulheres grávidas, bem como na população em geral. A obesidade está associada ao aumento de risco de quase todas as complicações gestacionais, como hipertensão, diabetes gestacional, recém nascidos grandes para a idade gestacional, e ainda a uma grande incidência de defeitos congênitos (POSTON, *et al.*, 2011). Em associação a isso, há um aumento percentual de nascimentos entre as mulheres com idades mais avançadas. Entre 1993 e 2005, as taxas de hipertensão induzida pela gestação, hipertensão crônica e diabete gestacional foram mais frequentes com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e com o aumento da idade materna (SOCIEDADE BRASILEIRADE CARDIOLOGIA, 2010).

Alguns grupos étnicos, tais como mulheres africanas, americanas e filipinas (CAUGHEY *et al.*, 2005; RAO, CHENG e CAUGHEY, 2006), e aquelas com baixo nível socioeconômico são de maior risco (SILVA *et al.*, 2008). Além disso, PE grave é uma das

principais causas de morbidade materna, e relaciona-se a resultados perinatais adversos, como a prematuridade e o CIUR (DULEY, 2009).

1.3 A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

“A hipertensão arterial sistêmica (HAS) tem sido denominada de ‘A assassina silenciosa’, por ser uma doença crônica com uma longa fase assintomática que, se não detectada e não tratada, silenciosamente danifica o coração, o cérebro e os rins” (GOLDMAN, 2005).

A HAS está relacionada com frequência a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo e às alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares, sendo considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

1.4 A DOENÇA HIPERTENSIVA GESTACIONAL

Em torno do ano de 1867, quando ainda se discutia se as sangrias deveriam ser realizadas em casos de eclâmpsia, ou se deveria ou não induzir o parto dessas pacientes, a DHG começou a ser estudada e publicada em artigos científicos, sendo já uma incógnita para as parteiras e médicos daquela época. Foi nesse período que começou a se pensar na hipóxia placentária como possível desencadeadora de desfechos desfavoráveis para mãe e feto (STEELE, 1867; STEELE, 1872). Desde então, o mundo tem pesquisado a DHG, em especial a PE, buscando uma teoria digna de causa e passível de tratamento. Nos últimos cem anos, segundo pesquisa em base de dados, são mais de 30 mil artigos publicados sobre PE envolvendo uma grande variedade de estudos em relação a essa síndrome gestacional.

Diante de um quadro de proteinúria e hipertensão arterial sistêmica, acima de 20 semanas de gestação, com sinais e sintomas clássicos da síndrome, se faz com certa facilidade o diagnóstico de PE, por exemplo. No entanto, a heterogeneidade da sua origem e da sua apresentação (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000; REDMAN e SARGENT, 2010) muitas vezes trazem surpresa ao obstetra de plantão, que não consegue evitar a alta morbimortalidade do binômio mãe-feto causada por essa síndrome (KHAN *et al.*, 2006). Sabe-se que algumas gestantes já possuem, antes mesmo da gravidez, diagnóstico de hipertensão arterial crônica, que se agrava durante a gestação, outras são

previamente normotensas e passam a apresentar pressão elevada ao longo da gravidez, podendo cursar com proteinúria, consolidando assim os possíveis diagnósticos da DHG.

No entanto, muita controvérsia existe em relação às definições e classificações da DHG, o que pode ser visto no grande número de grupos que estudam essa patologia. Nesta tese, foi usado como base para classificar a DHG o relatório do *High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (NHBPEPWG) (NHBPEPWG, 2000) e as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, de 2010 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010) para as pacientes brasileiras (Bloco 1), e as diretrizes do *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* (ISSHP) para as pacientes inglesas (Bloco 2) (BROWN *et al.*, 2001), os quais classificam a DHG de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1–Classificação da doença hipertensiva gestacional (NHBPEPWG, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; ISSHP, 2011).

Doença Hipertensiva Gestacional	Hipertensão*		Proteinúria**	
	IG < 20	IG ≥ 20	IG < 20	IG ≥ 20
Hipertensão gestacional	Não	sim	não	não
Hipertensão crônica	Sim	sim [†]	não	não
Pré-eclâmpsia	Não	sim	não	sim [‡]
Pré-eclâmpsia sobreposta	Sim	sim [†]	não	sim

Fonte: Hentschke (2013). *PAS≥140 mmHg e/ou PAD ≥ 90 mmHg; **Iniciou ou agravou a proteinúria patológica ≥ 300mg/dia; ou relação P/C ≥ 0,3; ou fita reagente: Proteinúria ≥ +, que melhora ou cessa após 12 semanas do parto; [†]Resolução da hipertensão até 12 semanas do parto; [‡]Hipertensão persistente após 12 semanas do parto. P/C: proteinúria/creatininúria em amostra. PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão arterial diastólica.

1.4.1 Considerações quanto ao diagnóstico da DHG

A suspeita diagnóstica de Síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) também existe quando o aumento da pressão está acompanhado dos seguintes sintomas: cefaleia, borramento visual e escotomas, dor abdominal e, ainda, alterações laboratoriais, como a hemólise, a baixa contagem de plaquetas e a alteração de enzimas hepáticas, configurando a síndrome HELLP. A evolução para eclâmpsia caracteriza-se pela presença de convulsões motoras generalizadas nessas pacientes, não atribuída à doença neurológica coincidente. Existem situações em que a PE pode apresentar-se sem proteinúria ou hipertensão, porém essas situações não foram consideradas no presente trabalho. Acreditamos que a definição de PE em situações de pesquisa seja mais rigorosa do que a definição usada na prática clínica diária sendo uma

recomendação das Diretrizes Australianas e Neozelandesas de Hipertensão na Gestação (LOWE *et al.*, 2009).

1.5 PRÉ-ECLÂMPسيا

1.5.1 Pré-eclâmpسيا: epidemiologia

Pré-eclâmpسيا/eclâmpسيا é uma das três maiores causas de morbidade e mortalidade materna no mundo, afetando de 2% a 8 % de todas as gestações (WHO, 1988; DULEY, 2009). No HSL/PUCRS foi constatada uma ocorrência de 4,6% em gestantes de baixo risco do ambulatório de obstetrícia (GALÃO, 2004). Mesmo que nos últimos 50 anos tenha havido uma diminuição nas taxas de eclâmpسيا, morbidade e mortalidade materna nos países desenvolvidos, as estatísticas mostram que 98% das mortes ocorrem em países em desenvolvimento e permanecem ainda muito altas (WHO, 2010; GHULMIYYAH e SIBAI, 2012). Sabe-se que a maioria das mortes e complicações maternas é devido à falta de cuidados no pré-natal, falta de acessos hospitalares, escassez de recursos, diagnóstico e manejo inapropriados dos pacientes com PE/eclâmpسيا, o que é visto nos países em desenvolvimento.

Sabe-se ainda que mais de 10% das mulheres irão desenvolver PE na sua primeira gestação. Embora a grande maioria dessas pacientes tenha desfechos favoráveis, essa condição pode levar ao aumento de complicações sistêmicas graves, como hemorragia cerebral, disfunção hepática e renal aguda, e ainda edema agudo de pulmão, assim como descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada (CIVD), hemólise, hemorragia cerebral, CIUR e morte fetal (GAROVIC, 2000). O desenvolvimento de estratégias para prevenir, acompanhar e tratar pacientes com essa desordem tem sido um desafio devido ao entendimento incompleto da patogênese básica da doença (GHULMIUUAH e SIBAI, 2012; SMITH, 2012; WEBER *et al.*, 2013).

1.5.2 Pré-eclâmpسيا: fatores de risco

Ao longo dos últimos anos, muitos estudos têm tentado identificar um marcador de risco para PE. No entanto, mesmo na falta de um bom candidato, é possível aconselhar as pacientes em relação ao seu potencial risco de desenvolver PE através de sua história clínica (REDMAN, 2011; MISTRY, 2013). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da PE podem ser vistos no Quadro 2.

Quadro 2– Fatores de risco para síndrome de pré-eclâmpsia

Fatores de Risco	Comentários
Evidência Forte	
Primigestação	RR: 2,4 (2,1 – 2,7)
Diabete mellitus	RR: 2 – 3 e maior se DM descompensado
Gestação gemelar	RR: 3 (2 – 4,2)
Irmã com PE	RR: 3,3 (1,5 – 7,5)
Irmã, mãe ou avó com eclampsia	RR: Respectivamente 37, 26 e 16% de PE
HAS crônica	25% de desenvolver PE sobreposta
PE sobreposta em gestação prévia	70% de recorrência
Hidropisia fetal (não imune)	RR: 10
Gestação molar	RR: 10
Nova paternidade	Risco semelhante ao da primeira gestação
Evidência média ou fraca	
IMC \geq 25,8	RR: 2,3 – 2,7
Idade materna > 40 anos	RR: 3-4
Uso de método anticoncepcional de barreira	Aumento do risco
Maior duração da atividade sexual	Diminuição do risco
Aborto prévio	Diminuição do risco
Ganho excessivo de peso	Aumento de risco
Inseminação artificial	Aumento de risco
“Homem de risco” (parceira anterior teve PE)	RR: 1,8 (1,2 – 2,6)

Fonte: Martins-Costa (2011, p. 525) (SIBAI, DEKKER e KUPFERMINC, 2005; JUNIOR, 2009; FREITAS, 2011). RR: Risco relativo; IMC: Índice de massa corporal; evidência forte: vários estudos mostraram isso; evidência média ou fraca: alguns estudos mostraram associação.

1.5.3 Pré-eclâmpsia: critérios de gravidade

Além dos fatores de risco para PE, existem alguns critérios de gravidade da síndrome que podem culminar em diferentes condutas clínicas. As seguintes características aumentam a certeza de diagnóstico da SPE e indicam um acompanhamento otimizado da paciente (Quadro 3) (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000; FREITAS, 2011).

Quadro 3–Critérios de gravidade para a pré-eclâmpsia

Parâmetro	Critério
Pressão Arterial	Sistólica \geq 160 e/ou diastólica \geq 110 mmHg em duas medidas após repouso de 6 horas
Proteinúria¹	2g/24hrs (2+ ou 3+ na fita)
Eclâmpsia	Convulsões generalizadas sem doença neurológica presente
Cerebral	Acidente cérebro-vascular (perda aguda da função cerebral, alteração do estado mental, coma); perda parcial ou total da visão
SNC	Visão turva, diplopia, escotomas cintilantes
Rins	Oligúria $<$ 500mL/24hrs; creatinina sérica $<$ 1,2 mg/dL (a não ser que se saiba ser previamente elevada)
Plaquetas	Contagem de plaquetas $<$ 100.000 cels/mm ³ – plaquetopenia
Coagulopatia	TP $>$ 1,4s + plaquetopenia ($<$ 100.00 cels/mm ³) + diminuição do fibrinogênio ($<$ 300 mg/dL)
Fígado	Aumento de 2X as enzimas hepáticas (TGO e/ou TGP). Cápsula hepática: Dor persistente em região epigástrica, ou no quadrante abdominal superior direito
Pulmão	Edema agudo
Fetal	CIUR (peso fetal $<$ percentil 5 ou $<$ percentil 10 + comprometimento fetal (oligodrâmnio, Doppler umbilical alterado)
Momento do diagnóstico	Pré-eclâmpsia diagnosticada com IG $<$ 32 semanas

Fonte: Martins-Costa (2011, p.526) (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM 2010; DULEY, MEHER e ABALOS, 2006; MILLER, 2007; NORWITZ e FUNAI, 2008; FREITAS, 2011). SNC: Sistema nervoso central. TP: Tempo de protrombina prolongado.

¹ Durante o último Congresso da *International Society of Hypertension in Pregnancy* (ISSHP), em Tromsø/Noruega, 2013, foi discutida a exclusão da proteinúria como critério de gravidade.

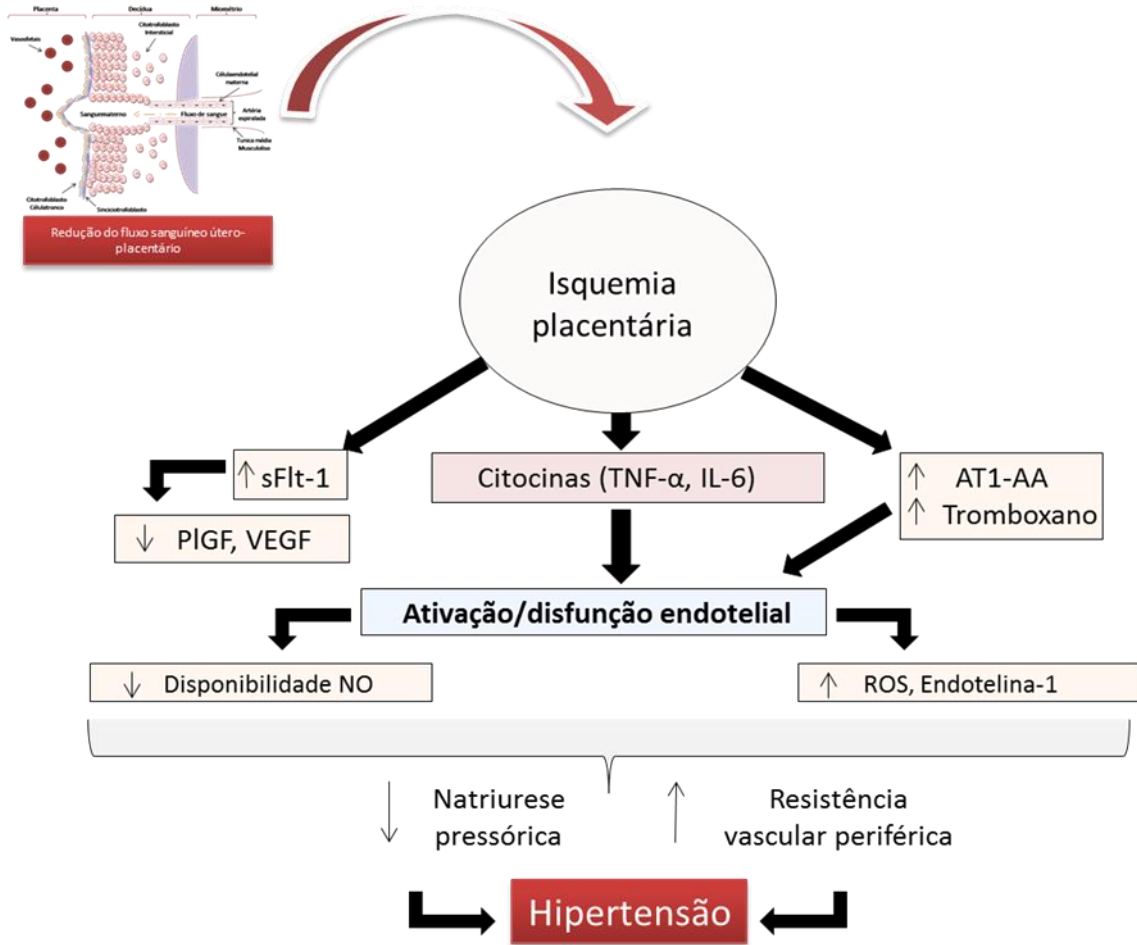
² Optamos por utilizar o termo genérico ‘citocinas’ como forma de representar o grupo de moléculas estudadas

1.5.4 Pré-eclâmpsia: fisiopatologia

Assim como existem controvérsias quanto à classificação, a fisiopatologia da PE permanece pouco entendida (BROUGHTON PIPKIN, 2012). Evidências demonstram que a placenta exerce uma participação fundamental no desenvolvimento da PE, visto que a dequitação é a única intervenção definitiva para o alívio dos sintomas e remissão dos mesmos. Essa sugestão é reforçada por um relato de caso de gestação abdominal acompanhada de PE em que, na ocasião do parto, não foi retirado completamente o tecido placentário, e o quadro de PE persistiu até o momento em que toda a placenta foi removida (SHEMBREY e NOBLE, 1995). Além disso, observa-se que não há necessidade da presença de feto, uma vez que está descrito na literatura a ocorrência de PE em casos de mola hidatiforme (ACOSTA-SISON, 1957), na qual virtualmente não existe tecido fetal (essa seria a única forma de PE antes de vinte semanas de idade gestacional).

Como visto no início deste capítulo, em uma gestação normal, ocorre uma adaptação circulatória materno-fetal para que se produza uma circulação placentária de baixa resistência, resultando em um sistema circulatório de alto fluxo que na PE parece estar comprometido. Assim, as relações entre a circulação materna e fetal permanecem estreitas e muito pouco desenvolvidas. Conseqüentemente, o fornecimento de sangue para a placenta é restrito, levando à disfunção na perfusão uteroplacentária, hipóxia e estresse oxidativo placentário, resultando em uma resposta inflamatória sistêmica com dano endotelial e desequilíbrio entre fatores vasoconstritores *vs.* vasodilatadores, levando à HAS (REDMAN e SARGENT, 2010) (Figura 3).

Figura 3 – Fisiopatologia da pré-eclâmpsia: isquemia placentária edisfunção endotelial



Fonte: Hentschke (2014), adaptado de Gilbert (2008). Vias através das quais a redução da pressão de perfusão uterina e a isquemia placentária podem levar à disfunção endotelial e cardiovascular durante a gravidez. A isquemia placentária resulta no aumento da síntese de Fms-like tirosina quinase solúvel 1 (sFlt-1), Fator de necrose tumoral (TNF)- α e Interleucina (IL)-6, autoanticorpos do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁-AA), e tromboxano. O aumento desses fatores parece resultar em disfunção endotelial pela diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da endotelina-1, que por sua vez resulta em disfunção renal, aumento da resistência vascular periférica e, finalmente, em hipertensão. PIGF: Fator de crescimento placentário. VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

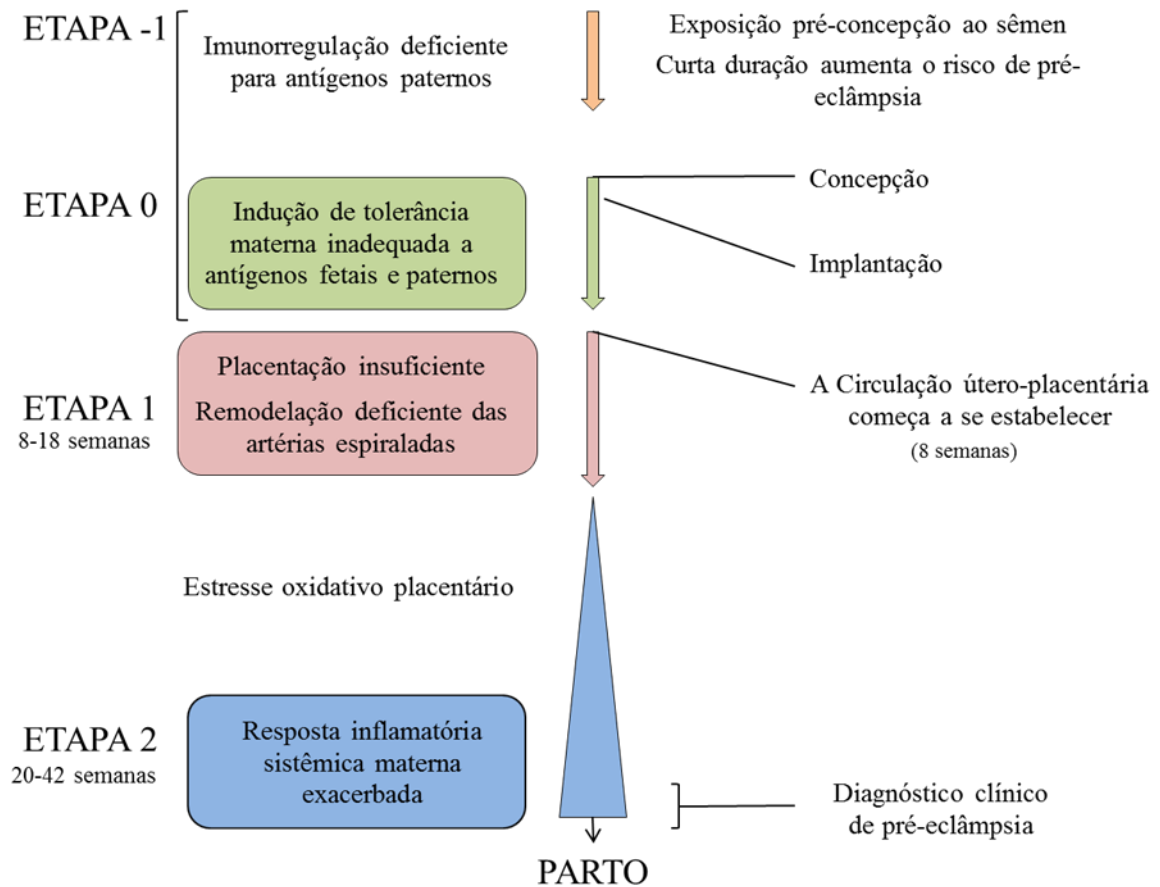
1.5.5 Pré-eclâmpsia: o endotélio vascular

Há aproximadamente 24 anos, Roberts *et al.* (ROBERTS *et al.*, 1989) formalmente propuseram que a disfunção celular endotelial materna seria o evento-chave da PE, resultando nos diversos efeitos clínicos da mesma. Desde então, evidências têm mostrado o grande papel do endotélio nessa síndrome (ROBERTS, 1998). Entretanto, as alterações ultraestruturais do endotélio são vistas não apenas nos vasos da placenta, mas também em outros vasos sistêmicos, como nos capilares glomerulares. Tais alterações provocam níveis sanguíneos alterados de substâncias de origem endotelial, como aumento de fatores de coagulação e de endotelina (um potente peptídeo vasoconstritor) e diminuição de mediadores vasoativos, como a prostaciclina e o óxido nítrico (GILNERT *et al.*, 2008; Freitas 2011) (Figura 3). A prostaciclina é responsável por uma cascata de eventos: produção plaquetária de tromboxano TxA_2 e de seus precursores endoperóxidos, prostaglandina G2 e prostaglandina H2, de potentes propriedades vasoconstritoras e agregadoras plaquetárias. Como resultado tem-se a perda de refratariedade vascular à angiotensina II, vasoespasmo e diminuição do volume plasmático intravascular. Assim, o aumento da pressão arterial sistêmica materna seria uma tentativa de manter o fluxo sanguíneo minimamente eficaz em um sistema vascular de alta resistência.

1.5.6 Pré-eclâmpsia: o modelo de dois estágios

Dr. Christopher Redman, em 2005 (REDMAN e SARGENT, 2005), propôs pela primeira vez o modelo de dois estágios da PE, hoje amplamente aceito (Figura 4). O primeiro estágio, má placentação, ocorre na primeira metade da gravidez, quando não há sinais clínicos da doença. Entretanto, nesse momento a análise com dopplervelocimetria de ondas nas artérias uterinas é capaz de detectar alterações que refletem nas artérias espiraladas a jusante e identificam um grupo de gestantes com alto risco para desenvolver PE. O segundo estágio, a doença clínica, surge a partir de fatores desencadeados pelo estresse oxidativo placentário.

Figura 4–O modelo de dois estágios da pré-eclâmpsia



Fonte: Hentschke (2014), adaptado de Redman e Sargent (2010). Estágios do desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Etapas 1 e 2 de pré-eclâmpsia são atualmente aceitos. Estágios anteriores (-1 e 0) são hipotéticos. Estágio -1 compreende a tolerância materna pré-conceptual a antígenos paternos expressos no sêmen ou no esperma. Estágio 0 compreende o reconhecimento precoce de antígenos paternos expressos em trofoblasto imediatamente após a implantação, por células do sistema imunológico decíduais uterinas, no momento em que a circulação uteroplacentária 'se abre' para dentro do espaço intervilositário. Propõe-se que o reconhecimento deficiente leve à redução do crescimento do trofoblasto e da placenta.

1.5.7 Pré-eclâmpsia: descobertas recentes e possíveis biomarcadores

Estudos recentes têm apontado diferentes possíveis biomarcadores para a PE, todos com objetivo de validar um teste diagnóstico com valor preditivo positivo para PE, ou que consiga diagnosticar a PE precocemente, a fim de evitar desfechos desfavoráveis para a mãe e o feto (MARY *et al.*, 2012; WRIGHT *et al.*, 2012). Muitos estudos falam a respeito de fatores angiogênicos, tais como Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Fator de Crescimento Placentário (PIGF), como marcadores de PE em diferentes estágios da gravidez (GHOSH *et al.*, 2012; CHAPPELL *et al.*, 2013; GHOSH *et al.*, 2013; MAYNARD *et al.*, 2013). Ainda, outro estudo mostrou o potencial de DNA-célula livre e DNA-célula fetal livre em plasma materno como um preditor de risco precoce para mulheres desenvolverem PE (PAPANTONIOU *et al.*, 2013). Há aqueles que estão analisando podócitos urinários em gestantes com PE (KONIECZNY *et al.*, 2013), o MicroRNA-376c como mediador ou biomarcador (BAKER e DELLES, 2013), o Pentraxin 3 (PTX3) comparando com PE e CIUR (COZZI *et al.*, 2012), e, ainda, há um grupo que analisou 14 potenciais diferentes biomarcadores de PE (LAPAIRE *et al.*, 2012). No entanto, não há apenas estudos laboratoriais, mas também o uso da dilatação mediada por fluxo (DMF), que mostrou ser um marcador de prognóstico de gravidade de PE (VIEIRA *et al.*, 2013).

No Quadro 4 estão apresentados alguns dos biomarcadores mais estudados nos últimos anos. Nenhum deles foi definitivamente aceito para tal fim na PE.

Quadro 4–Biomarcadores da pré-eclâmpsia (PE)

Biomarcador	Concentração plasmática			Outras patologias relacionadas
	1º trimestre	2º trimestre	Manifestação PE	
sFlt-1	-	↑	↑	-
sEng	-	↑	↑	HELLP; PIG
PIGF	↓	↓	↓	PIG; CIUR
PP-13	↓	↑	↑	CIUR; parto pré-termo
DNA-célula fetal	↑	↑	↑	CIUR; polidrâmnio; Trissomia do 21
PTX3	↑	↑	↑	CIUR
PAPPA-2	↑	↑	↑	Peso fetal
Visfatina	-	↕	↕	DM2; obesidade; CIUR

Fonte: Martins-Costa (2011, p. 531) (SMETS *et al.*, 2006; DEVECI *et al.*, 2009; GRILL *et al.*, 2009; FREITAS, 2011; KUC *et al.*, 2011). sFlit-1: Fms-like tirosina quinase solúvel 1; sEng: Endoglina solúvel; PIGF: Fator de crescimento placentário; PP-13: Proteína Placentária 13; PTX3: Pentraxin 3; PAPPA-2: Pappalysin-2. HELLP:

Hemolytic anemia; Elevated Liver enzymes; Low Platelet count; PIG: Pequeno para idade gestacional; DM2: Diabete mellitus tipo 2.

Em 2011 foi publicada uma revisão sistemática em que se analisaram marcadores séricos de primeiro trimestre para PE e ainda foi comparada a dopplervelocimetria de artérias uterinas. Nesse estudo, foram analisados os sete biomarcadores mais estudados até aquele momento (a desintegrina e metaloproteínase Domínio 12 [ADAM12], subunidade Livre β da gonadotrofina coriônica humana [β -hCG], Inibina A, Activina A, Proteína placentária 13 [PP-13], PIGF, e Papalisina A [PAPP-A]) e Doppler de artérias uterina. Baixos níveis de PP-13, PIGF, PAPP-A e altos níveis de Inibina-A foram encontrados como significativamente associados com o desenvolvimento de PE no final da gestação. Quando os biomarcadores foram dosados em conjunto, a taxa de detecção variou de 38% a 100%, mostrando que múltiplos marcadores em associação poderiam prever a PE (KUC *et al.*, 2011). Levine e Karumanchi (LEVINE *et al.*, 2004) (SIGNORE *et al.*, 2006) descreveram o papel do FMs-like torosina quinase solúvel 1 (sFlt-1), presente em níveis muito mais elevados no sangue de mulheres com PE do que nas mulheres que não apresentaram a doença. Foi teorizado que o sFlt-1 agiu como uma “isca”, capturando PIGF e VEGF de modo que não pudessem se ligar aos receptores Flt-1 nas paredes dos vasos sanguíneos. Privados de PIGF e VEGF, os vasos sanguíneos se deterioraram. De acordo com essa teoria, a deterioração de vasos sanguíneos foi a base para o aumento da pressão arterial e dos outros sintomas da PE. Os pesquisadores também mostraram que os níveis de sFlt-1 começaram a subir cerca de cinco semanas antes de as mulheres desenvolverem PE. Ainda, mostrou-se que os níveis de PIGF na urina de mulheres que desenvolveram PE começaram a cair em torno da 25ª semana de gravidez. Dr. Karumanchi e pesquisadores (VENKATESHA S. *et al.*, 2006) mostraram ainda que uma segunda substância, Endoglina solúvel (sEng), também estava presente em placentas de mulheres com PE. Tal como aconteceu com o Flt-1 e sFlt-1, as formas fixas e livres da molécula foram encontradas em vasos sanguíneos. O receptor Eng era um ponto de ancoragem para uma molécula conhecida como fator transformador de crescimento beta (TGF β), também necessário para manter os vasos sanguíneos saudáveis. Novamente, a circulação livre sEng agiu como um chamariz, desviando TGF β para longe dos vasos sanguíneos. Privados de TGF β , os vasos sanguíneos tornam-se menos elásticos. Por fim, tanto sEng quanto a relação sFlt1/PIGF alteradas parecem contribuir para o desenvolvimento da PE. Doenças graves geralmente ocorrem em mulheres com níveis elevados de ambas as medidas, e não apenas uma delas, segundo Dr. Levine e colaboradores. Assim, a produção placentária de sFlt-1 e sEng parecem ser marcadores de PE. Esses fatores antiangiogênicos placentários

são liberados na circulação materna; suas ações alteram o endotélio materno e resultam em hipertensão, proteinúria e outras manifestações sistêmicas da PE (DULEY *et al.*, 2006).

Estudos mostraram ainda que o aumento do sFlt-1 e sEng estão diretamente correlacionados a resistência da artéria uterina, especialmente nas pacientes com pré-eclâmpsia precoce (TOBINAGA *et al.*, 2014).

Ainda em relação aos novos biomarcadores, tem-se o estudo do Dr. Xia e colaboradores (XIA e KELLEMS, 2011; XIA e KELLEMS, 2013), que investigaram anticorpos no sangue de mulheres com PE. Os anticorpos são moléculas em forma de Y produzidas pelo sistema imunológico. Os anticorpos buscam manter-se na superfície de organismos que causam doenças, marcando-os para destruição pelo sistema imunológico. A teoria de Xia sustenta que, por razões que não são bem compreendidas, a mãe produz anticorpos para o receptor de angiotensina II. Os anticorpos atravessam a placenta e estimulam suas células a produzir sFlt-1, que, juntamente com outros compostos da placenta, entram na circulação materna, impedindo o desenvolvimento placentário e, em seguida, ocasionando o aumento da pressão sanguínea e de outros sintomas da doença. Em estudos de laboratório, os pesquisadores descobriram que poderiam bloquear o anticorpo e impedi-lo de chegar ao receptor da angiotensina II. Dessa forma, acreditam que pode ser possível tratar a PE.

1.5.8 Pré-eclâmpsia: condutas

Ao longo dos últimos cem anos, o número de artigos publicados em relação à PE cresceu exponencialmente. No ano 2000, 658 artigos foram publicados; 12 anos após, esse número passou para 1.399. O curioso é que, desde aquele artigo publicado em 1914 até hoje, 2014, o mesmo tratamento para a PE é sugerido: o esvaziamento do útero, a retirada da placenta (BONNEY, 1914; PUBMED, 2013).

Muitas controvérsias existem em relação à interrupção da gravidez. Um balanço sempre precisa ser feito entre os efeitos deletérios para o feto prematuro e os desfechos desfavoráveis para a mãe ao manter uma gestação *toxêmica*. Algumas diretrizes apoiam a ideia da idade gestacional de 34 semanas como ponto de corte do bem-estar de ambos, mãe-filho, considerando a máxima exigência do corpo da mãe e a mínima permanência do feto. Quando se opta por manter a gestação, e se tenta chegar o mais próximo do termo, lança-se mão de medicações anti-hipertensivas para hipertensão grave, assim como agentes anticonvulsivantes na tentativa de evitar/tratar convulsões (GEORGE e GRANGER, 2011). Mais detalhes sobre o tratamento da hipertensão na gestação estão descrito no artigo de revisão visto no Apêndice I, Artigo 1, desta tese.

Após o parto, as pacientes podem permanecer com a pressão aumentada e com níveis de proteína urinários ainda elevados. Dessa maneira, é de extrema importância o acompanhamento dessas pacientes no pós-parto para estabilizar a pressão, orientar sobre riscos futuros gestacionais e riscos de doenças cardiovasculares ao longo da vida. A avaliação após o parto também permite definir qual o diagnóstico de distúrbio hipertensivo gestacional, e especialmente diferenciar entre PE e PES (WEBER *et al.*, 2014).

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

Estudar aspectos dos mecanismos fisiopatológicos e clínicos da pré-eclâmpsia.

1.6.2 Objetivos específicos

Bloco 1: Avaliar em tecido placentário, no plasma materno e do cordão umbilical moléculas mediadoras em pacientes com SPE e em gestantes normais (GN). Associar os achados com aspectos clínicos maternos e fetais.

Bloco 2A: Avaliar níveis séricos de lipoproteínas em sangue materno e do cordão umbilical e a expressão de receptores e mediadores de lipoproteínas, em tecido placentário de pacientes com SPE e GN.

Bloco 2B: Avaliar a expressão gênica e protéica de proteínas das cavéolas e as óxido nítrico sintase (NOS) induzível – iNOS e endotelial – eNOS em tecido placentário de pacientes com SPE e GN.

Desenvolvimento

Bloco 1

Moléculas mediadoras e a fisiopatologia da pré-eclâmpsia

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 BLOCO 1: MOLÉCULAS MEDIADORAS E A FISIOPATOLOGIA DA PRÉ-ECLÂMPSIA

2.1.1 Introdução

Como visto anteriormente, a PE parece ter início já na placentação, quando existe um comprometimento na remodelação vascular das artérias espiraladas uterinas levando a uma redução da perfusão e a uma alta resistência uteroplacentária, o que gera um ambiente de hipóxia para o tecido placentário e fetal. A condição de hipóxia da placenta resulta na liberação de fatores circulantes, entre os quais se destacam citocinas, que, ao serem expostas à circulação materna, são capazes de alterar a resposta vascular, levando a uma disfunção generalizada do endotélio vascular materno (GILBERT *et al.*, 2008; LAMARCA, GILBERT e GRANGER, 2008; LAMARCA, 2010; LARESGOITO-SERVITJE, 2013).

Estudos têm mostrado que, em pacientes que irão desenvolver PE, a reação inflamatória do tipo 1 é mais proeminente em relação à do tipo 2 (DARMOCHWAL-KOLARZ *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 1999), ao contrário do que ocorre na gestação normal, em que há uma inibição da resposta imune-citotóxica Th1, a qual pode ser prejudicial para o feto (SZARKA *et al.*, 2010). Associado a mudanças no balanço Th1/Th2, várias outras variáveis inflamatórias podem estar alteradas em gestantes normais e com PE (SZARCA *et al.*, 2010), como é o caso do aumento de níveis circulantes de citocinas inflamatórias como Interleucina (IL)-6 e Fator de necrose tumoral (TNF) α (VINCE *et al.*, 1995; JONSSON *et al.*, 2006) e quimiocinas como proteína quimiotática de monócitos (MCP)-1, resultando em um ambiente sistêmico pró-inflamatório, o qual parece fazer parte da origem das alterações clínicas de pacientes com PE (FREITAS, 2011). Por outro lado, concentrações de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, parecem estar diminuídas nessas mulheres (MADAZLI *et al.*, 2003; GIRARDI *et al.*, 2006; LAMARCA *et al.*, 2007; REDMAN e SARGENT, 2010). Dessa forma, acredita-se que citocinas inflamatórias seriam importantes mediadores entre a isquemia e a disfunção placentária (LAU *et al.*, 2013).

Sistemas de regulação da pressão arterial sistêmica, como o sistema renina-angiotensina (SRA) e o sistema nervoso simpático, parecem interagir com as citocinas pró-inflamatórias. Em conjunto, afetam fatores angiogênicos derivados do endotélio que regulam

a função endotelial e, ainda, induzem a produção de proteínas solúveis com ações antiangiogênicas, o que pode contribuir para a insuficiência placentária vista na SPE. Nessas condições, sabe-se que o TNF α ativa o sistema de endotelina placentário, renal e vascular, e que a IL-6 estimula o SRA (LAMARCA *et al.*, 2007), sendo que a IL-6 pode, ainda, inibir IL-1 e TNF α (MADAZLI *et al.*, 2003). Dessa forma, as citocinas inflamatórias parecem ter um papel importante no aumento da pressão arterial sistêmica, comprometendo o desenvolvimento placentário através da ativação de múltiplos fatores neuro-humorais, antiangiogênicos e endoteliais (LAMARCA *et al.*, 2007). Entretanto, ainda é incerto o papel das citocinas inflamatórias em mediar alterações cardiovasculares e renais durante a PE (LAMARCA *et al.*, 2007).

Muitos estudos têm tentado analisar o papel das citocinas na circulação materna e suas consequências em decorrência da hipoxemia placentária (JONSSON *et al.*, 2006; RUSTERHOLZ, HAHN e HOLZGREVE, 2007). No entanto, sabe-se que essas alterações vasculares maternas têm uma consequência direta no desenvolvimento e crescimento placentário e fetal, e por isso a importância de se avaliar a resposta hipoxêmica não somente materna, mas também placentária e fetal. Na presente revisão da literatura, não foi encontrado nenhum estudo que tenha avaliado a resposta imune-inflamatória concomitantemente no plasma materno, plasma fetal e na placenta humana, em mais de uma citocina. Assim, tem-se como hipótese que citocinas inflamatórias estarão aumentadas no plasma de gestantes com SPE, assim como na placenta. No entanto, acreditamos que no feto os níveis de citocinas inflamatórias poderão estar inalterados ou, até mesmo, reduzidos.

2.1.2 Objetivos

2.1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi analisar e comparar níveis de citocinas², quimiocinas, outros marcadores inflamatórios e vasculares selecionados previamente, sendo eles: molécula específica de célula endotelial 1 (Endocan-1/ESM-1), PIGF, LIGHT – membro da superfamília TNF, TNF α , IL-6, MCP-1, Fator de crescimento neural (NGF) e Leptina³, no plasma materno, plasma fetal e no tecido placentário de mulheres com SPE e GN, no terceiro trimestre da gestação.

2.1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar os resultados usando estratificações para o grupo SPE:

Excluir pré-eclâmpsia sobreposta (PES) e HELLP e analisar somente PE sem hipertensão crônica prévia (PE pura) vs. GN.

Subdividir o grupo PE em PE pura e PES, e comparar com o GN.

Subdividir o grupo de PE em relação à idade gestacional (IG), sendo o primeiro ponto de corte com 34 semanas (PE precoce vs. PE tardia), e o segundo com 37 semanas (PE prematura vs. PE a termo).

Subdividir o grupo de PE em relação aos níveis de proteinúria/creatinunúria em amostra (P/C), sendo o primeiro ponto de corte com 0,5 (proteinúria entre 0,3 – 0,5 vs. proteinúria \geq 0,5), e o segundo ponto de corte com 2,0 (proteinúria entre 0,3 – 2,0 vs. proteinúria \geq 2,0).

Subdividir o grupo de SPE em relação à pressão arterial sistólica (PAS), com ponto de corte em 160 mmHg (SPE \geq 160, SPE < 160).

Correlacionar os níveis de citocinas:

Com dados maternos, fetais e dados do parto.

Entre o plasma materno, plasma fetal e a placenta.

Entre uma citocina e a outra.

² Optamos por utilizar o termo genérico ‘citocinas’ como forma de representar o grupo de moléculas estudadas neste bloco.

³ A análise da molécula Leptina fez parte da dissertação de mestrado da Dra. Adriana Comparsi, não sendo o foco deste estudo, apenas quando relacionada às demais citocinas. O artigo submetido para publicação referente ao estudo da Leptina pode ser visto no Apêndice J, artigo 3, desta tese.

2.1.3 Metodologia

2.1.3.1 Delineamento do estudo

Avaliação observacional, longitudinal, caso-controle.

2.1.3.2 Seleção de pacientes

As mulheres incluídas no estudo foram gestantes com 20 ou mais semanas de gravidez, de feto único, com ou sem diagnóstico de SPE, que estiveram hospitalizadas no HSL/PUCRS, Porto Alegre, Brasil, de 2010 a 2013, em acompanhamento com corpo assistencial obstétrico – responsável pela solicitação dos exames de rotina, realizados pelo Laboratório de Patologia Clínica do HSL.

Foi realizada uma seleção aleatória de pacientes gestantes controles e com diagnóstico de SPE, que satisfizessem os critérios de inclusão, de acordo com a chegada ao ambulatório de obstetrícia e/ou centro obstétrico do HSL/PUCRS. Pacientes com síndrome HELLP total ou parcial também foram incluídas, totalizando cinco pacientes. Todas as gestantes foram devidamente informadas sobre a pesquisa e consentiram em participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). Para coleta de dados, foi utilizado protocolo padrão de coletas do grupo de pesquisa em Nefrologia, que consta de dados de anamnese, exame físico, exames complementares, dados do parto e do recém-nascido (RN) (Apêndice B).

A pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica do HSL/PUCRS (Anexo A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da PUCRS, Ofício nº 0527/07-CEP (Anexo B).

2.1.3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo gestantes com diagnóstico prévio de nefropatia, hepatopatia, tireoidopatias, infecções ativas (como infecção do trato urinário), gestações múltipla e/ou falta de informações no banco de dados. Gestantes normotensas com $\geq 1+$ de proteinúria no exame qualitativo de urina, também foram excluídas.

Procurou-se excluir gestantes com bolsa rota; no entanto, constam em nossa amostra 20 pacientes (17%) com bolsa rota, sendo quatro delas (3,4%) com 18 horas ou mais (duas

delas com 18 horas, uma com 20 horas e outra com 25 horas de bolsa rota). Na literatura, a incidência de bolsa rota variava de 3-18% nas grávidas no momento do parto (MERCER *et al.*, 2006). Em relação à via de parto, não excluimos a via alta, incluindo tanto cesáreas eletivas quanto de urgência.

2.1.3.4 Cálculo amostral

Assumindo alfa igual a 0,05, poder estatístico 90%, para detectar uma diferença de médias com magnitude de 0,65 unidades de desvio padrão, foi calculado que seriam necessárias 51 pacientes para cada grupo, totalizando 102 mulheres.

2.1.3.5 Definição operacional da pré-eclâmpsia

A definição operacional da PE foi baseada nos critérios sugeridos pelo NHBPEPWG (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000) e pela VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, de 2010 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010), sendo brevemente descrita abaixo:

Pré-Eclâmpsia (PE): Nova hipertensão e nova proteinúria após a 20^a semana de gestação, com normalização de ambas até 12 semanas após o parto. O termo *PE pura* é empregado em alguns momentos desta tese para deixar muito clara a diferenciação entre pré-eclâmpsia, pré-eclâmpsia sobreposta e síndrome de pré-eclâmpsia.

Pré-Eclâmpsia Sobreposta (PES): Desenvolvimento da PE em paciente com hipertensão arterial crônica prévia e/ou que permanecem com HAS após 12 semanas do parto⁴.

Síndrome de Pré-Eclâmpsia (SPE): Este termo foi empregado para as pacientes com PE quando o diagnóstico final (PE ou PES) ainda não foi definido. Neste estudo, o termo SPE também foi utilizado como forma de caracterizar o grupo de PE, sem estratificações.

Pré-eclâmpsia precoce: A SPE precoce foi definida quando o surgimento da patologia ocorreu antes das 34 semanas de gestação (entre 20 e 33 semanas completas).

⁴ O diagnóstico de pré-eclâmpsia sobreposta foi realizado a partir do acompanhamento das pacientes no ambulatório de hipertensão da gestação desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa; para aquelas que não seguiram em acompanhamento, foi realizada uma revisão em prontuário médico hospitalar, ou ainda um contato telefônico para agendamento de consulta.

2.1.3.6 Coleta das amostras

A coleta de sangue materno de pacientes com SPE foi realizada após o diagnóstico e a internação hospitalar; já nas pacientes gestantes controles a coleta foi feita quando acolhidas na sala de admissão e no pré-parto do centro obstétrico da HSL/PUCRS. O tempo entre a coleta do sangue materno e o parto sofreu uma variação média de um dia, sendo que 89 amostras foram coletadas no mesmo dia do parto. As variações maiores ocorreram em quatro pacientes com diagnóstico de PES, que permaneceram internadas após a coleta por 12, 15, 16 e 28 dias, para a maturação fetal.

A medida da pressão arterial foi realizada conforme as recomendações específicas para gestantes padronizadas no centro obstétrico e alojamento conjunto do HSL/PUCRS, que recomenda a medida sentada e em decúbito lateral esquerdo. Os dados coletados de exame físico são relativos ao dia da admissão no pré-parto da paciente no HSL/PUCRS.

O total de pacientes foi de 117 (50 com SPE e 67 GN), 101 plasmas maternos (45 de SPE e 56 GN), 101 plasmas fetais (44 de SPE e 57 GN) e 103 placentas (48 de SPE e 55 GN), sendo que 74,35% da amostra (87 pacientes) foi composta por plasma materno, plasma fetal e placenta oriundos das mesmas pacientes.

Coleta de plasma materno

Foram coletados em média 4 mL de sangue materno em tubo Vacutainer® contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Figura 5A) de cada paciente, antes do parto. As amostras foram processadas no Laboratório de Nefrologia/HSL/PUCRS, sendo centrifugadas a 2.000g por 10 minutos, em temperatura ambiente. O plasma foi estocado em microtubo de centrifugação de 0,6 mL inicialmente a -20°C, e após a -80°C, até o momento da dosagem.

Coleta de plasma fetal

Logo após o parto, foi puncionado, em média, 4 mL de sangue da veia do cordão umbilical (Figura 5B), sendo centrifugado a 2.000g por 10 minutos e estocado em microtubo de centrifugação de 0,6 mL nas mesmas condições do plasma materno.

Coleta de placenta

Imediatamente após o parto, foram dissecados da face materna da placenta seis cubos de aproximadamente 1 cm³ do centro de um cotilédone localizado na metade da distância entre o cordão umbilical e a extremidade do órgão (Figura 5C). Esse material foi armazenado em microtubo de centrifugação de 1,5 mL nas mesmas condições dos plasmas materno e fetais.

Figura 5 – Ilustrações de coleta de amostras: plasma materno, plasma fetal e placenta



Fonte: Hentschke (2014). A) Coleta de sangue materno, B) Coleta de sangue fetal, C) Coleta de tecido placentário.

2.1.3.7 Exames laboratoriais

Os exames laboratoriais foram realizados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Laboratório de Patologia Clínica do HSL/PUCRS: hemograma e plaquetas por citometria de fluxo (XE – 2100D, Sysmex corporation, Kobe, Japão); análise bioquímica, pela técnica de química seca (Sistema integrado Vitros 5600, New York, EUA), com exceção da creatinina sérica, que foi pelo método colorimétrico (Sistema químico Vitros 5.1 Fusion, NY, EUA); tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (KTTP), e fibrinogênio, pelo método coagulométrico (ACL TOP 500, Chicago, IL, USA). Exames realizados durante o pré-natal das gestantes controles, como EQU, urocultura, marcadores positivos para HIV, hepatite B e sífilis, foram utilizados como base para excluir possíveis patologias clínicas não associadas à gestação que poderiam comprometer o estudo.

Exames para diagnóstico de SPE e exames de gravidade – proteinúria de 24h, proteinúria e creatininúria de amostra, TP, KTTP, ácido úrico, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética (TGO), transaminase glutâmico pirúvica (TGP), bilirrubinas, fibrinogênio, lactato desidrogenase (LDH) – foram quantificados apenas nas gestantes com SPE.

2.1.3.8 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas conforme orientações do fornecedor de kit Milliplex para ensaio MagPlexTH-C. (Apêndice C)

Plasma: As amostras de plasma (materno e fetal) foram descongeladas, passadas em vórtex e centrifugadas.

Placenta: O preparo da placenta foi realizado com protocolo desenvolvido pelos pesquisadores com base nas recomendações dos tampões utilizados e nos projetos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Assim, a partir das amostras de placenta armazenadas a -80°C, fragmentos congelados de aproximadamente 0,3 g de tecido foram pesados em balança semianalítica com precisão de 0,01 g – inspecionada periodicamente pelo iMetro (Mettler Toledo, Suíça), os quais foram temporariamente armazenados em tubo Falcon de 15 mL. Após, adicionou-se a cada tubo o coquetel de inibidor de protease (Millipore Corporation, Catalogo #20-201) (Anexo C) diluído em RIPA Lysis Buffer 10X*, na concentração de 3mL/g de tecido (*100ml de 0,5M Tris-HCl; pH 7,4; 1,5M NaCl; 2,5% ácido deoxicólico; 10% NP-40; 10mM EDTA). Em sequência, foi realizada a maceração mecânica

do tecido placentário com garl e pistilo de porcelana. Após a maceração mecânica, o material foi transferido novamente ao tubo Falcon 15 mL, realizou-se um impulso de giro a 2.000 rpm, por 30s em centrífuga refrigerada a 18°C (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha), e então o material foi desintegrado em sonicador de banho (Aquasonic, Cortland, New York, EUA) por 10 minutos, em banho gelado (através da adição de gelo). Após a sonicação, o material foi transferido para microtubo de centrifugação de 1,5 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C (Sanyo, Londres, Reino Unido). Foi coletado todo o sobrenadante e aliquoteado 200 µl em microtubo de 0,6 mL (dois tubos por amostra), os quais foram armazenados a -20°C, até posterior análise. A concentração de proteínas da solução foi mensurada usando Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando microtubos específicos de análise (Qubit Assay tubes, Eugene, Oregon, EUA).

2.1.3.9 Moléculas em estudo

As moléculas do estudo foram mensuradas em plasma e placenta humana. Tanto marcadores previamente estudados na SPE – IL-6 (ZHANG *et al.*, 2013), TNF α (KUMAR *et al.*, 2013) e PIGF (KRAUSS, PAUER e AUGUSTIN, 2004; CHAPPELL *et al.*, 2013) – quanto marcadores até então não estudados ou pouco associados com a SPE – Leptina (EL SHAHAT *et al.*, 2013), MCP-1 (KAUMA *et al.*, 2002), NGF (KILARI *et al.*, 2011), LIGHT (WANG *et al.*, 2013) e Endocan-1 (CROSS *et al.*, 2013; JOOST *et al.*, 2013) – foram analisados.

2.1.3.10 Seleção das citocinas

A base para a seleção das citocinas foi um estudo de rastreamento realizado pela professora Bartira E. Pinheiro da Costa em seu estágio pós-doutoral (estudo não publicado), utilizando metodologia de matriz de proteína (“*protein array*”), em que 120 citocinas foram avaliadas no plasma materno, plasma do cordão umbilical e na placenta de pacientes normotensas comparadas e com pré-eclâmpsia grave. Além disso, há evidências na literatura dessas citocinas como sendo marcadores de processos inflamatórios e de lesão endotelial não apenas estudados na SPE, mas em outras patologias inflamatórias e endoteliais (LAZAROVICI, MARCINKIEWICZ e LELKES, 2006; KIM *et al.*, 2012; SCHENKEIN *et al.*, 2013).

2.1.3.11 Ensaio multiplex

Para o cálculo de concentração de moléculas em estudo, foi utilizado o Sistema MagPlexTH-C - ensaio de microesferas (MAGPIX® System, Luminex, Austin, Texas, EUA) e o Software Exponent (xPONENT 4.2). Esse sistema permite a detecção simultânea de um grande número de moléculas (analitos) de interesse. Os kits disponíveis são concebidos para analisar os níveis dos marcadores em estudo. Para esse projeto, os kits milliplex utilizados foram HADK2MAG-61K-05 e HCVD1MAG-67K-02 (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA). Os ensaios foram conduzidos de acordo com o protocolo do fabricante, no laboratório Nobel, Porto Alegre, sob orientação do Dr. Eurico Camargo Neto.

2.1.3.12 Análise dos dados demográficos maternos e fetais

Foram computados os dados presentes no protocolo padrão de coletas: dados de identificação materna, exame físico materno, história médica pregressa, história familiar materna, exames laboratoriais, dados do parto, dados do RN. O IMC foi classificado para gestantes, conforme Atalah e colaboradores (ATALAH *et al.*, 1997), em quatro categorias que consideram a IG das pacientes, como pode ser visto na Tabela 2. Dados da idade gestacional pediátrica (IGP) foram calculados pelo serviço de neonatologia do HSL pelo método de Capurro, com exceção de prematuros extremos em que foi utilizado o método Ballard, conforme protocolo padrão do serviço de neonatologia do HSL.

2.1.3.13 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados usando o programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 21.0 (SPSS 21.0) para Windows; Graphpad Prism 6 e WINPEPI (PEPI-for-Windows): *computer programs for epidemiologists*. As variáveis contínuas foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) conforme apropriado, sendo o teste *t* de Student ou U de Mann-Whitney utilizados dependendo da distribuição dos dados. Para as variáveis categóricas, utilizou-se porcentagem e aplicou-se o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As correlações entre as variáveis foram avaliadas com o coeficiente de correlação de Pearson.

Os dados relacionados à dosagem das citocinas, devido a sua assimetria, foram analisados a partir da transformação logarítmica, sendo apresentados como média geométrica (mG). Para estimar a diferença proporcional das citocinas entre os grupos, a mG das pacientes com SPE foi dividida pela mG das gestantes controles, obtendo-se a razão das médias (RM), e o intervalo de confiança (IC) de 95%. Para tal, aplicou-se um modelo de Análise de Covariância (ANCOVA) ajustado para IMC, IG e idade materna. O valor de *p* corresponde à aplicabilidade do teste de ANCOVA na comparação entre os grupos.

O ajuste de comparações múltiplas foi realizado para as análises de citocinas através do procedimento post-hoc Finner-Bonferroni. A magnitude da diferença entre os grupos foi estimada pelo tamanho do efeito (d) de Cohen ($d = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{DP_o}$) aplicada nas medidas em log obtida no modelo ANCOVA. O desvio padrão (DP_o) foi estimado por $\sqrt{MQ_{res}}$ onde MQ_{res} é a média quadrática (variância) do resíduo (erro) do modelo. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

2.1.4 Resultados

2.1.4.1 Sujeitos do estudo

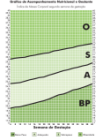
Nas tabelas 1 a 3 podem ser observados dados referentes à anamnese e ao exame físico (Tabela 1), dados de IMC das gestantes (Tabela 2) e dados do parto – parâmetros maternos e fetais (Tabela 3).

Tabela 1—Análise dos dados das características maternas: anamnese e exame físico em relação a gestantes normais (GN) e com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE)

Dados de anamnese	GN (67)	SPE (50)	<i>p</i>
Idade materna, anos	26,4±5,3	26,4±6,8	0,1
Raça branca, n (%)	34 (52,3)	31 (64,6)	0,25
Primíparas, n (%)	28 (41,8)	25 (51,0)	0,35
História familiar de HAS, n (%)	29 (49,2)	37 (84,1)	<0,001*
Número de consultas de pré-natal, n	8,2±3,2	8,0±3,7	0,73
Tabagismo, n (%) †	11 (16,7)	5 (10,2)	0,42
Hipertensão crônica, n (%)	0 (0)	12 (24,5)	-
SPE prévia, n (%)	1 (1,5)	12 (24,0)	-
DMG, n (%)	4 (6,2)	3 (6,1)	0,512
Dados de exame físico			
Peso inicial, kg**	67,3±17,3	70,1±15,2	0,37
Peso final, kg***	79,9±19,8	83,9±14,7	0,22
Diferença de pesos, kg	11,5±5,2	14,7±7,8	0,019*
IMC, kg/m ² (peso inicial)	25,8±5,6	26,9±5,5	0,31
IMC, kg/m ² (peso final)	30,4±5,8	32,3±5,4	0,08
Diferença de IMC, kg/m ²	4,4±2,0	5,7±3,0	0,02*
PAS, mmHg	118,7±10,2	156,7±17,3	<0,001*
PAD, mmHg	74,7±7,8	100,8±13,6	<0,001*
Bolsa Rota, n (%)	15 (23,1)	6 (12,5)	0,15

Fonte: Hentschke (2013). HAS: Hipertensão arterial sistêmica. DMG: Diabetes mellitus gestacional. SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia. IG: Idade gestacional. GN: Gestante normal. IMC: Índice de massa corporal. PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão arterial diastólica. Os dados estão apresentados em média±DP (teste *t* de Student), ou números absolutos e porcentagem (teste exato de Fisher), como apropriado. **p*<0,05 entre GN e SPE. **quando o paciente iniciou o pré-natal. ***Peso na admissão hospitalar. †Foi considerada como tabagismo qualquer carga tabágica diária.

Tabela 2—Análise dos dados de IMC estratificado por categorias conforme a idade gestacional em gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia

IMC – Terceiro Trimestre (<i>p</i> =0,26)			
	GN	SPE	
	Baixo peso, n (%)	10 (14,9)	3 (6,3)
	Adequado, n (%)	16 (23,9)	9 (18,8)
	Sobrepeso, n (%)	23 (34,3)	16 (33,3)
	Obesidade, n (%)	18 (26,9)	20 (41,7)

Fonte: Classificação de Atalah e colaboradores, adaptado pelo Ministério da Saúde (ATALAH *et al.*, 1997; BRASIL, 2004) e com base na Organização Mundial da Saúde (KELLY *et al.*, 1996; WHO, 2000).

Desfechos maternos e fetais

Todas as mães receberam alta hospitalar como “alta melhorada”. Em relação aos neonatos, cinco (8,1%) do grupo GN foram internados na UTI neonatal, em adição a um (1,6%) neomorto. No grupo PE, foram sete internações em UTI neonatal (14,6%), um abortamento (2,1%) e um natimorto (2,1%)⁵. Não houve diferença estatística entre os desfechos fetais ($p=0,323$).

Tabela 3–Análise de dados do parto: parâmetros maternos e fetais em relação a gestantes normais (GN) e com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE)

Parâmetros Maternos	GN (67)	SPE (50)	p
IG no parto, semanas	39,6±1,4	36,7±3,7	<0,001*
Tipo de parto, n (%)			<0,001*
Parto vaginal	45 (67,2)	12 (24,0)	
Parto cesáreo	22 (32,8)	38 (76,0)	
Parto vaginal instrumentado			0,68
Sem episiotomia	21 (46,7)	4 (33,3)	
Com episiotomia	20 (44,4)	7 (58,3)	
Com episiotomia e fórcepe	4 (8,9)	1 (8,3)	
Parâmetros Fetais	GN (67)	SPE (50)	p
Sexo Feminino, n (%)	31 (46,3)	27 (54,0)	0,41
Índice de Apgar primeiro minuto, n	8,6±0,8	7,5±1,8	<0,001*
Índice de Apgar quinto minuto, n**	9,4 ±0,6	8,7±1,2	<0,001*
IGP, Semanas	39,6 ± 1,3	37,8 ± 3,0	<0,001*
Percentil Fetal, n (%)			0,437
AIG	52 (77,6)	40 (81,6)	
PIG	3 (4,5)	3 (6,1)	
GIG	12 (17,9)	5 (10,2)	
Peso Fetal, kg	3392,6±457,6	2788,7±903,5	<0,001*
Peso Placenta, kg	648,8±141,6	590,1±178,7	0,063

Fonte: Hentschke (2013). IG: Idade gestacional. IGP: Idade gestacional pediátrica. AIG: Adequado para a idade gestacional, PIG: Pequeno para a idade gestacional, GIG: Grande para a idade gestacional. Os dados estão apresentados em valor total e porcentagem, média±DP como apropriado. * $P<0,05$ entre GN e SPE. ** Dois recém-nascidos receberam uma terceira nota de Apgar no 10º minuto e nenhum deles precisou de reanimação cardiopulmonar.

⁵ Natimorto: produto que nasce pesando mais de 500g e que não tem evidência de vida depois de nascer. Neomorto: aquele que morre no último mês da vida intrauterina.

2.1.4.2 Análise de exames laboratoriais

Na análise bioquímica foram utilizados exames de rotina do Serviço de Obstetrícia do HSL, não submetendo a paciente a nenhum outro exame. Na Tabela 4 estão representados os exames laboratoriais maternos.

Tabela 4 – Análise dos exames laboratoriais maternos em relação a gestantes normais (GN) e com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE).

Exames laboratoriais	GN (67)	SPE (50)	<i>p</i>
Hematócrito, %	35,2±2,5	36,2±3,5	0,14
Hemoglobina, g/dL	11,6±0,9	12,3±1,3	0,004*
Leucócitos totais, uL		10870±2870	-
Plaquetas, mm ³ (mil)		211±59,1	-
Creatinina, mg/dL		0,81±0,21	-
Acido úrico, mg/dL		5,1±1,5	-
Proteinúria, razão P/C		0,67 [0,42;2,2]	-
Glicemia de jejum, mg/dL	75,2±9,3	78,9±13,7	0,27
TP (RNI)		0,99±0,09	-
KTTP, seg		27,2±3,6	-
Fibrinogênio, mg/dL		443,6±90,8	-
LDH, u/L		612,9±340,9	-
BD, mg/dL		0,30±0,1	
BI, mg/dL		0,36±0,2	
TGO, u/L		56,5±146,9	
TGP, u/L		68,1±185,8	
Tipagem sanguínea ABO, n(%)			0,538
Grupo O	36 (54,5)	21 (44,7)	
Grupo A	22 (33,3)	21 (44,7)	
Grupo B	7 (10,6)	5 (10,6)	
Grupo AB	1 (1,52)	0	
Tipagem sanguínea Rh, n(%)			0,323
Rh negativo	6 (9,1)	2 (4,3)	
Rh positivo	60 (90,9)	45 (95,7)	

Fonte: Hentschke (2013). Os dados estão apresentados em média±DP, mediana [IQR], ou porcentagem, como apropriado. P/C: Proteinúria/creatininúria em amostra. **P*<0,05 entre GN e SPE.

2.1.4.3 Análises das moléculas em estudo

O Quadro 5 apresenta, por tipo de amostra analisada e por grupo estudado, a mG de cada grupo, a RM e o IC 95%, seguidos do valor de p final. Ao comparar o grupo SPE com GN, vimos significância estatística em três citocinas no plasma materno: Endocan-1, TNF α e Leptina; no plasma fetal, apenas a IL-6 e, no tecido placentário, apenas a Leptina. As demais apresentaram valores muito semelhantes entre os grupos.

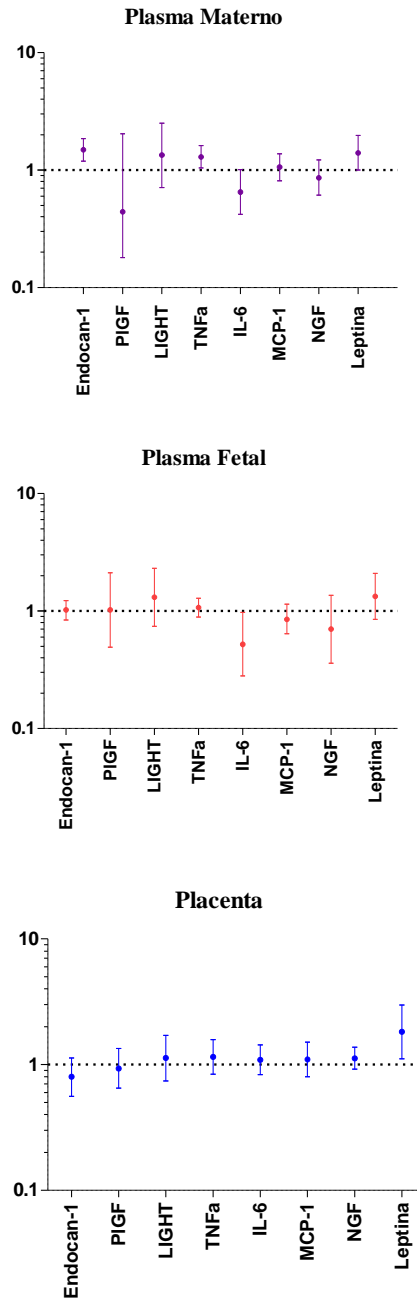
A Figura 6 representa o Quadro 5 para melhor visualização do IC 95%. Já a Figura 7 apresenta o gráfico *boxplot* dos valores brutos encontrados em cada tecido, sem a transformação logarítmica, para visualização dos valores encontrados no ensaio. Não foi aplicado teste estatístico nesse momento, visto as variáveis serem assimétricas e termos optado pela transformação logarítmica para trabalhar com testes simétricos. Os valores encontrados na dosagem, durante o ensaio, foram em pg/mL, sendo ajustados para ng/mL ou μ g/mL, nos plasmas, e, na placenta, após ajuste por grama de tecido em pg/g, para ng/g ou μ g/g, para melhor visualização.

Quadro 5 – Dosagens de moléculas mediadoras no plasma materno-fetal e placenta entre gestantes normais (GN) *versus* síndrome de pré-eclâmpsia (SPE)

		Síndrome de Pré-Eclâmpsia vs Controle					
		mG_PE	mG_Co	RM	IC (95%)		<i>p</i>
Plasma materno	Endocan-1	2,82	1,90	1,49	1,19	1,85	0,001
	PIGF	7,55	16,98	0,44	0,18	2,04	0,710
	LIGHT	75,68	56,62	1,34	0,71	2,51	0,386
	TNF α	2,48	1,92	1,29	1,04	1,61	0,021
	IL-6	5,24	8,07	0,65	0,42	1,01	0,053
	MCP1	70,31	66,53	1,06	0,81	1,37	0,676
	NGF	3,95	4,58	0,86	0,61	1,22	0,401
	Leptina	19,59	13,96	1,40	1,00	1,97	0,049
Plasma fetal	Endocan-1	3,02	2,96	1,02	0,84	1,23	0,862
	PIGF	2,43	2,39	1,02	0,49	2,12	0,962
	LIGHT	144,54	110,66	1,31	0,74	2,30	0,348
	TNF α	5,21	4,89	1,07	0,89	1,28	0,494
	IL-6	2,64	5,05	0,52	0,28	0,97	0,042
	MCP1	168,27	197,70	0,85	0,64	1,14	0,272
	NGF	2,24	3,21	0,70	0,36	1,36	0,286
	Leptina	29,38	22,08	1,33	0,85	2,09	0,216
Placenta	Endocan-1	1,64	2,06	0,80	0,56	1,13	0,202
	PIGF	0,73	0,79	0,93	0,65	1,34	0,703
	LIGHT	4,70	4,17	1,13	0,74	1,71	0,565
	TNF α	46,03	39,99	1,15	0,84	1,58	0,386
	IL-6	849,18	778,04	1,09	0,83	1,43	0,526
	MCP1	9,38	8,55	1,10	0,80	1,51	0,558
	NGF	555,90	495,45	1,12	0,92	1,37	0,259
	Leptina	163,31	89,95	1,82	1,11	2,98	0,019

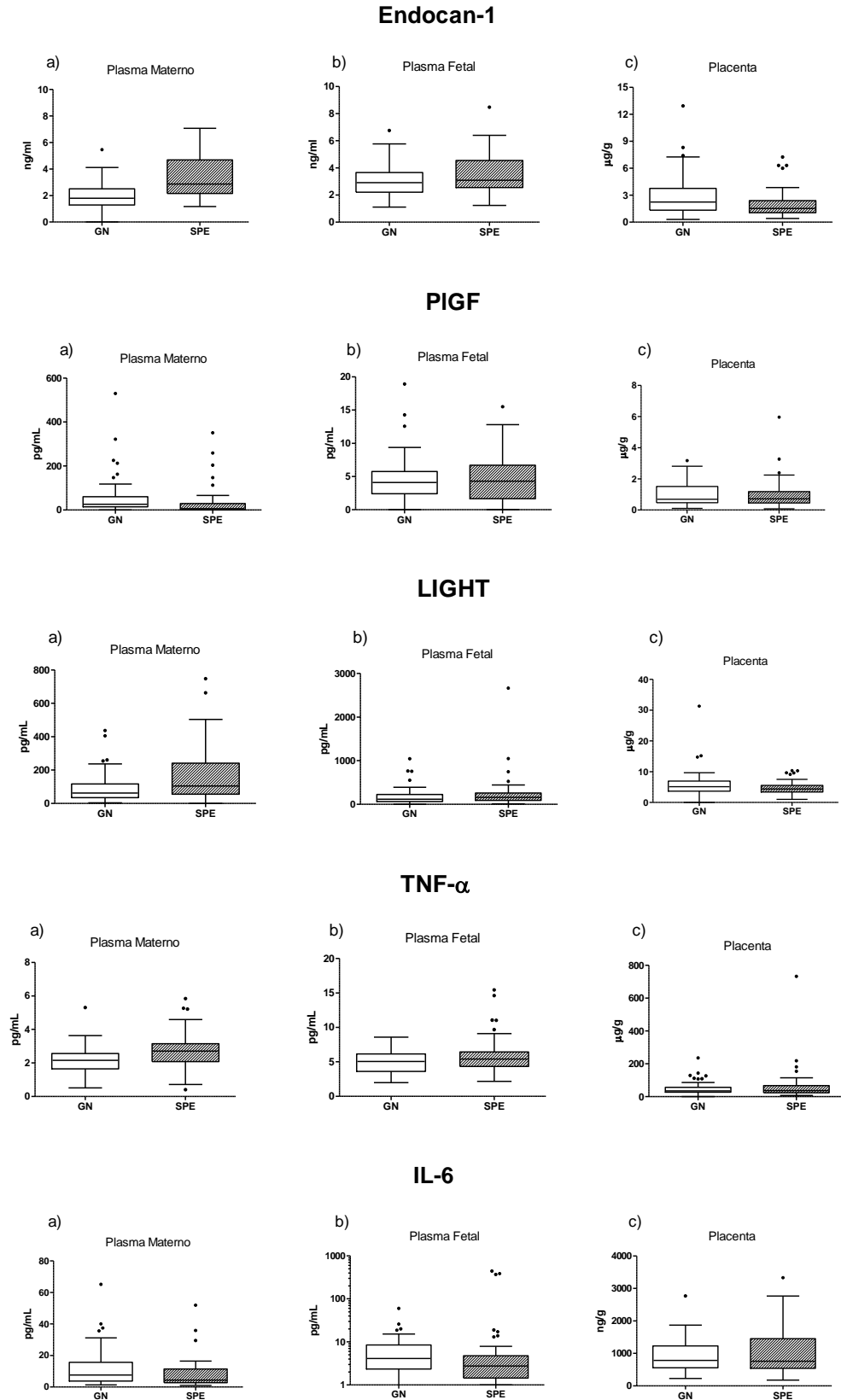
Fonte: Hentschke (2013). mG_PE: média geométrica de SPE; mG_Co: média geométrica de GN. RM: razão de médias geométricas SPE/GN. IC: Intervalo de confiança. Endocan-1: Molécula Endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGF: Fator de crescimento neural. * $P < 0,05$ entre GN e SPE, teste de ANCOVA ajustado para IMC, IG e idade materna.

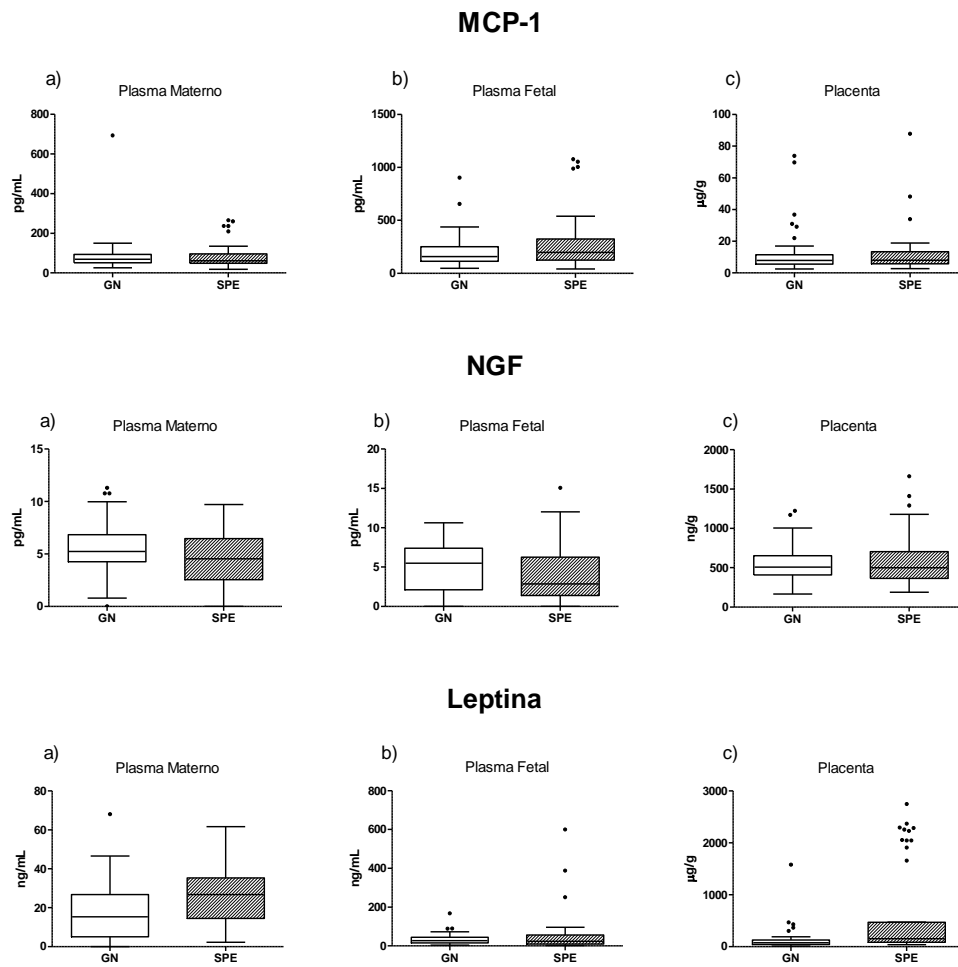
Figura 6 – Gráficos de média e barra de erros representando os intervalos de confiança de 95% para a comparação das gestantes normotensas *versus* gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, para os níveis de citocinas em valores logarítmicos no plasma materno, plasma fetal e na placenta, após aplicação do teste de ANCOVA.



Fonte: Hentschke (2013). Endocan-1: Molécula Endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGF: Fator de crescimento neural.

Figura 7 – Gráficos de *boxplot* representando, em escala linear, os valores das citocinas nas gestantes normais (GN) *versus* gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) no plasma materno (a), no plasma fetal (b) e na placenta (c).





Fonte: Hentschke (2013). Endocan-1: Molécula Endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGF: Fator de crescimento neural. GN: Gestante normal. SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia.⁶

⁶ Escala logarítmica no Gráfico IL-6 Plasma Fetal, para melhor visualização.

2.1.4.4 Estratificação da amostra

Após a primeira análise global das citocinas, optamos por estratificar a amostra de pacientes com SPE com base em idade gestacional, níveis de proteinúria e níveis pressóricos; ainda, subdividir o grupo de SPE de acordo com o diagnóstico final da DHG (PE pura e PES).

Analizamos todas as citocinas para essas estratificações. No Quadro 6, pode-se ver o valor de p de todos os resultados obtidos. No Apêndice D, está a relação da estratificação em relação à prematuridade (IG_37), com a RM e o IC (95%) para todas as citocinas, como modelo de quadro para as demais estratificações. Não foram construídas tabelas completas para todas as estratificações, com exceção daquelas em que o valor de p foi significativo (Quadro 7). Uma maior compreensão dos Quadros 6 e 7 e a importância de sua elaboração para o estudo podem ser vistos no item *Discussão* deste Bloco.

2.1.4.5 Estimativa da magnitude da diferença entre os grupos

A estimativa da magnitude da diferença entre os grupos foi calculada pelo tamanho do efeito de Cohen (d). Este procedimento foi aplicado às análises de citocinas que apresentaram significância estatística na comparação entre SPE vs. GN e PE pura vs. GN. (ver Quadro 6). Os efeitos de Cohen podem ser triviais (0,0 – 0,2), baixos (0,2 – 0,6), moderados (0,6 – 1,2), altos (1,2 – 2,0), muito altos (2,0 – 4,0) e quase perfeitos (4 – infinito) (HOPKINS, 2014). O tamanho do efeito em relação à molécula de Endocan-1 foi o único moderado, sendo de 0,84 na relação SPE vs. GN, e 0,94 na PE pura vs. GN. As demais citocinas apresentaram valores entre 0,47 e 0,58, logo, com magnitude baixa.

Quadro 6–Quadro representativo dos valores de *p* correspondentes à Análise de Covariância realizadas após a estratificação do grupo síndrome de pré-eclâmpsia (SPE) de acordo com idade gestacional (IG), pressão arterial sistólica (PAS), proteinúria (Pr) e pré-eclâmpsia sobreposta (PES).

	Citocina	SPE_GN	PE_GN	SPE_PES	IG_37	IG_34	PAS	Pr_0,5	Pr_2,0
		<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
Plasma materno	Endocan-1	0,001	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002
	PIGF	0,710	0,041	0,195	0,161	0,009	0,107	0,012	0,142
	LIGHT	0,386	0,165	0,577	0,141	0,145	0,602	0,384	0,478
	TNF α	0,021	0,036	0,058	0,070	0,058	0,072	0,071	0,058
	IL-6	0,053	0,107	0,141	0,156	0,114	0,108	0,033	0,152
	MCP1	0,676	0,470	0,632	0,188	0,536	0,818	0,479	0,679
	NGF	0,401	0,969	0,361	0,103	0,653	0,193	0,692	0,275
	Leptina	0,049	0,059	0,131	0,116	0,045	0,071	0,106	0,145
Plasma fetal	Endocan-1	0,862	0,858	0,602	0,056	0,841	0,952	0,092	0,136
	PIGF	0,962	0,796	0,936	0,999	0,436	0,377	0,988	0,659
	LIGHT	0,348	0,269	0,605	0,596	0,345	0,254	0,187	0,605
	TNF α	0,494	0,672	0,075	0,776	0,449	0,181	0,515	0,514
	IL-6	0,042	0,045	0,035	0,109	0,124	0,102	0,031	0,047
	MCP1	0,272	0,366	0,216	0,029	0,401	0,340	0,427	0,159
	NGF	0,286	0,228	0,513	0,302	0,345	0,291	0,557	0,390
	Leptina	0,216	0,448	0,457	0,389	0,449	0,041	0,037	0,434
Placenta	Endocan-1	0,202	0,148	0,444	0,441	0,317	0,422	0,318	0,408
	PIGF	0,703	0,535	0,744	0,586	0,91	0,467	0,917	0,913
	LIGHT	0,565	0,668	0,752	0,846	0,848	0,580	0,658	0,643
	TNF α	0,386	0,862	0,678	0,499	0,020	0,583	0,500	0,042
	IL-6	0,526	0,531	0,818	0,445	0,247	0,006	0,107	0,764
	MCP1	0,558	0,727	0,816	0,687	0,303	0,495	0,770	0,535
	NGF	0,259	0,736	0,165	0,48	0,304	0,306	0,493	0,476
	Leptina	0,019	0,028	0,037	0,038	0,052	0,063	0,057	0,049

Fonte: Hentschke (2013). **SPE_GN:** Análise entre SPE vs. GN; **PE_GN:** Análise entre PE pura vs. GN; **SPE_PES:** Análise separando grupo de SPE vs. PES vs. GN; **IG_37:** Análise entre PE com IG<37 semanas vs. PE com IG \geq 37 semanas vs. GN; **IG_34:** Análise entre PE com IG<34 semanas vs. PE com IG \geq 34 semanas vs. GN; **PAS:** Análise entre PE com PAS \geq 160 mmHg vs. PE com PAS<160 mmHg vs. GN; **Pr_0,5:** Análise com base no ponto de corte da proteinúria (Pr) 0,5. PE com Pr \geq 0,5 vs. PE com Pr< 0,5 vs. GN; **Pr_2,0:** Análise com base no ponto de corte da Pr em 2. PE com Pr \geq 0,2 vs. PE com Pr< 0,2 vs. GN. Endocan-1: Molécula endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGF: Fator de crescimento neural.

Quadro 7– Representação dos valores de média geométrica (mG), razão das médias (RM) e intervalo de confiança (IC) de 95% para aquelas citocinas que apresentaram significância estatística após a estratificação do grupo de síndrome de pré-eclâmpsia

		Plasma materno					
		mG_1	mG_2	RM	IC (95%)	<i>p</i>	<i>P_{aj}</i>
Endocan-1	SPE_37					0,002	
	IG<37/GN	3,42	1,85	1,85	1,12 3,06	0,017	0,025
	IG>37/GN	2,72	1,85	1,47	1,18 1,84	0,001	0,003
	IG>37/IG<37	2,72	3,42	0,80	0,50 1,27	0,337	0,337
	SPE_34					0,001	
	IG<34/GN	4,28	1,81	2,36	1,16 4,83	0,019	0,028
	IG>34/GN	2,77	1,81	1,53	1,22 1,91	<0,001	<0,001
	IG>34/IG<34	2,77	4,28	0,65	0,34 1,22	0,179	0,179
	PAS_160					0,002	
	SPE > 160/GN	2,74	1,90	1,44	1,08 1,92	0,014	0,021
	SPE < 160/GN	2,87	1,90	1,51	1,19 1,93	0,001	0,003
	SPE < 160/>160	2,87	2,74	1,05	0,79 1,40	0,742	0,742
	Pr_0,5					0,002	
	SPE > 0,5/GN	3,02	1,89	1,60	1,23 2,08	0,001	0,003
	SPE < 0,5/GN	2,60	1,89	1,38	1,06 1,79	0,019	0,028
	SPE < 0,5/>0,5	2,60	3,02	0,86	0,64 1,15	0,310	0,310
	Pr_2,0					0,002	
	SPE > 2,0/GN	3,03	1,89	1,60	1,10 2,32	0,013	0,019
	SPE < 2,0/GN	2,77	1,89	1,47	1,17 1,84	0,001	0,003
	SPE < 2,0/>2,0	2,77	3,03	0,92	0,65 1,30	0,620	0,620
SPE vs PES					0,002		
PES/GN	2,62	1,91	1,38	0,96 1,97	0,082	0,120	
SPE/GN	2,88	1,91	1,51	1,20 1,89	0,001	0,003	
SPE /PES	2,88	2,62	1,10	0,78 1,54	0,591	0,591	
PE vs GN	8,67	23,01	0,38	0,15 0,95	0,041		
PIGF	SPE_34					0,009	
	IG<34/GN	0,34	24,10	0,01	0,00 0,24	0,003	0,009
	IG>34/GN	8,65	24,10	0,36	0,15 0,86	0,022	0,022
	IG<34/IG>34	0,34	8,65	0,04	0,00 0,49	0,012	0,018
	SPE Pr_0,5					0,012	
	IG>0,5/GN	3,98	17,74	0,22	0,08 0,63	0,005	0,015
	IG<0,5/GN	15,92	17,74	0,90	0,32 2,55	0,840	0,840
	IG<0,5/IG>0,5	15,92	3,98	4,00	1,27 12,62	0,018	0,027
IL-6	Pr_0,5					0,033	
	IG>0,5/GN	6,64	7,94	0,84	0,50 1,40	0,496	0,496
	IG<0,5/GN	3,97	7,94	0,50	0,30 0,84	0,010	0,030
TNF α	PE vs GN	2,54	1,98	1,29	1,02 1,63	0,036	

		Plasma fetal					
		mG_1	mG_2	RM	IC (95%)	<i>p</i>	<i>P_{aj}</i>
IL-6	Pr_0,5					0,031	
	SPE > 0,5/GN	3,52	4,98	0,71	0,35 1,45	0,343	0,343
	SPE < 0,5/GN	1,75	4,98	0,35	0,16 0,76	0,009	0,027
	SPE < 0,5/>0,5	1,75	3,52	0,50	0,22 1,13	0,095	0,139
	Pr_2,0					0,047	
	SPE > 2,0/GN	4,52	5,00	0,90	0,34 2,43	0,839	0,839
	SPE < 2,0/GN	2,29	5,00	0,46	0,24 0,87	0,019	0,056
	SPE < 2,0/>2,0	2,29	4,52	0,51	0,19 1,32	0,160	0,230
	PE vs GN	2,61	4,60	0,57	0,33 0,99	0,045	
	SPE vs PES					0,035	
	PES/GN	5,32	4,83	1,10	0,36 3,35	0,862	0,862
	SPE/GN	2,31	4,83	0,48	0,25 0,90	0,022	0,065
SPE /PES	2,31	5,32	0,43	0,15 1,22	0,111	0,162	
MCP-1	SPE_37					0,029	
	IG<37/GN	308,32	183,23	1,68	0,91 3,13	0,10	0,146
	IG>37/GN	150,31	183,23	0,82	0,62 1,09	0,18	0,180
	IG>37/IG<37	150,31	308,32	0,49	0,27 0,87	0,02	0,059

		Placenta					
		mG_1	mG_2	RM	IC (95%)	<i>p</i>	<i>P_{aj}</i>
TNF α	SPE_34					0,020	
	IG<34/GN	14,52	45,6	0,32	0,12 0,86	0,024	0,036
	IG>34/GN	48,53	45,6	1,06	0,78 1,46	0,691	0,691
	IG>34/IG<34	48,53	14,52	3,34	1,38 8,05	0,008	0,024
	Pr_2,0					0,042	
	SPE > 2,0/GN	28,97	40,74	0,71	0,43 1,18	0,183	0,216
IL-6	SPE < 2,0/GN	51,4	40,74	1,26	0,92 1,74	0,150	0,216
	SPE < 2,0/>2,0	51,4	28,97	1,77	1,10 2,84	0,018	0,053
	PAS_160					0,006	
	SPE > 160/GN	591,56	788,86	0,75	0,53 1,06	0,103	0,103
SPE < 160/GN	1023,29	788,86	1,30	0,98 1,72	0,070	0,103	
SPE < 160/>160	1023,29	591,56	1,73	1,24 2,43	0,002	0,006	

Fonte: Hentschke (2013). **PE_GN:** Análise entre PE pura vs. GN; **SPE_PES:** Análise separando grupo de SPE vs. PES vs. GN; **IG_37:** Análise entre PE com IG<37 sem vs. PE com IG \geq 37 sem vs. GN; **IG_34:** Análise entre PE com IG<34 sem vs. PE com IG \geq 34 sem vs. GN; **PAS:** Análise entre PE com PAS \geq 160 vs. PE com PAS<160 vs. GN; **Pr_0,5:** Análise com base no ponto de corte da proteinúria (P/C) em 0,5 PE com Pr \geq 0,5 vs. PE com Pr< 0,5 vs. GN; **Pr_2,0:** Análise com base no ponto de corte da proteinúria (Pr) em 2,0: PE com Pr \geq 0,2 vs. PE com Pr< 0,2 vs. GN. *P_{aj}*: Valor de *p* ajustado para o método de Bonferroni (ajustado por Finner).

2.1.4.6 Análise de correlações

Após a aplicação das correlações, categorias de r como (0-0,1): trivial; (0,1-0,3): baixa/leve; (0,3-0,5): moderada; (0,5-0,7): alta e (0,7-0,9): muito alta, permitiram a classificação dos achados (HOPKINS, 2014). Correlação quase perfeita ($r=0,9-1,0$) não foi atingida por nenhum dos valores analisados. Nos Quadros 8 a 13 é possível visualizar os valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e a sua significância (p), considerando $p<0,05$.

Citocinas vs. Dados clínicos

Foram realizadas correlações entre dados demográficos, dados de exame físico e dados do parto em relação às citocinas em estudo. Após aplicação desse teste na totalidade da amostra, procurou-se apresentar as correlações entre grupos específicos (SPE e GN) para aquelas citocinas que apresentaram significância na análise global. O Quadro 8 compreende a análise de idade gestacional no parto, peso do RN e peso da placenta; o Quadro 9, o peso inicial do pré-natal, peso final da gestação, a diferença de pesos. No Quadro 10, IMC usando peso inicial, IMC peso final e o delta do IMC. No Quadro 11, níveis de pressões, PAS e pressão arterial diastólica (PAD), e de proteinúria com base no P/C.

Citocinas vs. citocinas

Optou-se nesse momento por fazer a correlação entre uma citocina e outra, nas diferentes amostras, buscando entender a cumplicidade das moléculas, principalmente entre aquelas de papel pró-inflamatório.

Considerando que correlações fracas e moderadas entre citocinas podem ter ocorrido ao acaso, visto grande número de cruzamentos realizados, optou-se por dar o enfoque, neste momento, apenas às correlações fortes r (0,5-0,7), ou muito forte r (0,7-0,9), realizadas entre o conjunto global de pacientes, e em separado entre os grupos (SPE e GN) (Quadro 12).

Citocinas *vs.* amostras de plasma materno, plasma fetal e placenta

Ao visualizar o Quadro 13, percebe-se a análise de correlação das amostras estudadas (plasma materno, plasma fetal e placenta) em relação a cada uma das citocinas. Primeiramente de forma global em relação às amostras, e, na sequência, em separado, primeiro do grupo de SPE e após da GN.

Quadro 8–Análise de correlação da idade gestacional no parto, peso do RN e peso placenta em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia

		IG parto			Peso RN			Peso Placenta		
		Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN
Plasma materno	Endocan-1	r=-0,382 p<0,001	r= -0,411 p=0,004		r=-0,418 p<0,001	r=-0,376 p=0,009		r=-0,341 p=0,001	r=-0,333 p=0,026	
	PIGF	r=0,478 p<0,001	r=0,489 p<0,001		r=0,510 p<0,001	r=0,536 p<0,001		r=0,331 p=0,001	r=0,458 p=0,002	
	LIGHT	r=-0,097 p=0,329			r=-0,106 p=0,287			r=0,005 p=0,963		
	TNF α	r=-0,011 p=0,908			r=-0,067 p=0,500			r=-0,080 p=0,429		
	IL-6	r=0,076 p=0,443			r=0,116 p=0,241			r=0,133 p=0,189		
	MCP-1	r=0,115 p=0,249			r=-0,011 p=0,913			r=-0,088 p=0,385		
	NGF	r=0,178 p=0,072			r=0,147 p=0,138			r=0,008 p=0,937		
	Leptina-1	r=-0,139 p=0,162		r=0,323 p=0,015	r=-0,089 p=0,372			r=0,002 p=0,985		
Plasma fetal	Endocan-1	r=-0,260 p=0,008	r=-0,389 p=0,008		r=-0,281 p=0,004	r=-0,388 p=0,008		r=-0,289 p=0,003	r=-0,321 p=0,031	
	PIGF	r=-0,049 p=0,625			r=0,042 p=0,675			r=0,075 p=0,454		
	LIGHT	r=-0,084 p=0,396			r=-0,085 p=0,393			r=-0,128 p=0,203		
	TNF α	r=-0,151 p=0,129			r=-0,147 p=0,137			r=-0,096 p=0,337		
	IL-6	r=-0,034 p=0,730			r=0,004 p=0,968			r=-0,076 p=0,447		
	MCP-1	r=-0,429 p<0,001	r=-0,654 p<0,001		r=-0,434 p<0,001	r=-0,603 p<0,001		r=-0,326 p<0,001	r=-0,512 p<0,001	
	NGF	r=0,126 p=0,206			r=0,116 p=0,245			r=0,087 p=0,385		
	Leptina	r=0,416 p<0,001	r=0,551 p<0,001		r=0,534 p<0,001	r=0,618 p<0,001	r=0,405 p=0,002	r=0,444 p<0,001	r=0,477 p=0,001	r=0,401 p=0,002
Placenta	Endocan-1	r=0,062 p=0,528			r=0,032 p=0,749			r=-0,028 p=0,783		
	PIGF	r=-0,038 p=0,702			r=-0,012 p=0,904			r=0,004 p=0,972		
	LIGHT	r=0,203 p=0,037	r=0,565 p<0,001		r=0,050 p=0,613	r=0,507 p<0,001	r=-0,333 p=0,013	r=-0,058 p=0,564	r=-0,345 p=0,016	
	TNF α	r=0,223 p=0,022	r=0,353 p=0,012		r=0,166 p=0,090			r=0,175 p=0,078		
	IL-6	r=0,213 p=0,028	r=0,343 p=0,015		r=0,272 p=0,005	r=0,359 p=0,010		r=0,238 p=0,015		
	MCP-1	r=0,182 p=0,062			r=0,131 p=0,181			r=0,250 p=0,011		r=0,313 p=0,020
	NGF	r=0,187 p=0,054	r=0,301 p=0,034		r=0,228 p=0,019		r=0,282 p=0,035	r=0,259 p=0,008		
	Leptina	r=-0,511 p<0,001	r=-0,444 p=0,001		r=-0,475 p<0,001	r=-0,446 p=0,001		r=-0,320 p=0,001	r=-0,392 p=0,006	

Correlação fraca (r:0,1-0,3)

Correlação moderada (r: 0,3-0,5)

Correlação forte (r:0,5-0,7)

Fonte: Hentschke (2013). IG parto: Idade Gestacional no parto; RN: Recém-nascido; GN: Gestante normal. SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia. Endocan-1: Molécula endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGF: Fator de crescimento neural.⁷

⁷ Essa legenda corresponde aos quadros 8, 9, 10, 11 e 13.

Quadro 9—Análise de correlação do peso inicial, peso final e diferença de pesos em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia

		Peso inicial			Peso final			Diferença de pesos		
		Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN
Plasma materno	Endocan-1	r=-0,021 p=0,842			r=-0,075 p=0,456			r=-0,046 p=0,659		
	PIGF	r=-0,049 p=0,635			r=-0,065 p=0,520			r=0,019 p=0,852		
	LIGHT	r=-0,241 p=0,018		r=-0,371 p=0,005	r=-0,209 p=0,036		r=-0,349 p=0,008	r=0,013 p=0,900		
	TNF α	r=0,105 p=0,309			r=0,071 p=0,478			r=0,183 p=0,075		
	IL-6	r=-0,100 p=0,334			r=-0,028 p=0,785			r=0,035 p=0,738		
	MCP-1	r=-0,094 p=0,361			r=-0,161 p=0,109			r=-0,171 p=0,095		
	NGF	r=0,089 p=0,389	r=0,387 p=0,012		r=0,064 p=0,526	r=0,461 p=0,001		r=0,125 p=0,225		
	Leptina-1	r=0,416 p<0,001		r=0,524 p<0,001	r=0,501 p<0,001	r=0,385 p=0,009	r=0,559 p<0,001	r=0,259 p=0,011		
Plasma fetal	Endocan-1	r=0,150 p=0,146			r=0,119 p=0,237			r=-0,053 p=0,610		
	PIGF	r=-0,182 p=0,076			r=-0,148 p=0,140			r=0,017 p=0,872		
	LIGHT	r=0,126 p=0,220			r=0,119 p=0,237			r=0,000 p=0,994		
	TNF α	r=0,171 p=0,096			r=0,204 p=0,041			r=0,084 p=0,418		
	IL-6	r=0,219 p=0,032		r=0,280 p=0,037	r=0,205 p=0,039			r=0,016 p=0,879		
	MCP-1	r=0,042 p=0,687			r=0,001 p=0,991			r=-0,047 p=0,649		
	NGF	r=-0,012 p=0,906			r=-0,020 p=0,845			r=0,130 p=0,208		
	Leptina	r=0,012 p=0,907			r=0,126 p=0,209			r=0,316 p=0,002	r=0,366 p=0,020	
Placenta	Endocan-1	r=-0,034 p=0,737			r=-0,032 p=0,752			r=0,014 p=0,892		
	PIGF	r=0,027 p=0,795			r=-0,076 p=0,446			r=-0,194 p=0,056	r=-0,306 p=0,025	
	LIGHT	r=0,083 p=0,419			r=0,058 p=0,558			r=-0,094 p=0,356		
	TNF α	r=0,045 p=0,662		r=0,277 p=0,042	r=0,120 p=0,226		r=0,315 p=0,019	r=0,032 p=0,753		
	IL-6	r=-0,047 p=0,642			r=0,090 p=0,364			r=0,166 p=0,102	r=0,301 p=0,047	
	MCP-1	r=0,063 p=0,536		r=0,339 p=0,011	r=0,144 p=0,144		r=0,358 p=0,007	r=-0,002 p=0,983		
	NGF	r=-0,085 p=0,400			r=0,131 p=0,184		r=0,312 p=0,019	r=0,237 p=0,018	r=0,334 p=0,013	
	Leptina	r=0,108 p=0,287			r=0,088 p=0,377			r=0,077 p=0,450		

Correlação fraca (r:0,1-0,3)

Correlação moderada (r: 0,3-0,5)

Correlação forte (r:0,5-0,7)

Fonte: Hentschke (2013).

Quadro 10–Análise de correlação do IMC do peso inicial, IMC do peso final e diferença de IMC em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia

		IMC_Peso inicial			IMC_Peso final			Delta IMC		
		Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN
Plasma materno	Endocan-1	r=-0,052 p=0,614			r=-0,108 p=0,281	r=-0,387 p=0,009		r=-0,052 p=0,612		
	PIGF	r=-0,018 p=0,863			r=-0,014 p=0,886			r=0,036 p=0,731		
	LIGHT	r=-0,178 p=0,083		r=-0,313 p=0,020	r=-0,147 p=0,143		r=-0,332 p=0,012	r=0,046 p=0,653		
	TNF α	r=0,141 p=0,170			r=0,160 p=0,110			r=0,201 p=0,049		
	IL-6	r=-0,107 p=0,297			r=-0,051 p=0,614			r=0,039 p=0,703		
	MCP-1	r=0,167 p=0,104	r=0,323 p=0,039		r=0,256 p=0,010	r=0,389 p=0,008		r=0,220 p=0,032		
	NGF	r=0,009 p=0,932			r=0,013 p=0,895	r=0,360 p=0,015		r=0,100 p=0,335		
	Leptina-1	r=0,411 p<0,001		r=0,491 p<0,001	r=0,530 p<0,000	r=0,448 p=0,002	r=0,566 p<0,001	r=0,256 p=0,012		
Plasma fetal	Endocan-1	r=0,166 p=0,106			r=0,135 p=0,179			r=-0,062 p=0,547		
	PIGF	r=-0,183 p=0,075			r=-0,166 p=0,098			r=0,016 p=0,878		
	LIGHT	r=0,094 p=0,363			r=0,093 p=0,353			r=-0,025 p=0,809		
	TNF α	r=0,143 p=0,163			r=0,187 p=0,061			r=0,061 p=0,554		
	IL-6	r=0,203 p=0,047			r=0,210 p=0,035		r=0,267 p=0,044	r=0,000 p=0,998		
	MCP-1	r=0,041 p=0,690			r=0,001 p=0,995			r=-0,049 p=0,637		
	NGF	r=-0,050 p=0,627			r=-0,036 p=0,723			r=0,115 p=0,266		
	Leptina	r=0,028 p=0,789			r=0,178 p=0,075			r=0,335 p=0,001	r=0,400 p=0,011	
Placenta	Endocan-1	r=-0,002 p=0,983			r=-0,006 p=0,949			r=0,017 p=0,867		
	PIGF	r=0,068 p=0,503			r=-0,045 p=0,653			r=-0,200 p=0,048		r=-0,309 p=0,023
	LIGHT	r=0,095 p=0,350			r=0,061 p=0,541			r=-0,104 p=0,307		r=-0,278 p=0,042
	TNF α	r=-0,001 p=0,992			r=0,062 p=0,532			r=0,027 p=0,791		
	IL-6	r=-0,033 p=0,743			r=0,112 p=0,259			r=0,182 p=0,071	r=0,304 p=0,045	
	MCP-1	r=0,054 p=0,593		r=0,376 p=0,005	r=0,108 p=0,277		r=0,376 p=0,004	r=-0,007 p=0,942		
	NGF	r=-0,119 p=0,241			r=0,090 p=0,363		r=0,277 p=0,039	r=0,234 p=0,019		r=0,324 p=0,016
	Leptina	r=0,130 p=0,198			r=0,136 p=0,168			r=0,089 p=0,382		

Correlação fraca (r:0,1-0,3)

Correlação moderada (r: 0,3-0,5)

Correlação forte (r:0,5-0,7)

Fonte: Hentschke (2013). IMC: Índice de massa corporal. Delta IMC: IMC final – IMC Inicial.

Quadro 11–Correlação citocinas com pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e proteinúria em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia

		PAS			PAD			Proteinúria
		Geral	SPE	GN	Geral	SPE	GN	SPE
Plasma materno	Endocan-1	r=-0,396 p<0,001			r=-0,462 p<0,001		r=0,299 p=0,025	
	PlGF	r=-0,352 p<0,001			r=-0,360 p<0,001		r=-0,308 p=0,021	
	LIGHT	r=0,027 p=0,784			r=0,031 p=0,754			
	TNF α	r=0,188 p=0,057			r=0,138 p=0,164			
	IL-6	r=-0,217 p=0,028			r=-0,197 p=0,046			
	MCP-1	r=-0,020 p=0,842			r=-0,045 p=0,652			
	NGF	r=-0,065 p=0,513			r=-0,162 p=0,103			
	Leptina-1	r=0,222 p=0,024	r=-0,311 p=0,033	r=0,293 p=0,028	r=0,216 p=0,029			
Plasma fetal	Endocan-1	r=-0,206 p=0,036			r=-0,143 p=0,150			r=-0,298 p=0,044
	PlGF	r=-0,045 p=0,649			r=-0,031 p=0,755			
	LIGHT	r=-0,030 p=0,765	r=-0,445 p=0,002		r=-0,025 p=0,803	r=0,320 p=0,030		
	TNF α	r=0,094 p=0,345			r=0,102 p=0,306			
	IL-6	r=-0,043 p=0,669			r=-0,158 p=0,111			
	MCP-1	r=0,129 p=0,195			r=0,175 p=0,077		r=0,280 p=0,035	
	NGF	r=-0,019 p=0,850			r=-0,125 p=0,208			
	Leptina	r=-0,096 p=0,333			r=-0,147 p=0,137			
Placenta	Endocan-1	r=-0,090 p=0,363			r=-0,075 p=0,449			
	PlGF	r=-0,043 p=0,664			r=-0,010 p=0,923			
	LIGHT	r=-0,090 p=0,364			r=-0,078 p=0,431			r=-0,351 p=0,013
	TNF α	r=-0,016 p=0,874			r=0,106 p=0,283			r=-0,331 p=0,019
	IL-6	r=-0,191 p=0,050	r=-0,289 p=0,042	r=-0,318 p=0,017	r=-0,068 p=0,491			
	MCP-1	r=0,030 p=0,758			r=0,154 p=0,116	r=0,320 p=0,024		r=-0,310 p=0,029
	NGF	r=-0,014 p=0,885			r=0,108 p=0,270			
	Leptina	r=0,354 p<0,001			r=0,303 p=0,002			

Correlação fraca (r:0,1-0,3)


Correlação moderada (r: 0,3-0,5)


Correlação forte (r:0,5-0,7)

Fonte: Hentschke (2013). PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão arterial diastólica.

Quadro 12–Correlações fortes e muito fortes entre as citocinas em estudo⁸ em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia

			Plasma materno	Plasma Fetal	Placenta		
			Endocan-1		TNF α	LIGHT	Leptina
Plasma materno	Geral	PIGF	r=-0,605 p<0,001				r=-0,501 p<0,001
	SPE	PIGF	r=-0,646 p<0,001				
Plasma fetal	GN	IL-6	r=-0,545 p<0,001				
	GN	TNFα		r=0,633 p<0,001			
	Geral	TNFα		r=0,601 p<0,001			
	SPE	TNFα		r=0,551 p<0,001			
	SPE	MCP-1		r=0,710 p<0,001			
Placenta	Geral	MCP-1			r=0,568 p<0,001		
	SPE	MCP-1			r=0,694 p<0,001		
	SPE	IL-6			r=0,571 p<0,001	r=0,530 p<0,001	

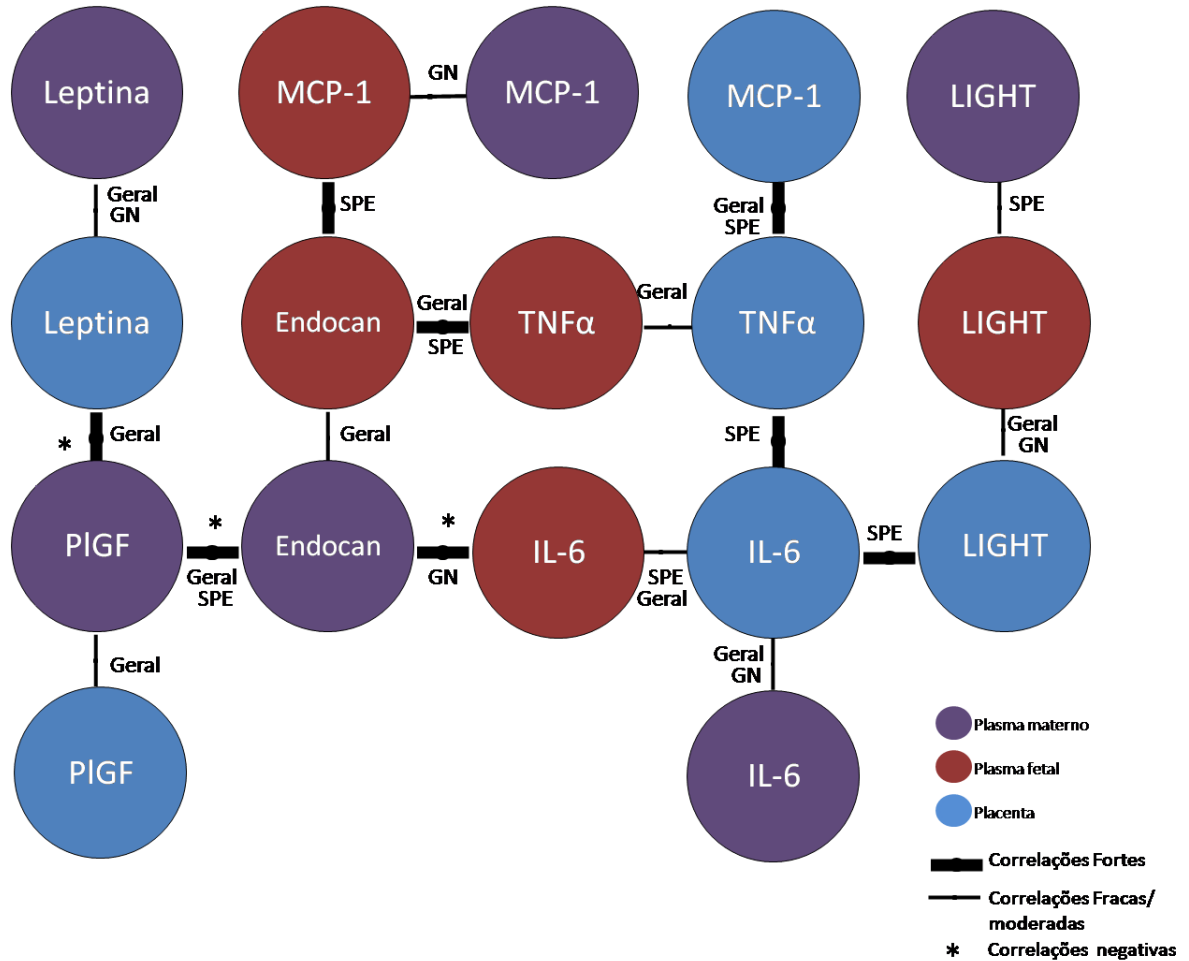
 Correlação forte (r:0,5-0,7)

 Correlação muito forte (r:0,7-0,9)

Fonte: Hentschke (2013). GN: Gestante normal. SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia. Endocan-1: Molécula endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1.

⁸Considerando o grande número de cruzamentos e as possíveis correlações ocorridas ao acaso, optou-se por discutir apenas aquelas com correlações consideradas moderadas/fortes.

Figura 8–Representação esquemática das correlações encontradas entre as citocinas nas diferentes amostras, e entre as amostras para uma mesma citocina



Fonte: Hentschke (2014). GN: Gestante Normal; SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia; Endocan-1: Molécula endotelial específica de célula 1; PIGF: Fator de crescimento placentário; LIGHT: membro da superfamília TNF; TNF α : Fator de necrose tumoral-alfa; IL-6: Interleucina-6; MCP-1: Proteína quimiotática de monócitos-1; NGF: Fator de crescimento neural

Quadro 13–Correlação dos níveis de citocinas entre as diferentes amostras (plasma materno, plasma fetal e placenta) em relação à totalidade da amostra, às gestantes normais e às com síndrome de pré-eclâmpsia

Geral	Plasma Fetal								Placenta								Plasma fetal	Placenta							
	Endocan-1	PIGF	LIGHT	TNFa	IL-6	MCP1	NGF	Leptina	Endocan-1	PIGF	LIGHT	TNFa	IL-6	MCP1	NGF	Leptina		Endocan-1	PIGF	LIGHT	TNFa	IL-6	MCP1	NGF	Leptina
Endocan-1	r=0,258 p=0,015								r=-0,109 p=0,305								r=-0,053 p=0,604								
PIGF		r=0,101 p=0,348								r=0,244 p=0,020								r=-0,030 p=0,769							
LIGHT			r=0,196 p=0,066								r=0,126 p=0,235								r=0,244 p=0,014						
TNFa				r=0,013 p=0,907							r=-0,037 p=0,730									r=0,203 p=0,043					
IL-6					r=0,062 p=0,562								r=0,311 p=0,003								r=0,236 p=0,017				
MCP1						r=0,165 p=0,121								r=0,040 p=0,703								r=0,048 p=0,635			
NGF							r=-0,475 p<0,000									r=-0,158 p=0,133							r=-0,086 p=0,394		
Leptina-1								r=0,141 p=0,189																r=-0,035 p=0,728	
GRUPO SPE	Plasma Fetal								Placenta								Plasma fetal	Placenta							
Endocan-1	r=0,159 p=0,307								r=-0,066 p=0,658									r=0,121 p=0,423							
PIGF		r=0,174 p=0,264								r=0,311 p=0,034								r=-0,005 p=0,975							
LIGHT			r=0,368 p=0,015								r=0,239 p=0,106								r=0,232 p=0,120						
TNFa				r=0,040 p=0,798							r=-0,084 p=0,574									r=0,210 p=0,161					
IL-6					r=0,044 p=0,778							r=0,224 p=0,130									r=0,385 p=0,008				
MCP1						r=-0,021 p=0,892								r=-0,178 p=0,230								r=0,003 p=0,986			
NGF							r=0,350 p=0,022									r=-0,125 p=0,401							r=-0,043 p=0,775		
Leptina-1								r=0,193 p=0,216																r=-0,066 p=0,663	
GRUPO GN	Plasma Fetal								Placenta								Plasma fetal	Placenta							
Endocan-1	r=0,276 p=0,064								r=-0,071 p=0,646									r=-0,113 p=0,417							
PIGF		r=0,071 p=0,641									r=0,155 p=0,316							r=-0,059 p=0,670							
LIGHT			r=-0,022 p=0,882									r=0,097 p=0,533								r=0,270 p=0,048					
TNFa				r=-0,138 p=0,362								r=0,056 p=0,720									r=0,218 p=0,114				
IL-6					r=-0,022 p=0,883								r=0,419 p=0,004									r=0,064 p=0,640			
MCP1						r=0,414 p=0,004								r=0,284 p=0,059								r=0,108 p=0,432			
NGF							r=0,635 p<0,000									r=0,182 p=0,232							r=-0,131 p=0,339		
Leptina-1								r=0,182 p=0,226																r=0,073 p=0,598	

Correlação fraca (r:0,1-0,3)

Correlação moderada (r: 0,3-0,5)

Correlação forte (r:0,5-0,7)

Fonte: Hentschke (2013)

2.1.5 Discussão

Este estudo avaliou a presença de oito moléculas mediadora sem plasma materno, plasma fetal e tecido placentário em gestantes com e sem SPE; comparou os níveis dessas citocinas entre as pacientes e os correlacionou com dados clínicos maternos e fetais. Estratificações no grupo SPE foram realizadas para melhor compreensão das possíveis influências que variáveis como IG, PAS, proteinúria e a presença da HC prévia poderiam ter entre os grupos e as citocinas. A ideia de se analisar simultaneamente possíveis marcadores nos permitiu explorar o seu papel na patogênese da SPE.

2.1.5.1 Os sujeitos do estudo: anamnese e exame físico materno

A média da idade materna não variou entre os grupos, ainda que as pacientes não tenham sido intencionalmente emparelhadas para tal.

Em relação ao tipo racial, sabe-se que a raça negra é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010), e o mesmo aplica-se à pré-eclâmpsia (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000) o que não foi comprovado na nossa amostra. No entanto, na região Sul do Brasil, 77,8% dos habitantes declaram-se brancos, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2011), possível influência para a nossa amostra. Pacientes primigestas apresentam maior risco de desenvolver a SPE (SIBAI, DEKKER e KUPFERMINC, 2005), mas, apesar de pouco mais de 50% das nossas pré-eclâmplicas serem primigestas, não houve diferença entre os grupos. Outro fator considerado de risco para SPE é a história familiar de HAS (DEKKER e SIBAI, 2001; SIBAI, DEKKER e KUPFERMINC, 2005), que, apesar de estar presente em quase 50% das GN, no grupo PE correspondeu a mais de 80% dos casos.

O Programa de Humanização no Pré-natal e Nascimento instituiu seis consultas de pré-natal como um número mínimo; logo, ambos os grupos apresentaram valores de média acima do esperado (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2006), o que é extremamente importante, visto que, segundo os dados do IBGE, apenas 46% na média nacional das gestantes realizam mais de sete consultas durante a gravidez.

Chama a atenção a porcentagem de pacientes tabagistas (13,6% do total), não havendo diferença entre os grupos. Vale lembrar que o fumo é considerado um fator protetor para PE

(SIBAI, DEKKER e KUPFERMINC, 2005), ainda que o número de gestantes fumantes, mesmo que pequeno, ter sido maior nas normotensas.

Em PE, a percentagem de relatos de história de HC e SPE prévia foram semelhantes – aproximadamente $\frac{1}{4}$ das pacientes, sugerindo uma associação entre essas duas variáveis, visto que a HC é forte fator de risco para a SPE (SIBAI, DEKKER e KUPFERMINC, 2005).

A idade gestacional das pacientes no parto variou consideravelmente entre os grupos. Isso corresponde aos achados do dia a dia obstétrico quando se trata da patologia em estudo; no entanto, eventualmente podem levar a um erro estatístico em pesquisa. Dessa forma, para evitar um possível viés no estudo, buscamos corrigi-la através do teste de ANCOVA ajustado para IG na análise das citocinas.

Com o objetivo de avaliar o fator obesidade, visto sua influência em processos inflamatórios e danos no endotélio vascular, assim como por ser um fator de risco para o desenvolvimento de DHG (CONDE-AGUDELO e BELIZAN, 2000), optamos pela análise detalhada do peso e do IMC dessas pacientes. A Diferença dos pesos e dos IMCs apresentaram diferença estatística entre os grupos, não observada quando comparados os pesos e os IMC, separadamente. Esse aumento de peso nas pacientes com SPE é considerado parte de sua fisiopatologia, em virtude do edema, antigamente parte do diagnóstico dessa síndrome (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000). É interessante observar que, tanto no grupo controle quanto na SPE, as pacientes partem em média de uma condição de peso normal/sobrepeso para uma condição de obesidade grau I, com variação de peso superior àquela esperada segundo o *Institute of Medicine*:

“IMC adequado devem ganhar 1,6 kg no primeiro trimestre e 0,4 kg/semana nos segundo e terceiro trimestres...sobrepeso devem ganhar até 0,9 kg no primeiro trimestre e gestantes obesas não necessitam ganhar peso no primeiro trimestre. Já no segundo e terceiro trimestre as gestantes com sobrepeso e obesas devem ganhar até 0,3 kg/semana e 0,2 kg/semana, respectivamente”(RASMUSSEN, 2009).

O IMC, por não avaliar o teor de gordura corporal, é um método pobre para avaliarem-se graus de obesidade. Dessa forma, Atalah e Colaboradores, assim como o Ministério da Saúde e a OMS (ATALAH *et al.*, 1997; 2000; BRASIL, 2004), elaboraram uma escala de IMC aplicada a gestantes conforme a IG (Tabela 2). A comparação entre as estratificações de IMC e os grupos de SPE e GN não apresentou diferença estatística, mas mostrou que, no final da gestação, mais de 40% das pacientes com SPE apresentavam-se obesas. Os níveis pressóricos foram diferentes e assim esperados, pois são compatíveis com o diagnóstico da

DHG, sendo critério de seleção dos grupos (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000). Mesmo havendo quatro pacientes com mais de 18 horas de bolsa rota no grupo com SPE, não houve diferença estatística entre os grupos; dessa forma, não acreditamos que isso possa ter influenciado os nossos dados.

2.1.5.2 Os dados do parto: parâmetros maternos e fetais

O número de partos cesáreos foi significativamente maior em paciente com SPE em relação aos controles, fato naturalmente explicado pela gravidade desses casos, que muitas vezes precisam ser levados à cesariana de urgência. Salientamos aqui que a incidência de partos cesáreos no Brasil representa um dos maiores índices do mundo, chegando a cerca de 36% dos nascimentos (HOPKINS, 2000).

Optou-se por caracterizar o uso de fórcepe e de episiotomia mais como uma forma de caracterizar a amostra do que comparar propriamente os grupos, encontrando que em quase 60% das pacientes com SPE realizou-se a episiotomia. Esse dado não parece ter associação direta com a SPE, e outros motivos devem ter levado a tal achado.

O sexo do RN também não apresentou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, há estudos que mostram associação entre RN masculinos e disfunções placentárias, incluindo a SPE (MURJI *et al.*, 2012); já outros apresentaram associação de SPE ao sexo feminino em RN pré-termos e ao masculino nos pós-termos (KHALIL e ALZABRA, 2013).

O Índice ou Escala de Apgar é útil como parâmetro para avaliar as condições do RN e orientar medidas, quando necessárias. Os sinais avaliados são a frequência cardíaca, a respiração, o tônus muscular, a irritabilidade reflexa e a cor da pele, que juntos somam no mínimo zero e no máximo dez (APGAR, 1953). Na nossa amostra, o Índice Apgar, tanto no primeiro quanto no quinto minuto, mostrou-se significativamente diminuído em SPE, o que corresponde aos achados da literatura, visto que pacientes com SPE possuem um risco aumentado de morbidades neonatais (VINNARS *et al.*, 2013). Assim como a IG materna, a IGP e o peso fetal também apresentaram média menor em pacientes com SPE, provavelmente devido à tendência de interrupção precoce da gestação observada nessa patologia ou aos distúrbios nutricionais fetais relacionados à disfunção placentária, acarretando um importante papel no baixo peso dos RN, assim como no peso da placenta (HENTSCHKE *et al.*, 2013; KADYROV *et al.*, 2013), que, mesmo inferior, não mostrou significância entre os grupos. Uma explicação para esse último dado seria de que, em nossa amostra, a maioria das pacientes

com SPE não foi classificada como grave, o que poderia levar ainda mais ao comprometimento placentário (VINNARS *et al.*, 2013).

Não observamos diferença entre o percentil fetal, o que sugere uma amostra homogênea em relação aos RNs, em que mais de 75% de ambos os grupos foram adequados para a IG (AIG), mesmo que na SPE os parâmetros fetais vistos no Índice de Apgar estivessem alterados – provável alteração leve. Não avaliamos CIUR; no entanto, sabe-se que em pacientes com SPE existe essa tendência (FREITAS, 2011).

2.1.5.3 Exames laboratoriais em gestantes normais e com pré-eclâmpsia

Observou-se um aumento de hemoglobinas em pacientes com SPE. Uma das explicações para esse fato pode ser a discreta hemoconcentração apresentada pelo hematócrito, que por sua vez está de acordo com o edema muito frequente em pacientes com SPE. Deste modo sugere-se que, na medida do possível, o edema seja uma variável avaliada em estudos que comparem gestantes normotensas e hipertensas, fato que diminuiu relevância desde que os critérios diagnósticos de SPE excluam a ocorrência de edema (NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000). O aumento de hemoglobina na SPE pode ainda ter relevância na fisiopatologia desse distúrbio hipertensivo, pois a hemoglobina pode determinar maior degradação (consumo) do óxido nítrico (NO) e menor biodisponibilidade de NO, visto na SPE (SANDRIM *et al.*, 2010).

A tipagem sanguínea ABO e Rh também não foi diferente entre os grupos. Há achados controversos entre duas meta-análises prévias – em 2008, que não mostrou associação entre os grupos (CLARK e WU, 2008), e em 2013, que questionou a influência do grupo AB na SPE (ALPOIM *et al.*, 2013). No HSL/PUCRS, um estudo realizado pelo nosso grupo avaliou 410 pacientes com SPE/eclâmpsia e 8.781 gestantes normais, não observando associação do ABO/Rh com a SPE ($p > 0,05$) (HENTSCHKE *et al.*, 2014). (Ver Apêndice I, Artigo 7).

2.1.5.4 As moléculas em estudo

Concentrações aumentadas de mediadores celulares talvez possam explicar a má placentação e a disfunção endotelial descrita na SPE. No nosso trabalho, os níveis de algumas das citocinas inflamatórias analisadas mostram-se significativamente aumentadas, principalmente quando estratificamos o grupo de SPE para fatores de gravidade, o que foi visto também em um estudo prévio (MADAZLI *et al.*, 2003).

A quimiocina MCP-1

A molécula MCP-1, membro da família de quimiocina CC, já identificada em tecidos gestacionais, como decídua, miométrio, tecido fetal incluindo o córion e a placenta (DENISON *et al.*, 1998), tem como principal função recrutar monócitos e outros leucócitos para os locais de inflamação. Visto que mediadores inflamatórios parecem desempenhar um papel crucial no parto, MCP-1 mostrou-se envolvido no início e na propagação do trabalho de parto (ESPLIN *et al.*, 2005); da mesma forma, o aumento dessa molécula em líquido amniótico o sugere como preditor de parto pré-termo (ESPLIN *et al.*, 2005). Um estudo prévio analisou no plasma materno e em cultura de células endoteliais da veia umbilical o MCP-1 e o comparou entre gestantes normais e com PE grave, mostrando um nível aumentado de MCP-1 em PE em ambas as amostras (KAUMA *et al.*, 2002). No presente estudo, níveis circulantes tanto em plasmas quanto na placenta foram muito semelhantes entre os dois grupos, com exceção de níveis aumentados de MCP-1 em plasma fetal de prematuros. Ainda, observou-se que, quanto maiores os níveis de MCP-1 em plasma fetal, menores foram a IG, o peso fetal e o peso placentário, sugerindo novamente a hipótese do envolvimento do MCP-1 com o trabalho de parto pré-termo, e não propriamente com a SPE.

Embora MCP-1 tenha sido inicialmente se caracterizado como um produto de monócitos ativados, ele foi subsequentemente identificado numa variedade de tipos de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, fibroplastos e células musculares lisas. A expressão de MCP-1 é super-regulada por diversos mediadores inflamatórios, tais como TNF α , IL-1 β e INF γ (ESPLIN *et al.*, 2005). Observamos na amostra de placenta, tanto no grupo total quanto no SPE, uma correlação direta forte entre MCP-1 e TNF α , mostrandoa possível regulação dessa molécula sobre a MCP-1. Uma correlação direta muito forte, no grupo SPE, no plasma fetal entre a MCP-1 e a Endocan-1, ambas reguladas por TNF α , pressupondo uma interação na sinalização da matriz extracelular com a cascata inflamatória também no cordão umbilical. Por fim, houve uma correlação direta moderada

entre o plasma fetal e materno, no grupo GN, mostrando a interação do binômio, visto também adiante em outras citocinas.

A citocina inflamatória LIGHT – molécula da família TNF

Estudos recentes têm implicado o papel do LIGHT na imunidade inata e em doenças inflamatórias. No entanto, os seus mecanismos celulares e moleculares através dos quais o LIGHT atua permanecem indefinidos. Acredita-se que o receptor de LIGHT (TNFRSF14) possa estar envolvido na aterosclerose através da indução de metaloproteinases (MMP-9) e IL-8 (LEE *et al.*, 2001). Um estudo recente apresentou níveis circulantes e placentários aumentados de LIGHT em pacientes com PE (WANG *et al.*, 2013). Em nosso estudo, o LIGHT não foi significativo na comparação entre grupos em nenhuma das amostras, estando os únicos achados positivos em correlação forte direta entre níveis de LIGHT e IG e peso do RN em tecido placentário, no grupo de SPE e moderada indireta no plasma materno de GN, em relação ao peso materno e IMC. Ainda, no plasma fetal, com a PAS, no grupo SPE. Correlações difíceis de serem enquadradas dentro de um padrão de citocina inflamatória, podendo possivelmente ter ocorrido ao acaso. Por fim, cabe, no entanto, ressaltar uma correlação forte direta encontrada em relação ao tecido placentário entre a IL-6 e a LIGHT na SPE, achado que nos remete novamente ao circuito inflamatório de uma placenta pré-eclâmpica.

O fator de crescimento neural – NGF

A descoberta da molécula de NGF deu à cientista italiana Rita Levi-Montalcini o Prêmio Nobel de Medicina ou Fisiologia, em 1986. A NGF atua no crescimento e na diferenciação de neurônios, promovendo o reparo e a recuperação funcional de nervos lesados. Estudos recentes têm demonstrado que o NGF tem um papel importante como um regulador angiogênico (PARK *et al.*, 2007), estando diminuído em plasma materno de pacientes com PE e não apresentando diferença quando analisado no plasma fetal (KILARI *et al.*, 2011). Não encontramos associação entre o grupo GN e SPE, mesmo quando esse último for estratificado. Uma correlação direta entre NGF no plasma materno e o peso inicial e final da gravidez foi observada em pacientes com SPE, associada a uma correlação moderada direta entre plasma materno e fetal no grupo total e forte nas GN, sugerindo novamente uma possível relação mãe-feto no que diz respeito a esse fator de crescimento.

TNF α e a IL-6: citocinas pró-inflamatórias de ampla importância

Citocinas inflamatórias como o TNF α (SERIN *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2013) e a IL-6 (GADONSKI *et al.*, 2006; XIAO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013) já foram associadas à SPE em estudos prévios. Na nossa amostra materna, observa-se que o TNF α está quase 30 % mais elevado em pacientes com SPE em relação às gestantes controles, diferença que não é observada na dosagem de IL-6 materna. No entanto, foi visto que o nível de IL-6 foi 48 % menor em plasma fetal de pacientes com SPE. Questiona-se aqui novamente o papel da IL-6 na SPE. Um trabalho publicado em 2011 que analisou IL-6 no soro materno, fetal e no tecido placentário de gestantes com SPE não encontrou associação da citocina com a patologia (AL-OTHMAN *et al.*, 2001); no entanto, em outros estudos, a IL-6 mostrou estar associada à exacerbação inflamatória gestacional, até mesmo em modelo experimental (GADONSKI *et al.*, 2006). O fato é que os dados são controversos e muitos vieses de seleção e aferição podem existir nos estudos em voga; contudo, parece haver algo de sólido naqueles estudos que enxergam a placenta como um escudo fetal, o protegendo da cascata inflamatória que ocorre ‘do outro lado’. Os sistemas imunológicos materno e fetal coexistem ajustados para detectar e rejeitar invasões estrangeiras e conseguir uma relação simbiótica. Vários mecanismos são sugeridos para entender a tolerância imunológica do feto, sendo um deles a redução inespecífica de imunorreatividade sistêmica (GAUNT e RAMIN, 2001; ARCK e HECHER, 2013). Logo, nossos achados concordam com aqueles que sugerem exacerbação inflamatória na SPE à custa de citocinas pró-inflamatórias, vistas nesse caso pelo aumento de TNF α , assim como com a teoria de proteção fetal, vista nos níveis baixos de IL-6 no feto.

Com a estratificação da amostra, percebeu-se que o TNF α seguiu o mesmo padrão anterior no plasma materno acrescido de uma significância estatística agora também placentária. Primeiramente observa-se que o TNF α comporta-se de forma diferente em placentas de SPE precoce (IG<34 semanas), estando 68% menor em IG<34 em relação a gestantes normais e 234 % maior em placentas com IG \geq 34 em comparação a IG<34. De forma muito semelhante, ocorre um aumento de 77% no TNF α em placentas de mães com níveis de proteinúria não graves entre 0,3 e 2,0 em relação àquelas com níveis maiores de 2,0, relação não vista em relação à SPE vs. GN.

Em relação à IL-6, com a estratificação dos casos de SPE, outras quatro subdivisões em plasma fetal mostraram-se diferentes entre os grupos: estratificação pelo corte de proteinúria tanto de 0,5 quanto de 2,0 em que o nível de IL-6 das pacientes com SPE foi menor do que nas gestantes normais em ambos os casos, assim como, ao se excluir gestantes com PES e HELLP da amostra, a IL-6 foi 43 % menor em PE pura em relação às GNs. A

estratificação quanto ao nível de proteinúria em 0,5 também veio a ser significativa em plasma materno, nesse caso indo de encontro à literatura ao sugerir menor concentração de IL-6 em SPE (com P/C < 0,5) em relação às GNs. Em tecido placentário, a significância foi vista em relação aos níveis de PAS, mostrando um aumento de IL-6 em gestantes com SPE com PAS<160 (entre 140-160 mmHg) em relação às PAS>160 mmHg, novamente indicando não haver associação dos níveis de IL-6 com a gravidade da doença.

O TNF α e a IL-6 apresentaram uma correlação positiva baixa entre plasma fetal e placenta, sendo a IL-6 também positivamente moderada entre plasma materno e placenta no grupo total. Por fim, a IL-6 esteve correlacionada positivamente em placenta no grupo SPE tanto com o LIGHT quanto com TNF α , indicando uma possível interação entre essas moléculas na sinalização celular placentária.

Endocan-1: novo biomarcador para pré-eclâmpsia?

A Endocan-1 é uma proteoglicana (proteína da matriz extracelular) especificamente expressa nas células endoteliais, previamente chamada de *endothelial cell-specific molecule 1* (ESM-1), cuja clonagem a partir de cultura de células endoteliais humanas extraídas da veia umbilical (HUVEC – *human umbilical vein endothelial cell*) foi pioneiramente descrita em 1996 em tecido vascular pulmonar (LASSALLE *et al.*, 1996). Essa molécula tem sido estudada tanto em modelos experimentais (DEPONTIEU *et al.*, 2012) quanto *in vivo*. Um estudo piloto relacionou níveis séricos de Endocan-1 com HAS, mostrando correlação positiva entre Endocan-1 e a espessura da carótida interna, assim como com proteína C-reativa, sugerindo a Endocan-1 como um novo marcador imunoinflamatório associado com fatores de risco cardiometabólicos, incluindo a hipertensão essencial (BALTA *et al.*, 2014), exercendo um papel funcional nas patologias dependentes do endotélio (BECHARD *et al.*, 2000). Estudos têm também investigado a relação do Endocan-1 com outras citocinas, como sua possível regulação pelo TNF α e IL-1 β , e o possível efeito inibitório decorrente do IFN γ sobre a expressão genética de Endocan-1 quando essa for induzida por TNF α (LASSALLE *et al.*, 1996; BECHARD *et al.*, 2000). Sugere-se, assim, que o gene de Endocan-1 possa apresentar funções não usuais durante a reação inflamatória, sendo regulada por diversas citocinas e na presença de moléculas pró-angiogênicas, como VEGF, que são mediadores envolvidos na angiogênese, linfangiogênese e progressão tumoral (LASSALLE *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2012).

Para o nosso conhecimento, não há na literatura artigos completos publicados que tenham relacionado níveis de Endocan-1 com a SPE ou com outra DHG. No entanto, em

2013, dois artigos resumidos foram publicados em anais de congressos apresentando a possível associação de níveis proteicos e expressão de RNAm de Endocan-1 em gestantes com SPE, em sangue materno, ambos tendo como hipótese de que essa molécula estaria elevada na SPE (CROSS *et al.*, 2013; JOOST *et al.*, 2013). Esses achados são semelhantes ao encontrado no presente estudo, visto que os níveis de Endocan-1 foram significativamente aumentados em plasma materno de pacientes com SPE (chegando a ser quase 50 % maior), o que sugere uma magnitude de associação moderada. Além disso, todas as estratificações de SPE foram significativas no plasma materno, mostrando a importância do Endocan-1 durante todo o terceiro trimestre da gestação, independentemente da idade gestacional e da gravidade da doença. No que diz respeito à estratificação por PES e SPE, a diferença estatística se deve à diferença entre SPE e GN, não parecendo estar relacionada com PES. Em contrapartida, em relação às variáveis clínicas, observou-se que, quanto maiores os níveis de Endocan-1 em plasma materno e fetal, menores os pesos do feto e da placenta, e menor a IG materna no nascimento, mostrando uma correlação leve a moderada de níveis plasmáticos maternos e fetais de Endocan-1 com prematuridade e baixo peso. Em relação aos níveis pressóricos maternos, à medida que os níveis de Endocan-1 aumentam no plasma materno, tende-se a um aumento da PAS e da PAD no final da gestação. Esse conjunto de achados nos remete a pensar na Endocan-1 como presente em casos mais graves de PE. Curiosamente, não foi observado nenhum tipo de associação entre características maternas e fetais com valores de Endocan-1 no tecido placentário e nem mesmo dessa amostra em relação aos plasmas. Entretanto, uma correlação positiva baixa entre o plasma materno e o plasma fetal no grupo total foi observada, sugerindo uma correspondência entre essas duas amostras. Por fim, por ser uma citocina que revela uma ativação endotelial e ter sido apresentada com valores aumentados na SPE, concordamos com estudos prévios que sugerem a importância dessa molécula em patologias que apresentam dano vascular, como a SPE.

O fator de crescimento placentário e a gravidade da síndrome de pré-eclâmpsia

O PIGF é um fator angiogênico, um marcador de disfunção placentário que tem sido estudado associado à SPE (KRAUSS, PAUER e AUGUSTIN, 2004), se apresentado em baixas concentrações plasmáticas nessa desordem gestacional (GHOSH *et al.*, 2012; CHAPPELL *et al.*, 2013), sendo estudado como um biomarcador preditor de risco de desenvolver a SPE (GHOSH *et al.*, 2012; CHAPPELL *et al.*, 2013).

Na nossa análise, o PIGF inicialmente não se mostrou diminuído em pacientes com SPE, como previsto. No entanto, quando excluímos as pacientes com PES e síndrome HELLP do grupo de SPE, observamos que o PIGF na PE pura esteve aproximadamente 60% menor em relação ao grupo controle, assim como apresentou-se extremamente baixo na SPE precoce (IG<34 semanas), o que confirma os dados da literatura e nos remete a uma associação do PIGF com a precocidade da SPE.

Ainda, de forma interessante e inovadora, quando o grupo SPE foi subdividido por níveis de proteinúria com ponto de corte 0,5, vimos que aquelas pacientes com proteinúria entre 0,3-0,5 apresentaram-se de forma semelhante às gestantes normais, com níveis aumentados de PIGF em relação àquelas com P/C maior ou igual a 0,5. A estratificação dos níveis de proteinúria tem sido questionada como marcador de gravidade para SPE. Além disso, um estudo recente apontou que níveis de proteinúria entre 0,3-0,5 e acima de 0,5 possam ter repercussões clínicas distintas (BRAMHAM *et al.*, 2013), sugerindo que talvez o ponto de corte, ou a consideração de gravidade para SPE, não deva ser de 2,0 g de proteinúria, como se apresenta em *guidelines*.

Com a análise de correlações, foi observado que, quanto maior o peso do recém-nascido e da placenta, maior o nível de PIGF. Isso faz sentido, visto que o PIGF é um fator de crescimento placentário, e a placenta tem papel crucial na nutrição fetal.

Uma moderada correlação existente entre o plasma materno e a placenta em relação ao PIGF, não observada quando analisado em separado o GN, mostra que, além da presença dessa molécula em pacientes com SPE, ela está correlacionada entre os conjuntos celulares da gestação, o que prova mais ainda a importância de se estudar os três conjuntos de forma concomitante.

Por fim, observou-se correlações fortes entre o Endocan-1 materno e PIGF materno, o Endocan-1fetal e o TNF α fetal, TNF α placenta e MCP-1 placenta, e ainda Leptina placenta com PIGF materno, sendo as correlações com PIGF todas inversas, ou seja, quanto maior o

Endocan-1 materno e a Leptina placentária, menor o PlGF materno, em ambos os grupos (GN e SPE) (Figura 8).

As citocinas e as amostras estudadas: correlação de plasmas com a placenta

Ao correlacionarmos as dosagens das citocinas entre plasma materno, plasma fetal e a placenta, pretendeu-se compreender como se comportam as citocinas nessas três amostras, avaliando possíveis causas e efeitos decorrentes da sinalização celular norteadas por cada uma dessas moléculas, no conjunto total das pacientes e nos grupos separadamente.

Das 72 correlações realizadas entre as amostras (plasma materno, plasma fetal e placenta), 17 (23,6%) apresentaram significância estatística, sendo seis fracas, dez moderadas e apenas uma forte. Como uma regra geral, todas as correlações foram positivas, mostrando que, à medida que ocorre um aumento ou uma diminuição da citocina no plasma materno, sinalizações do mesmo cunho fisiológico são passadas para a placenta e para o feto, e vice-versa. A hipótese de aumento das citocinas inflamatórias em plasma materno e placenta e diminuição em plasma fetal mantém-se, visto que a correlação diretamente proporcional pode existir mesmo que os níveis de citocinas se alterem de forma diferente entre as amostras. Ou seja, as citocinas variam proporcionalmente, mas sempre estando menor no feto em relação à mãe e, possivelmente, à placenta.

2.1.6 Conclusão

A relevância deste estudo está ligada tanto à importância clínica de se ter um biomarcador para PE quanto no cunho fisiopatológico, trazendo entendimento funcional das moléculas envolvidas na DHG e suas possíveis influências como mediadores celulares na etiologia dessa doença.

Diferentemente da maioria de estudos prévios em que as citocinas foram analisadas em plasma ou soro materno, fetal e placentário em separado, nós analisamos as citocinas em três amostras: plasma materno, plasma fetal e placenta, oriundas da mesma paciente. A escolha em associá-las dessa forma parte da ideia de a implantação do blastocisto, formação da placentária e suas conseqüentes isquemias serem a fonte desencadeadora da cascata inflamatória, com repercussões tanto maternas quanto fetais. Sua vida útil de nove meses e seu estado anatomopatológico, com presença de fibroses e tecidos isquêmicos, nos remete a pensar na placenta como um processo tumoral de consumo em relação ao endotélio materno, mas com grande processo apoptótico na tentativa de regeneração celular para a proteção fetal. Sendo assim, a placenta é um órgão emblemático em que se pode estudar em um curto período de tempo a evolução de lesões vasculares, isquemias teciduais e a regeneração celular.

2.1.6.1 Considerações finais

Após a análise dos dados, foi observada uma interessante relação da molécula Endocan-1 e Leptina com a PE. Dessa forma, optamos por dar um enfoque primeiramente a essas moléculas, visto sua importância no tecido endotelial e seu pouco conhecimento aplicado à doença hipertensiva gestacional, considerando que essas moléculas poderiam ser um marcador de SPE no terceiro trimestre da gestação. Dessa forma, priorizamos a elaboração desses dois artigos, sendo o relacionado à Leptina parte integrante da dissertação de mestrado da Dra. Adriana Comparsi (Apêndice I, Artigo 8 – Endocan-1; Apêndice J, Artigo 3 – Leptina).

As citocinas inflamatórias TNF α , IL-6, LIGHT e MCP-1 estão sendo planejadas para serem apresentadas concomitantemente em um mesmo artigo ainda não concluído. Também em outro artigo planejamos dar enfoque à molécula de PlGF, visto sua importância na PE como biomarcador, atualmente. Constatada a correlação entre PlGF e Endocan-1, assim como PlGF e Leptina, pretendemos dar continuidade às análises, considerando a razão entre as moléculas e a sua magnitude de associação. Da mesma forma, pretendemos dar enfoque aos achados de PlGF em relação aos níveis de proteinúria, visto isso ser algo ainda não trabalhado, mas considerado de extrema importância pelos pesquisadores do nosso grupo.

Bloco 2

Projeto A: Lipoproteínas e a pré-eclâmpsia

Projeto B: Proteínas das cavéolas e a pré-eclâmpsia

Projeto A

Lipoproteínas e a pré-eclâmpsia

2.2 BLOCO 2: PROJETO A: LIPOPROTEÍNAS E A PRÉ-ECLÂMPسيا E PROJETO B: PROTEÍNAS DAS CAVÉOLAS E A PRÉ-ECLÂMPسيا

2.2.1 Projeto A: Lipoproteínas e a pré-eclâmpسيا

2.2.1.1 Lipídios, lipoproteínas e a gestação

No início da gravidez, há um aumento no acúmulo de gordura corporal, associado tanto à hiperfagia quanto ao aumento da lipogênese. Posteriormente, há uma degradação acelerada de depósitos de gordura materna, que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento fetal (HERRERA, 2002), resultando numa situação fisiológica chamada de hiperlipidemia gestacional (KNOPP *et al.*, 1986; HERRERA, 2002; HERRERA *et al.*, 2006; DESOYE, GAUSTER e WADSACK, 2011). Essa condição é observada a partir da décima primeira semana de gestação, quando fosfolipídios, colesterol total (CT), LDL, HDL e TG aumentam em resposta à estimulação estrogênica e à resistência insulínica (CT: aumento de aproximadamente 25-50%; e TG: aumento de aproximadamente 300%) (DESOYE *et al.*, 1987; HERRERA, 2002; GHIO *et al.*, 2011; EMET *et al.*, 2013). Os níveis de lipídios também são afetados pelo aumento da progesterona e do hLP – hormônio produzido na placenta com função de crescimento, lactação e produção de esteroides lúteos, além de ser um antagonista da insulina (ALVAREZ *et al.*, 1996). No entanto, embora o colesterol materno seja uma fonte importante para o feto durante o início da gestação, sua importância torna-se mínima durante a fase final da gravidez, devido à elevada capacidade de tecidos fetais em sintetizar o colesterol.

Sabe-se que a hiperlipidemia maternal pode contribuir positivamente para o crescimento e o desenvolvimento fetal (GHIO *et al.*, 2011). É possível que em gestações complicadas com acúmulo excessivo (DM) ou reduzido (CIUR) de gordura fetal ocorram distúrbios do metabolismo lipoproteico materno na tentativa de compensar possíveis distúrbios fetais (DESOYE, GAUSTER e WADSACK, 2011). Ainda, acredita-se que a maior concentração de TG durante a gestação tenha relação com maior risco de desenvolver PE (POTTER e NESTEL, 1979; Ray, Diamond *et al.* 2006), prematuridade e CIUR (GHIO *et al.*, 2011; PECKS *et al.*, 2012). Outros fatores, como o IMC, o ganho de peso materno, a nutrição materna, os níveis lipídicos pré-gravídicos e as várias complicações patológicas gestacionais,

também podem alterar os níveis de lipídios e de lipoproteínas no plasma materno (ALVAZES *et al.*, 1996). Em uma revisão de 22 estudos, Ray e colaboradores (RAY *et al.*, 2006) relataram que mulheres com elevado TG tinham o dobro do risco de desenvolver PE, sendo que em quatro desses estudos – aqueles ajustados para fatores de confusão (idade materna, IMC e paridade) – o risco apresentado foi quatro vezes maior em comparação às mulheres com TG normais. Um aumento dos TG e LDL podem contribuir com o estresse oxidativo e com a disfunção endotelial observada em pacientes com PE, o que foi observado também em um estudo brasileiro que apresentou maiores concentrações de VLDL e de triglicérides em pacientes com PE (LIMA, *et al.*, 2011).

Assim, ficamos com as questões: Seriam os lipídios que estariam associados à PE, ou seriam fatores de risco associados à PE os responsáveis pelo aumento dos lipídios? Estariam os lipídios associados ao crescimento fetal, ou estariam contribuindo de forma negativa para uma dislipidemia já intraútero? Para tentar responder a essas outras perguntas relacionadas ao metabolismo lipídico é que esse projeto foi realizado. Inicialmente, farei uma revisão da literatura para depois partir propriamente para o cerne deste estudo.

2.2.1.2 Introdução – lipoproteínas e a gestação

2.2.1.2.1 Metabolismo lipídico

Os lipídios são ésteres que por hidrólise fornecem ácidos carboxílicos superiores (AG), sendo biomoléculas, compostas por carbono, hidrogênio e oxigênio, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídios biologicamente mais relevantes são os AG, TG, os fosfolipídios e o colesterol (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013), sendo que os fosfolipídios formam a estrutura básica das membranas celulares. O colesterol é precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Os TG são formados a partir de três AG ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importantes no organismo, sendo depositados nos tecidos adiposos e musculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

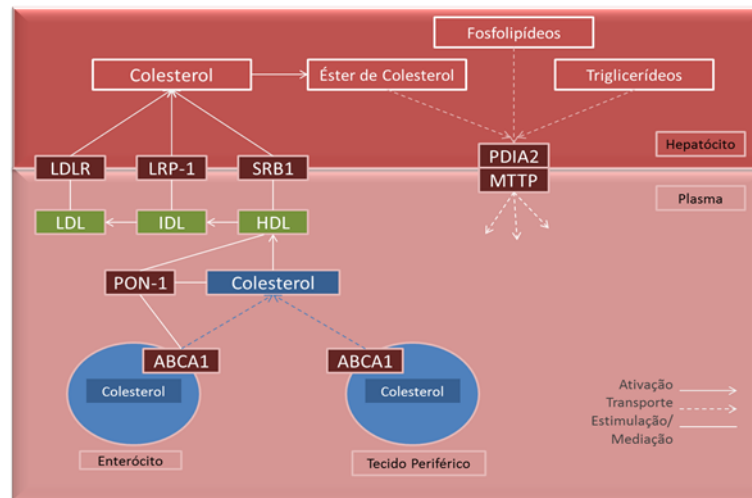
2.2.1.2.2 Lipoproteína – estrutura e função

As lipoproteínas são complexos macromoleculares formados por um conjunto de proteínas (apolipoproteínas [Apo]) e lipídios (colesterol, TG, fosfolipídios) sintetizados no fígado e no intestino delgado que permitem a solubilização e transporte dos mesmos através da corrente sanguínea. As Apo têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas, como a formação intracelular de partículas lipoproteicas, caso da Apo B100 e E, ou cofatores enzimáticos, como as Apo CII, CIII e AI (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Há duas classes de lipoproteínas: uma delas, rica em triglicerídeos, representada pelos quilomícrons (origem intestinal) e VLDL (origem hepática); e outra classe representada pelos HDL e LDL, ricas em colesterol. Existe ainda uma classe de densidade intermediária (IDL) e a lipoproteína (a) [Lp(a)], que resulta da ligação covalente de uma partícula de LDL à Apo (a), associada à progressão da placa aterosclerótica.

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lipídios absorvidos no intestino, originários da dieta e da circulação entero-hepática. O transporte de lipídios de origem hepática ocorre por meio das VLDL, IDL e LDL. Os TG das VLDL, assim como os dos quilomícrons, são hidrolisados pela LLP. Os ácidos graxos são liberados para os tecidos e metabolizados. Por ação das LLP, os quilomícrons e as VLDL, progressivamente depletados de TG, se transformam em remanescentes, também removidos pelo fígado por receptores específicos. Uma parte das VLDL dá origem às IDL, que são removidas rapidamente do plasma, e com a ação da lipase hepática resulta nas LDL. As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação. A HDL transporta o colesterol até o fígado, onde é captado pelos receptores SRB1 (transporte reverso do colesterol). Nesse transporte, é importante a ação do complexo *ATP Binding Cassette A1* (ABCA1), que facilita a extração do colesterol das células pela HDL, como visto na Figura 9.

A partir de uma revisão bibliográfica foram identificados alguns importantes receptores, mediadores e transportadores que participam da rota do colesterol, alguns já estudados e encontrados na placenta humana associados com CIUR e/ou PE, como é o caso de LDL-R, LRP-1, SRB1 e ABCA1, e outros ainda não identificados na placenta.

Figura 9 – Figura ilustrativa da função dos receptores, mediadores e transportadores da rota metabólica do colesterol, no fígado



Fonte: Hentschke (2012). Adaptado de (WIKIPATHWAT, 2012). LDL-R: Receptor de lipoproteína de baixa densidade; LRP-1: Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionada 1; SRB1: Receptor Scavenger classe B tipo 1; PON-1: Paraoxonase 1; ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1; MTP: Subunidade da proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal; PDIA2: Proteína dissulfeto isomerase família A, membro 2.

Abaixo, uma breve descrição sobre a função de cada um desses genes será realizada, visto que os mesmos foram foco da avaliação laboratorial neste projeto.

2.2.1.2.3 Efluxo de colesterol: HDL, SRBI, PON-1 e ABCA1

O efeito protetor do HDL contra o desenvolvimento de aterosclerose é largamente atribuído ao seu papel de fazer o transporte reverso do colesterol para o fígado (CUCHEL e RADER, 2006) – um processo em que o colesterol extra-hepático (periférico) é devolvido para o fígado para excreção na bile e, finalmente, nas fezes (GLOMSET, 1968). Esse efluxo de colesterol é um dos principais mecanismos de proteção aterosclerótica. O processo é mediado pela interação da Apo A1 livre e do HDL com as proteínas de membrana ABCA1, ABCG1 e SRB1, assim como através de outros mecanismos, incluindo difusão passiva (BERROUGUI, LOUED, KHALIL, 2012). O SRB1 é conhecido por seu papel facilitador da captação de ésteres de colesterol de HDL no fígado. Na biossíntese de HDL, a Apo A1 – sintetizada e segregada no fígado e no intestino – é a principal Apo de HDL, necessária para adequado metabolismo do mesmo (CUCHEL e RADER, 2006). A molécula ABCA1 é um dos transportadores de efluxo mais expressos na placenta humana (LANGMANN *et al.*, 1999). Ela facilita o efluxo de colesterol e fosfolípidos para lipídios pobres em Apo A1,

precursor do HDL. O ABCA1 está presente no primeiro trimestre e em placentas a termo, sendo predominantemente localizado na camada basolateral e raramente na camada de células apicais do citotrofoblasto, em placentas do primeiro trimestre. Acredita-se que o ABCA1 é um componente importante na função de transporte feto-placentário (BHATTACHARJEE *et al.*, 2010).

A Paroxonase (PON)1 é um membro de uma família de proteínas que inclui também PON2 e PON3, as quais são sintetizadas principalmente no fígado (COSTA *et al.*, 2005), sendo 95% transferida para as HDL através de um mecanismo mediado pelo SRB1. Ainda, uma porção é secretada para o plasma, onde ele é associado com HDL. Um estudo realizado por Vaiser e colaboradores identificou, utilizando o que eles chamaram de análise *proteômica de espingarda*, 48 famílias distintas de proteínas de HDL significativamente associadas à doença cardiovascular, sendo o PON-1 uma das oito proteínas mais abundantes associadas ao HDL, com potencialidade ateroprotetora (VAISAR *et al.*, 2007). Mais de 160 polimorfismos de PON1 já foram descritos até o momento (COSTA *et al.*, 2005). Os estudos *in vitro* demonstraram que PON1 inibe a peroxidação lipídica de LDL e HDL e pode ser o principal determinante da capacidade anti-inflamatória do HDL além do seu efeito ateroprotetor (JAOUAD, MILOCHEVITC, KHALIL, 2003). A oxidação do HDL é acompanhada por uma redução na atividade da PON1.

2.2.1.2.4 Receptores da família LDL: LDL-R e LRP-1

Membros da família de LDL-R são constitutivamente receptores de reciclagem, isto é, são endocitados estando ou não associados com ligantes. Eles importam diferentes proteínas, lipoproteínas ou complexos de proteína-proteína para células por meio de um processo de endocitose mediada por receptor.

Os membros da família LDL-R são: LDL-R, VLDL-R, ER2, LRP-1, megalina e LR11 (HUSSAIN, STRICKLAND e BAKILLAH, 1999). O LDL-R liga-se com alta afinidade a Apo B100, contendo LDL, e Apo-E, contendo lipoproteínas, como VLDL, IDL e *Beta-migrating* VLDL. Além disso, o LDL-R é abundantemente expresso nos tecidos em que a síntese de hormônios esteroides é realizada. A LRP-1 está envolvida no catabolismo de várias proteínas não relacionadas estruturalmente: proteinases, complexos inibidores de proteinase e complexos de proteína-lipídio (HUSSAIN, STRICKLAND e BAKILLAH, 1999).

2.2.1.2.5 MTTP e PDIA2

A MTTP é a maior subunidade da proteína de transferência de triglicerídeo microsomal, sendo uma proteína expressa exclusivamente no fígado e no intestino, desempenhando um papel importante na produção de lipoproteínas contendo Apo-B. Em células em que é possível sintetizar Apo-B, MTTP consegue transferir colesterol livre para as lipoproteínas, evitando o excesso de colesterol livre acumulado na membrana do retículo endoplasmático. No fígado e no intestino, ésteres de colesterol são transferidos para Apo-B, sendo sintetizados por MTTP para futura secreção. Portanto, se há inibição/deficiência de MTTP, é esperado um aumento celular de ésteres de colesterol (HUSSAIN *et al.*, 2012).

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) modula funcionalmente o complexo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase, o principal gerador de espécies reativas de oxigênio em células vasculares (WILKINSON e GILBERT, 2004). A enzima é residente no retículo endoplasmático de células eucarióticas (GRUBER *et al.*, 2006). Além da sua função como catalisador de redox, PDI atua como uma chaperona, evitando a agregação da proteína e/ou retendo proteínas no retículo endoplasmático, contornando assim a sua degradação (VAN ANKEN e BRAAKMAN, 2005).

2.2.1.2.6 Lipídios e a placenta humana

2.2.1.2.6.1 Princípios de transferência placentária e transporte de lipídios

A placenta é praticamente impermeável aos lipídios, exceto aos AGL e aos corpos cetônicos. Assim, a transferência de lipídios através da placenta é complexa, dependente de lipases, receptores de lipoproteínas, receptores de membrana e proteínas ligadoras de ácidos graxos citosólicos (JONES, POWELL e JANSSON, 2007). Há o envolvimento de uma variedade de moléculas presentes na superfície do sinciotrofoblasto, que interagem com outras moléculas intracelulares localizadas em compartimentos diferentes na placenta (DESOYE, GAUSTER e WADSACK, 2011).

Atualmente, entretanto, nem todas as moléculas e processos envolvidos na transferência de lipídios transplacentária foram identificados.

2.2.1.2.6.2 Triglicerídeos e ácidos graxos

Os AGs são os lípidios essenciais para o acréscimo de gordura fetal. Para a maior parte dos AG existe um gradiente de concentração materno-fetal que os permite atravessar a placenta por difusão simples (DESOYE e SHAFRIR, 1994). Assim, TG e lipoproteínas são hidrolisados por lípases placentárias, em particular a LLP, localizada na MMV (LINDEGAARD *et al.*, 2005); como resultado, AGL são liberados, atravessando a membrana plasmática por difusão (HERRERA *et al.*, 2006). A absorção de ácidos graxos de cadeia longa – não esterificados – parece ocorrer através de um transporte mediado por proteína, envolvendo a FABPpm – *fatty acid binding protein*, FAT – *fatty acid translocase* e a FATP – *fatty acid transport protein* (DUTTA-ROY 2000).

Acredita-se que possa haver um envolvimento importante entre membros do gene da lipase de triglicéridos (LTG), como LLP e lipase endotelial (LE) com CIUR. Em análises quantitativas, avaliando a expressão de RNAm de membros da LTG, verificou-se uma diminuição significativa de LE e LLP em placentas de CIUR a termo (TABANO *et al.*, 2006; GAUSTER *et al.*, 2007). Alterações na hidrólise de lípidios lipoproteicos maternos na interface materno-placentária podem acabar com o abastecimento transplacentário de AGL e levar ao CIUR, muitos vezes associados à PE.

2.2.1.2.6.3 Lipoproteínas

Para que as lipoproteínas atravessem a placenta, pelo menos dois mecanismos estão presentes. Primeiro, a lipoproteína HDL se liga ao seu receptor SRB1, presente no sinciotrofoblasto, que está em estreita proximidade com um membro da família LTG. Como resultado, os AG esterificados são hidrolisados e absorvidos por vários transportadores de AG e proteínas transportadoras presentes na superfície do sinciotrofoblasto. Em segundo lugar, as lipoproteínas, tais como LDL e VLDL, se ligam aos receptores da MMV do trofoblasto e são captadas por endocitose, mediadas pelo receptor. Subsequentemente, a endocitose libera os componentes lipoproteicos e as lipases intracelulares hidrolisam os ésteres nos seus constituintes, liberando AG que vão se unir aos AGL (WITTMAACK *et al.*, 1995; DUTTA-ROY, 2000; WADSACK *et al.*, 2003; WOOLLETT, 2005; STEFULJ *et al.*, 2009).

2.2.1.2.6.4 Receptores, mediadores e transportadores de colesterol

A presença de receptores de lipoproteínas na placenta tem sido muito estudada. Wadsack e colaboradores, em 2007, mensuraram o RNAm e níveis proteicos de LDL-R, LRP-1 e SRB1 em placentas de terceiro trimestre de gestações que culminaram com fetos CIUR e compararam com gestações com fetos normais. Primeiramente, eles confirmaram a presença dessas lipoproteínas na placenta, indicando a potencialidade de o tecido fetal captar colesterol a partir de lipoproteínas maternas. Ainda, eles encontraram diferença estatística entre alguns receptores em relação à CIUR e gestação normal, em particular LDL-R e SRB1 – dois receptores que parecem ser chaves para a placenta capturar colesterol a partir do LDL e/ou HDL (WADSACK *et al.*, 2007). Assim como este estudo, outros grupos de pesquisa têm estudado esses receptores em CIUR, visto que alterações nesses receptores de lipoproteínas poderiam ser uma explicação para essa patologia gestacional (WADSACK *et al.*, 2007).

A hipótese do presente estudo foi de que na PE os níveis de receptores, mediadores e transportadores poderiam estar aumentados em relação às gestantes normais. No entanto, se o colesterol é fundamental para o crescimento fetal, e nas pacientes com PE sabe-se que há uma porcentagem importante de fetos FIG, questionamos se esses receptores não estariam diminuídos em pacientes com PE com feto FIG, ou alternativamente aumentados para tentar compensar a nutrição fetal deficiente.

2.2.1.3 Objetivos

Quantificar e comparar a expressão placentária de RNAm dos seguintes genes: LRP-1, LDL-R, SRB1, ABCA1, MTTP, PON-1, PDIA2 em gestantes com e sem PE.

Relacionar a expressão dos genes com a concentração sérica de lipoproteínas maternas e fetais (colesterol total, HDL, LDL e TG) nas gestantes com e sem PE.

Avaliar associação dos resultados com o percentil de crescimento fetal.

2.2.1.4 Metodologia

2.2.1.4.1 Pacientes e critério de seleção

Foram estudadas 51 gestantes, sendo 27 no grupo controle e 24 com diagnóstico de PE. As coletas foram realizadas no *City Hospital, University of Nottingham*, Reino Unido, seguindo aprovação do Comitê de Ética do *City Hospital* e com o consentimento das pacientes. O diagnóstico das pacientes com PE foi extremamente criterioso, seguindo as diretrizes do ISSHP (BROWN *et al.*, 2001). Essas diretrizes definem hipertensão quando duas ou mais medidas de pressão arterial forem ≥ 140 mmHg de PAS e/ou ≥ 90 mmHg de PAD, com proteinúria patológica ≥ 300 mg/24 horas, em gestantes previamente normotensas com 20 ou mais semanas de idade gestacional (BROWN *et al.*, 2000). A população do estudo consistiu somente de pacientes brancas, com o objetivo de excluir diferenças étnicas.

A história médica obstétrica foi obtida de cada participante. O percentil fetal de cada recém-nascido foi computado e corrigido para idade gestacional, gênero, paridade materna e IMC (GARDOSI, 2012). Os neonatos PIG foram definidos quando o percentil fetal foi menor do que dez, e os AIG, quando o percentil ficou entre dez e 90 (CETIN *et al.*, 2004).

Houve perda de uma amostra de cordão umbilical no grupo controle e dez no grupo com PE. Todas as mulheres que fizeram parte do estudo estavam em trabalho de parto e tiveram tanto partos vaginais como cesarianas, dependendo da indicação obstétrica. Todas as amostras foram coletadas, independentemente do grupo, no terceiro trimestre da gestação.

2.2.1.4.2 Coletas de amostras para o estudo

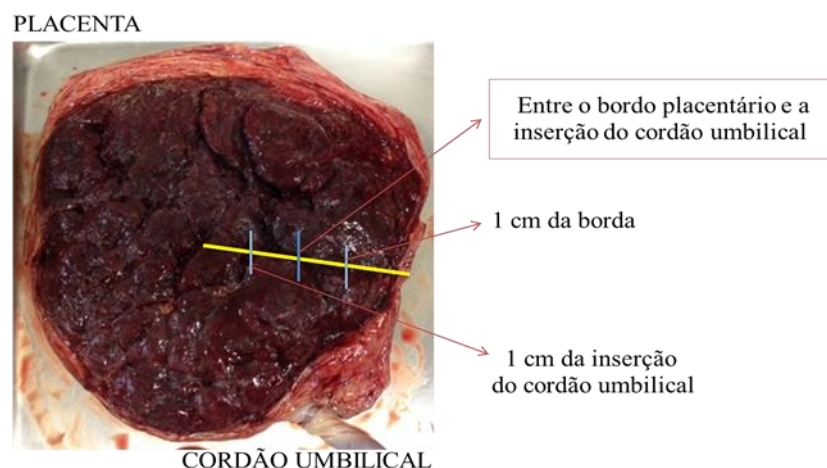
Sangue materno e do cordão umbilical

As amostras de sangue materno foram coletadas das pacientes no termo antes do parto. Já as amostras de sangue do cordão umbilical foram extraídas da veia do cordão, logo após o parto. As amostras foram de 4mL de sangue, armazenadas em tubo padronizado com e sem anticoagulantes para futura extração de plasma e soro sanguíneos.

Coleta de tecido placentário

A coleta de placenta foi realizada em até dez minutos da dequitação da placenta, seguindo o protocolo padrão do estudo. Esse protocolo norteia as biópsias placentárias na linha média entre o cordão umbilical e o bordo placentário, evitando os infartos (Figura 10). Ainda na sala de parto, as amostras foram imediatamente embebidas em tampão de fosfato salino, as membranas foram removidas, o tecido foi secado e armazenado em um tubo universal esterilizado de 30 mL, congelado em nitrogênio líquido e subsequentemente armazenado a -80°C até a análise de RNAm. Uma segunda amostra foi fixada em formalina para análise por imuno-histoquímica.

Figura 10 – Figura representativa do ponto de coleta do tecido placentário



Fonte: Hentschke (2012). A coleta do tecido placentário é realizada no ponto médio da distância entre o bordo placentário e a inserção do cordão umbilical.

2.2.1.4.3 Dosagens das amostras

Sangue materno e do cordão umbilical

No sangue materno e do cordão umbilical, foram dosadas as concentrações de TG, CT, HDL e LDL, usando *MicroSlide™ layers technology on the Vitros Fusion 5.1 Chemistry System* (New York, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 200µl de cada amostra foram distribuídas uniformemente sobre toda a área do slide que continha os reagentes para o ensaio selecionado, permitindo que moléculas maiores fossem quebradas e

penetrassem na camada com reagente. As amostras foram analisadas em triplicata, com a variação interensaio de menos de 5% e a variação intraensaio de menos de 10%. Os resultados foram armazenamento em banco de dados eletrônico para futura análise.

Tecido placentário

No tecido placentário foram analisados os genes LDL-R, LRP-1, ABCA-1, SRB1, PON-1, MTTP, PDIA2, a partir de seus RNAm, e a proteína do receptor LRP-1. Do tecido placentário foi realizada a extração do RNA e a transcrição do RNA em cDNA, assim como processaram-se as amostras previamente em formulina, em blocos de parafina, para posterior análise, conforme descrito a seguir.

2.2.1.4.4 Técnicas utilizadas para análise das amostras

A análise do RNAm foi realizada com a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR), sendo a localização e expressão proteica realizada através da técnica de imuno-histoquímica. As técnicas estão descritas abaixo.

2.2.1.4.4.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

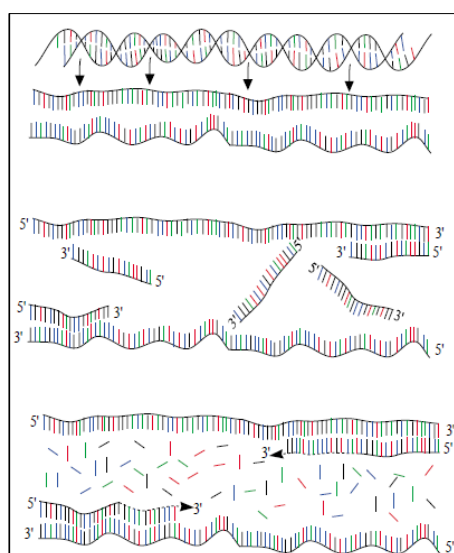
Introdução e definições

A reação em cadeia pela ação da polimerase, ou PCR (do inglês *polymerase chain reaction*), desenvolvida em 1983 por Kary B. Mullis, é o ensaio mais sensível para a detecção de DNA. A técnica é um método *in vitro* que consiste na amplificação enzimática de um determinado segmento do DNA (MULLIS *et al.*, 1986) pela extensão de oligonucleotídeos (*primers* ou sequência de iniciadores) que hibridizam com as fitas complementares de uma sequência-molde (ou sequência-alvo). O processo envolve desnaturação, anelação e extensão (Figura 11) (ERLICH, GELFAND e SNINSKY, 1991). Repetidos ciclos com sucessivas variações de temperatura permitem a desnaturação do molde de DNA, hibridização e extensão dos *primers* pela ação da DNA polimerase. No decorrer de vários ciclos, o segmento de DNA limitado pelos *primers* vai sendo amplificado, de modo que passa a existir um acúmulo exponencial dessa região. Assim, se partirmos de uma única molécula molde de DNA, após

30 ciclos de desnaturação, hibridização e extensão, serão obtidos cerca de 1,4 bilhão de cópias da região (KUBISTA *et al.*, 2006; RAO, LAI, HUANG, 2013).

Os *primers* são oligonucleotídeos curtos (aproximadamente 15 a 30 nucleotídeos) que servem então como pontos de partida para a síntese de DNA e subsequentemente para a amplificação durante o PCR (SCHOCHETMAN, OU e JONES, 1988). Os *primers* são desenhados em cada estudo para complementar o fragmento de DNA de interesse a ser amplificado (WHITE, ARNHEIM e ERLICH, 1989).

Figura 11– Figura ilustrativa dos estágios térmicos de um ciclo da reação em cadeia de polimerase (PCR)



Primeira Fase: Desnaturação

A dupla fita do DNA da amostra sofre desnaturação a temperaturas acima de 94°C. Em 1min gera duas moléculas de DNA fita simples.

Segunda Fase: Anelamento

A temperatura vai para 60°C por 30s. Na segunda fase, dois *primers* diferentes hibridizam com sua sequência complementar, localizada em cada uma das fitas de DNA.

Terceira Fase: Alongamento

Nesta fase a enzima Taq Polimerase catalisa a adição de nucleotídeos presentes na solução dos *primers* hibridizados, a uma temperatura de 72°C por 2 minutos.

Fonte: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Esse diagrama mostra os três estágios, desnaturação, anelamento e alongamento, que constituem um ciclo do PCR.

PCR em tempo real

A PCR em tempo real quantitativa (*real time* PCR ou qPCR) é uma técnica baseada na PCR para amplificar ácidos nucleicos. A PCR-TR combina a metodologia do PCR convencional com um mecanismo de detecção e quantificação através da emissão de fluorescência, permitindo o monitoramento da reação em tempo real. Ainda, a PCR-TR permite que a amplificação, detecção e quantificação de DNA sejam feitos em uma única etapa, o que agiliza os resultados e diminui o risco de contaminação da amostra, garantindo também maior precisão.

A detecção de amplificação no PCR-TR pode ser baseada tanto no uso de sondas fluorescentes específicas para uma região da molécula que está sendo amplificada, quanto

através do uso de reagentes fluorescentes que se intercalam na molécula de DNA. Neste estudo nós utilizamos o sistema SYBR *Green*, um dos mais utilizados para a detecção de genes específicos estudados com PCR-TR (WANG, GIAMBRONE e SMITH, 2002; SHAHZAMANI, SABAHI *et al.*, 2011). O SYBR *Green* possui uma ligação altamente específica ao DNA duplamente fitado, sendo utilizado para detectar o produto da PCR dos genes em estudo, conforme eles se acumulam durante os ciclos da reação.

Extração de RNA

O RNA total foi extraído a partir de aproximadamente 100 mg de tecido placentário, usando o reagente QIAzolysis (Qiagen, Crawley, Reino Unido) conforme previamente publicado (MISTRY *et al.*, 2011). Brevemente, a concentração e a qualidade de RNA foram verificadas espectrofotometricamente usando Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Labtech, Ringmer, Reino Unido). Todas as amostras tiveram uma razão de $A_{260}/A_{280} > 1,96$, sendo armazenadas a -80°C . O RNA (1 μg) foi submetido a transcrição reversa para cDNA usando o kit *QuantiTect Reverse Transcription* contendo uma mistura de *primers* randômicos e oligo dT (Qiagen, Crawley, Reino Unido) em um termociclador *Primus96 Advanced Gradient* (Peqlab Ltd, Fareham, Reino Unido). As condições usadas para gerar a primeira fita de cDNA foram 42°C (15 minutos) e 95°C (3 minutos). As amostras foram armazenadas (cDNA -20°C) no *Women's Health Department* do KCL no *St Thomas' Hospital*, em Londres.

Design dos primers

Após obtenção e preparação das amostras, os *primers* de interesse foram desenhados (LDL-R, LRP-1, ABCA-1, SRB1, PON-1, MTTP, PDIA2). Subsequentemente realizou-se uma busca (www.google.com/www.pubmed.com) para verificar a sequência BLAST – número de acesso de cada molécula. A partir dos detalhes de cada gene, o desenho dos *primers* foi realizado através do site da *Universal Probe Library* e a compra na empresa *Eurofins*, via internet (sequência de 5' a 3' direta e reversa para cada um dos genes, totalizando o equivalente a 14 *primers*).

Planejamento do ensaio PCR-TR

Após a aquisição dos *primers*, iniciou-se o planejamento do ensaio. Os genes a serem estudados foram descritos na Tabela 5, com seu respectivo *BLAST sequence Accession*, a sequência dos *primers* e o comprimento dos mesmos, em par de bases (Pb).

Tabela 5 –Detalhes da sequência dos *primers* dos sete genes de interesse: LDL-R, LRP-1, SRB1, PON-1, ABCA1,MTTP, PDIA2

Gene	Sequência BLAST No. de Acesso	Primer	Comprimento (pb)
LDL-R	NM_000527.3	5'-aggacggctacagctacc-3' 5'-ctccaggcagatgttcacg-3'	73
LRP-1	NM_002332.2	5'-gggtgcacccacctcaacat-3' 5'-agtcggtccagtacacgtttc-3'	88
SRBI	NM_005505.4	5'-catcaagcagcaggtcctta-3' 5'-cggagagatagaaggggatagg-3'	95
PON-1	NM_000446.5	5'-actatagtccaagtgaagttcgagtg-3' 5'-atgagccagcaactcagctat-3'	110
ABCA1	NM_005502.2	5'-tgctgcatagtcttgggactc-3' 5'-atcactcctgtcgcgtgt-3'	76
MTTP	NM_000253.2	5'-ggctggtcttcacggtagc-3' 5'-gttctctccccctcgtc-3'	88
PDIA2	NM_006849.2	5'-ctccaagttcctggacaacg-3' 5'-tggaccccatagtgagttg-3'	104

Fonte: Hentschke (2012). LRP-1:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1; LDL-R:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade; SRB1:ReceptorScavenger classe B tipo 1; ABCA1: Transportador humano –ATP-binding membro 1 subfamília ABCA;MTTP:Proteína de transferência de triglicérido microsomal subunidade grande; PON-1:Paraoxonase 1; PDIA2:Proteína dissulfeto isomerase família A, membro 2.

Diluição dos primers

Os *primers* foram reconstituídos com água deionizada purificada em sistema Milli-Q. Cada um dos *primers* recebeu uma concentração diferente de água de acordo com as instruções do produto (volume para 100 pmol/μl). Após, sete tubos de centrifugação (1,5ml) foram preparados com *primer* direto e *primer* reverso na concentração 1:10/20:200 (180μl de água + 10μl *primer* direto + 10μl *primer* reverso) para cada gene. Os tubos foram passados no *vortex* e armazenados em -20°C, até o uso.

Teste dos primers

Os *primers* foram testados previamente ao estudo. Para a realização do teste foram usadas duas amostras de placenta e dois controles negativos (CTN). Nos casos em que os *primers* referentes aos genes em questão não tiveram expressão na placenta no primeiro teste, foram usados outros tecidos: coração, intestino, bexiga e miométrio.

Os CTN contêm todos os componentes do qPCR-TR, com exceção do cDNA, que na preparação é substituído por água deionizada. Portanto, o CTN não deve ser detectado durante a reação. Se alguma curva surgir no NTC, isso pode sugerir contaminação ou “*primer dimer*” (pode ocorrer quando dois *primers* hibridizam um com o outro, devido aos seus pares de bases complementares). O qPCR-TR oferece, no final da reação, a análise da curva MELT, quando se pode avaliar se houve contaminação ou se apenas ocorreu a existência de *primer dimer*, avaliando a presença de um único produto. Se o NTC aparecer junto com as amostras na curva MELT, isso sugere contaminação (Figura 12) (PAUDEL *et al.*, 2011).

Elaboração da curva padrão

A curva padrão (Figura 12) foi realizada a partir do produto do qPCR-TR (GIBSON, HEID e WILLIAMS, 1996; BUSTIN, 2000). Dessa forma, após a realização do qPCR-TR processou-se o produto em gel de eletroforese (Figura 12). Realizou-se a curva padrão de todos os genes apresentados anteriormente, com exceção do Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (*housekeeper*), realizado previamente pelo Dr. Hiten Mistry. O kit usado para a extração do DNA foi o QIAquick gel extraction kit 50. Para a quantificação do DNA foi utilizado o espectrofotômetro – *Nanodrop (ND 1000)* (Nanodrop Technologies, Labtech, Ringmer, Reino Unido); programa: *ND 1000/Nucleic Acid*, nas mesmas condições da extração de RNA.

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (protocolo no Apêndice E)

O PCR-TR foi realizado com a química SYBR Green (2x QuantiFast SYBR Green, Qiagen, Crawley, Reino Unido) em termociclador RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Austrália) usando os *primers* detalhados na Tabela 5. A fase de pré-PCR foi realizada durante 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 10s e 60°C durante 30s. A análise da curva-melt foi realizada, como mostrado na Figura 12B. A quantificação absoluta (método da curva padrão) foi utilizada para quantificar a expressão do gene. Os resultados obtidos foram normalizados para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), um gene controle, estável, adequado para amostras de placentas humanas (MURTHI *et al.*, 2008).

Figura 12 – Exemplo de um processo de elaboração da curva padrão para análise de RNAm utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR)

Gene: LRP-1

Sequência ID: NM_002332.2

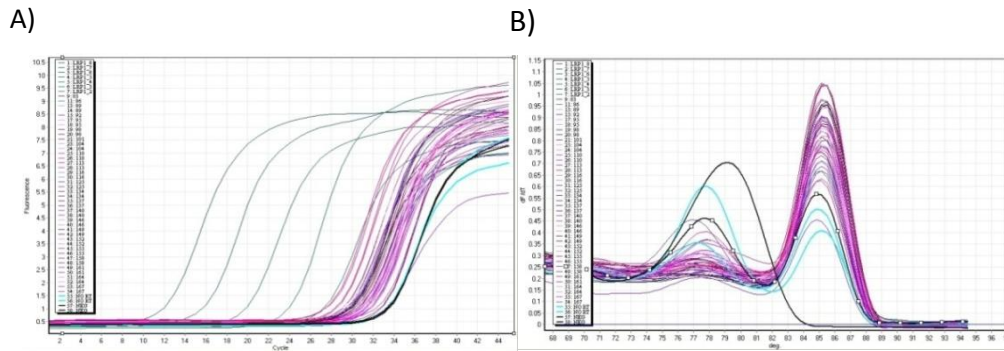
Tamanho do produto: 88 bp

Primer direto 5'-GGTGTACCCACCTCAACAT-3'

Primer reverso: 5'-AGTCGGTCCAGTACACGTTTC -3'

Sequência do Produto:

GGTGTACCCACCTCAACATtccagggtgaagatgccagaggcatcgccatcgactgggtggccgGAAACGTGTACTGGACCGACT

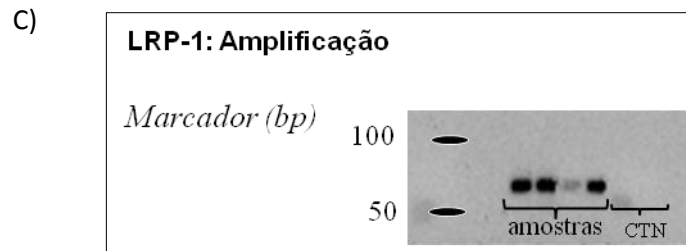


Condições do ensaio: Rotorgene 6000, Corbett Research

Ativação: 95°C por 5 min

Ciclagem: (melting 95°C por 10 s; combinação anelamento/extensão 60°C por 30 s) x 40

Melt: 67-95°C com 1°C acréscimo



Fonte: Hentschke (2012). Elaboração da curva padrão. 12A) Gráfico de amplificação de ácidos nucleico por PCR-TR – Curva padrão e amostras. 12B) Curva MELT: Permite distinguir entre *primer dimmer* e contaminação. 12C). Gel de eletroforese, amplificação de LRP-1. Neste caso, temos *primer dimmer*, não havendo contaminação.

2.2.1.4.4 2 Ensaio de imuno histoquímica

Imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica para detectar a presença de antígenos em corte de tecido histológico através do uso de um anticorpo com enzima específica acoplada para um antígeno. Ou seja, a IHQ identifica epítopes no tecido através da reação antígeno-anticorpo, revelada por um marcador visual e examinada à microscopia óptica e/ou eletrônica. Essa técnica é amplamente utilizada na pesquisa básica para compreender a distribuição e localização de biomarcadores e proteínas diferentemente expressas em determinadas partes de um tecido biológico (ABBAS, 2005).

Processamento e mensuração das amostras

Após a coleta da placenta e a imersão de fragmentos do tecido em formulina 10%, foi possível processar a amostra em blocos de parafina (Sledge Microtome, Anglia Scientific, Norwich, Reino Unido). Confeccionaram-se cortes histológicos, seguindo a mesma orientação, com espessura de 5µm em lâminas *Superfrost plus* (Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemanha). Antes do uso, os cortes foram desparafinados por imersão em xileno seguido de reidratação em ordem decrescente de concentração alcóolica. A coloração da imuno-histoquímica foi realizada utilizando os kits *Immunohistochemical Dako Envision staining* (Dako Ltd, Alemanha). O anticorpo policlonal de Coelho LRP-1 (ARP58562_P050; Aviva Systems Biology, EUA) foi utilizado para o imunoenensaio, sendo diluição ideal 1 para 500. O resgate do sítio antigênico por indução de calor (conhecido como HIER) foi induzido com tampão de citrato (pH 6.0) usando um micro-ondas por 15 minutos, seguido de incubação por 30 minutos em soro normal de Coelho (Sigma-Aldrich, Reino Unido) para bloquear ligações não específicas. Os slides foram então incubados em anti-LRP-1 *overnight* a 4°C. Um controle negativo foi realizado através da incubação do tecido com Imunoglobulina IgG de Coelho. Os cortes foram desidratados e apurados em ordem crescente de concentrações alcóolica e xileno, antes da montagem em DPX (BDH, Poole, Reino Unido).

Todos os slides foram avaliados pelo mesmo observador, cegado para desfechos maternos. Para análise dos cortes placentários, foram capturadas cinco seleções de imagens digitais, randomizadas, em campos de alta potência (400 × ampliação) em microscópio NIS-Elements F2.20 (Nikon United Kingdom Ltd, Surrey, Reino Unido).

A quantificação de LRP-1 foi realizada conforme o *Positivo Pixel Algorithm*, do programa *Aperio ImageScope*. Com esse *software* é possível discriminar entre os pixels

positivos e negativos e combinar o número de pixels positivos corados com a intensidade dos mesmos pixels para produzir o valor de “positividade”. Uma verificação visual foi também realizada para assegurar a discriminação acurada das regiões imunomarcadas. Detalhes sobre protocolo da imuno-histoquímica estão no Apêndice F.

Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados usando o programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 19 (SPSS 19.0) para Windows. Os dados foram apresentados como médias \pm DP ou mediana e IQR, conforme apropriado, teste *t* de Student ou teste U de Mann-Whitney foram utilizados, dependendo da distribuição dos dados, após o teste de Kolmogorov-Smirnov. As correlações entre os parâmetros foram testados com o teste de classificação de Spearman ou com o coeficiente de correlação de Pearson. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

2.2.1.5 Resultados

2.2.1.5.1 Sujeitos do estudo

A descrição demográfica, obstétrica e gestacional das 51 participantes está descrita na Tabela 6. Os dados demográficos apresentados foram publicados previamente (MISTRY *et al.*, 2008). Todas as pacientes tiveram gestação única. As pacientes com PE foram diagnosticadas como moderada a grave, excluindo pacientes com síndrome HELLP. Os neonatos dos dois grupos sobreviveram.

Tabela 6 – Dados clínicos e bioquímicos das pacientes em relação a gestantes normais e com pré-eclâmpsia

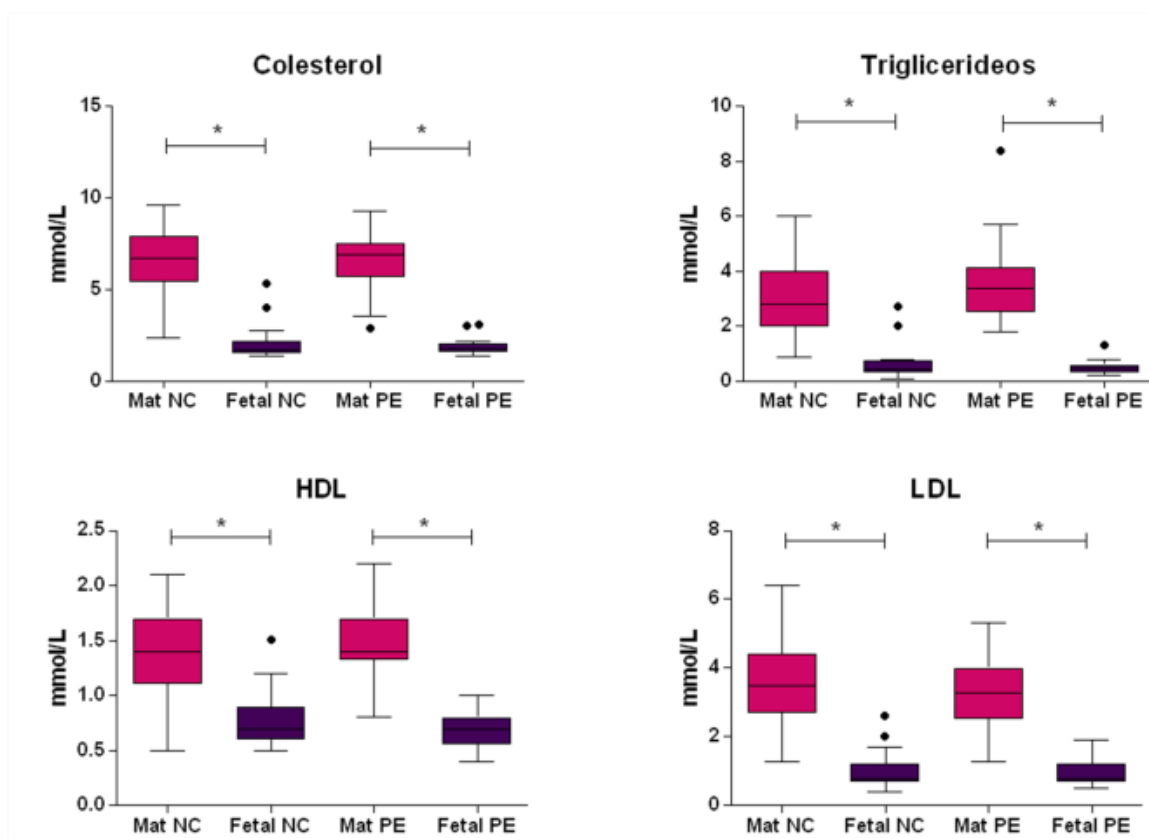
Parâmetros maternos e fetais	GN (27)	PE (24)
Idade materna, anos	30 ± 6,9	31 ± 6,1
Primíparas, n (%)	16 (59,3)	17 (68)
Índice de massa corporal, kg/m ²	26,2 ± 5,4	26,6 ± 5,0
PAS, mmHg†	116 ± 4,6	156 ± 7,1*
PAD, mmHg†	76,0 ± 3,0	98,0 ± 4,5*
Proteinúria, g/L	-	1,0 (0,3,11,5)
Idade gestacional no parto, semanas	40 ± 1,1	36,7 ± 3,8*
Cesarianas, n (%)	4 (15)	11 (44)
Peso fetal, kg	3,5 [3,3;3,7]	2,9 [2,0;3,4]*
Percentil de peso fetal para IG	45 [23;62]	13 [1;82]*

Fonte: Hentschke (2012). Dados clínicos e bioquímicos das participantes do estudo. Os dados estão apresentados em média ± DP ou mediana [IQR] como apropriado, com exceção da proteinúria: mediana (min, Max) e a paridade (número (percentagem)). * $p < 0,05$ entre GN e com PE. † Máxima, fora do trabalho de parto.

2.2.1.5.2 Análise bioquímica

Para todas as lipoproteínas maternas e fetais, não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre GN e com PE. Entretanto, amostras de sangue venoso do cordão umbilical tiveram significativamente menor concentração de lipídios e lipoproteínas comparadas com as concentrações maternas tanto nas pacientes controles quanto nas gestantes com PE: TG e CT ($p < 0,001$); LDL (GN: $p = 0,003$; PE: $p = 0,01$) e HDL ($p = 0,001$) (Figura 13).

Figura 13 – Análise da concentração lipoproteica sérica na circulação materna e fetal, de pacientes controles e com pré-eclâmpsia



Fonte: Hentschke (2012). HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; Mat NC: Controle materno; Fetal NC: Controle fetal; MatPE: Pré-eclâmpsia materna; Fetal PE: Pré-eclâmpsia fetal. Dados estão apresentados em mediana [IQR]. * $p < 0,05$ entre amostras maternas e fetais, para todas as lipoproteínas e lipídios.⁹

2.2.1.5.3 Lipoproteínas em soro materno, fetal e placenta

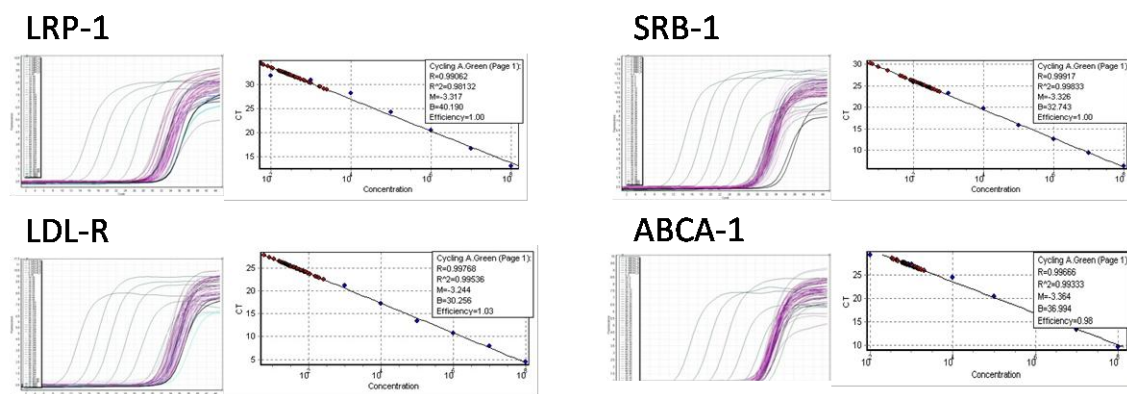
Quando concentrações de lipoproteínas e lipídios séricos maternas e do cordão umbilical foram correlacionadas com a expressão de RNAm dos receptores de lipoproteínas da placenta, não foi encontrada diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Ainda, não foram observadas associações entre as lipoproteínas séricas e receptores em relação com o peso do recém-nascido ($p > 0,05$).

⁹ Cálculo para transformação de mmol/L para mg/dL ($\text{mg/dL} = 18 \times \text{mmol/L}$)

2.2.1.5.4 Expressões placentária de receptores, mediadores e transportadores

Quando o RNAm dos genes LRP-1, LDL-R, SRB1, ABCA1, PON-1, MTTP e PDIA2 em tecido placentário foram analisados, encontramos expressão de LDL-R, LRP-1, SRB1, ABCA1 e não encontramos expressão de PON-1, MTTP e PDIA2 (Figura 14).

Figura 14 – Ilustração da análise da expressão placentária dos genes em estudo utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real



Fonte: Hentschke (2012). LRP-1:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1;LDL-R: Receptor de lipoproteína de baixa densidade; SRB1:Receptor Scavenger classe B tipo 1;ABCA-1:transportador ATP-binding cassette ABCA1.

2.2.1.5.5 Relação da expressão placentária com a pré-eclâmpsia

A expressão de RNAm de GN e com PE está descrita na Tabela 7. A expressão de RNAm dos genes encontrados na placenta não foi significativamente diferente entre os dois grupos ($p > 0,05$ para todos).

Tabela 7 – Expressão placentária de RNAm dos receptores, transportadores e mediadores analisados em gestantes normais e com pré-eclâmpsia

Expressão de RNAm*	GN (n=27)	PE (n=20)	<i>p</i>
LDL-R	0,05 [0,03;0,07]	0,06 [0,045;0,11]	0,107
LRP-1	7,0 [5,04;17,33]	12,3 [5,23;23,89]	0,503
SRB1	0,34 [0,21;0,51]	0,32 [0,24;0,56]	0,605
ABCA1	31,38 [20,8;73,55]	28,8 [19,32;82,81]	0,942

Fonte: Hentschke (2012). LDL-R: Receptor de lipoproteína de baixa densidade; LRP-1Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1; SRB1: Receptor Scavenger classe B tipo 1; ABCA1: Transportador ATP-binding cassette A1; MTTP: Proteína de transferência de triglicérido microssomal; PDIA2: Proteína dissulfeto isomerase família A, membro 2; GN: Gestante normotensa; PE: Pré-eclâmpsia. *Dados foram descritos em Mediana [IQR].

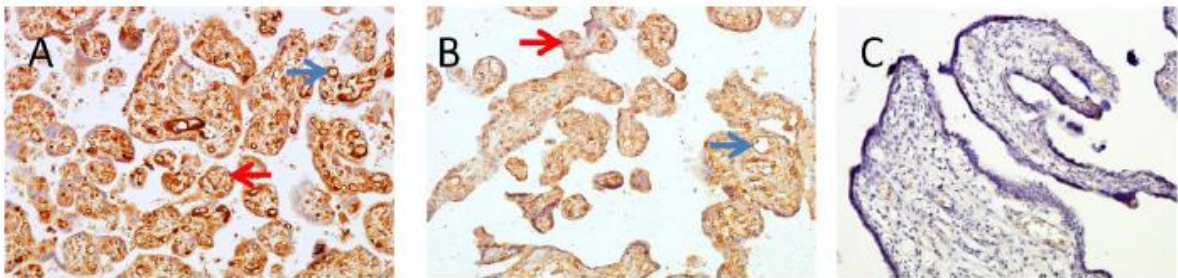
Embora com amostra pequena, nós adicionalmente analisamos dez pacientes que desenvolveram PE após 34 semanas de gestação (IG > 34), separadamente, comparando com o grupo controle. O mesmo resultado – não significativo – foi observado para todas as concentrações de lipoproteínas maternas e fetais e para a expressão dos receptores, transportadores e enzimas da placenta ($p > 0,1$ para todos).

2.2.1.5.6 Expressão de lipoproteína placentária e neonatos pequenos para a idade gestacional

No grupo PE, observamos que os neonatos PIG apresentaram significativamente menor expressão de *LRP-1* RNAm comparado aos neonatos com percentil AIG (AIG: 20,2 [8,2; 30,4]; PIG: 4,72 [3,3; 11,6], $p=0,036$). Todos os outros genes não apresentaram diferenças ($p > 0,05$).

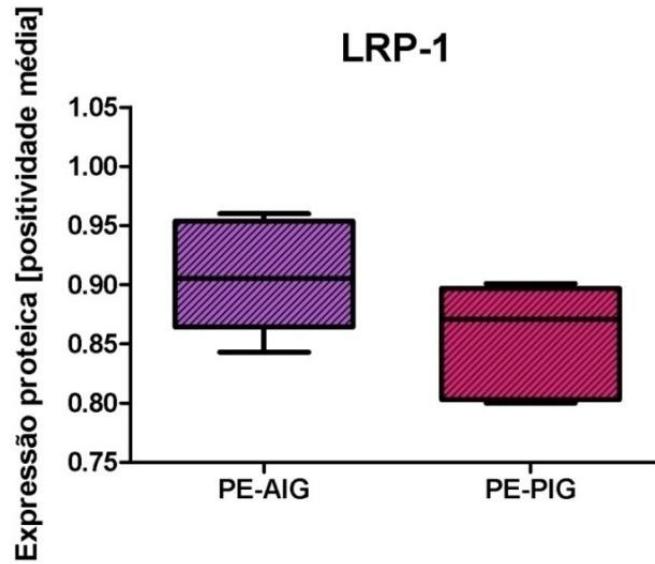
Assim, optamos por realizar imuno-histoquímica da proteína LRP-1 no tecido placentário de gestantes PE com recém-nascidos PIG e AIG (Figura 15) com o objetivo de avaliar a localização proteica do mesmo. Como resultado, não encontramos diferenças estatísticas ao comparar a proteína LRP-1 entre placentas de neonatos PIG com placentas de neonatos AIG no grupo PE, $p > 0,05$ (Figura 16).

Figura 15 – Ilustração do imunoensaio da proteína LRP-1 em placentas de pacientes com pré-eclâmpsia, em relação ao percentil fetal



Fonte: Mistry (2013). A) AIG e B) PIG e C) CTN IgG. Nas microfotografias, células positivas aparecem em marrom, com amplificação de 200X. A expressão de proteína foi localizada principalmente ao redor dos vasos fetais (seta azul) e células Hofbauer (seta vermelha).

Figura 16 – Representação em *boxplot* da expressão placentária proteica de LRP-1 em pacientes com pré-eclâmpsia com neonatos adequados para a idade gestacional *versus* pequenos para a idade gestacional



Fonte: Mistry (2013). Relação entre PE-AIG (pré-eclâmpticas com neonato adequado para idade gestacional) e PE-PIG (pré-eclâmpticas com neonato pequeno para a idade gestacional). (mediana [IQR]: 0,91 [0,86; 0,95] vs. 0,87 [0,81; 0,89], $p > 0,05$).

2.2.1.5.7 Análise de correlações

Quadro 14 – Correlações entre receptores, mediadores e transportadores do colesterol estudados, no grupo de gestantes normais (a) e no grupo com pré-eclâmpsia (b)

a) RNAm – Gestante controle				
	LDL-R	SRB1	ABCA1	LRP-1
LDL-R				
SRB1	r=0,56 p=0,003			
ABCA1	r=0,31 p=0,14	r=0,45 p=0,026		
LRP-1	r=0,21 p=0,33	r=0,27 p=0,21	r=0,83 p<0,001	

b) RNAm – Pré-eclâmpsia				
	LDL-R	SRB1	ABCA1	LRP-1
LDL-R				
SRB1	r=0,53 p=0,017			
ABCA1	r=0,42 p=0,075	r=0,13 p=0,59		
LRP-1	r=0,40 p=0,09	r=0,05 p=0,84	r=0,85 p<0,001	

 Correlação forte (r:0,5-0,7)  Correlação muito forte (r:0,7-0,9)

Fonte: Hentschke (2013). LRP-1:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1; LDL-R:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade; SRB1:ReceptorScavenger classe B tipo 1; ABCA1: Transportador humano –ATP-binding membro 1 subfamília ABCA.

2.2.1.6 Discussão

Neste estudo, analisou-se o perfil lipídico de mulheres com PE e em pacientes gestantes normotensas. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que analisou concomitantemente o sistema lipoproteico placentário, fetal e materno em paciente com PE em comparação a normotensas, e ainda associou esses achados a neonatos PIG, no terceiro trimestre da gestação.

Em relação às amostras, todas foram coletadas no momento do parto. Apesar de não serem emparelhadas por IG, sabe-se que as concentrações de lipoproteínas variam trimestralmente, estando estáveis no terceiro trimestre (HERRERA *et al.*, 2004). Assim, a diferença de IG parece não ter influenciado nos níveis de lipoproteínas, visto que todas foram coletadas no terceiro trimestre. Ainda, os mesmos resultados não significativos foram observados quando apenas amostras de PE a termo foram comparados ao grupo controle.

2.2.1.6.1 Os estudos e a hiperlipidemia gestacional

Nossos dados mostraram não haver diferença estatística entre lipoproteínas plasmáticas maternas e fetais entre pacientes com PE e GN, o que vai de certa forma contra a teoria de que haveria uma exacerbação da hiperlipidemia gestacional na PE, como relatam Bjosrg Lorentzen e colaboradores, e outros autores (LORENTZEN e HENRIKSEN, 1998; RAY *et al.*, 2006), inclusive cita-se o possível impacto negativo no perfil lipídico fetal nessas pacientes (BELO *et al.*, 2002; CATARINO *et al.*, 2008). Nesses estudos, foi sugerido que a dislipidemia poderia contribuir com aumento do estresse oxidativo e com disfunção endotelial, e possivelmente com resistência insulínica, o que pode causar um aumento compensatório na concentração de insulina, diminuir a atividade do LLP e aumentar os TG. Entretanto, fatores de risco associados à PE, como HC, obesidade e resistência insulínica, compartilham características comuns com a dislipidemia, principalmente em relação ao estresse oxidativo e à disfunção endotelial, vista também nessas desordens.

Em 2013, um novo estudo, assim como o nosso, mostrou não haver associação entre níveis de lipoproteínas maternas entre os dois grupos, questionando se esses níveis não estariam associados aos fatores de risco para PE e não à desordem hipertensiva em si (EMET *et al.*, 2013). Por exemplo, neste presente projeto, a média do IMC foi de 26 Kg/m² nos dois grupos, sugerindo que o perfil lipídico anormal possa estar associado à obesidade (CATAPANO *et al.*, 2011) e não necessariamente à PE. Inclusive, essa pode ser a razão de

alguns estudos prévios mostraram aumento da concentração de lipoproteínas na PE, visto que os dados podem não ter sido analisados excluindo os fatores de risco.

2.2.1.6.2 O estudo e a expressão gênica placentária

Em relação à concentração gênica placentária, vimos que a maior expressão de RNAm foi do gene ABCA1 (BHATTACHARJEE *et al.*, 2010), seguido pelo LRP-1. No entanto, SRB1 e LDL-R, os principais transportadores de colesterol (ETHIER-CHIASSON *et al.*, 2007), tiveram uma expressão muito baixa no tecido placentário no terceiro trimestre, o que poderia sugerir que a função dos níveis de LDL-R e do SRB1 podem não ter um papel importante próximo do termo. Uma explicação seria a de que, nesse momento da gestação, os recursos lipídicos fetais podem ser provenientes principalmente do próprio feto, e não mais apenas da fonte materna (GHIO *et al.*, 2011). Ainda, um estudo prévio mostrou que, a termo, o SRB1 não desempenha um papel crítico no controle da concentração de colesterol no plasma, mesmo em gestantes tanto com altos quanto com baixos níveis de colesterol, mas não se sabe exatamente o porquê (ETHIER-CHIASSON *et al.*, 2007).

Ainda, nossos resultados estão de acordo com o de outros autores que relataram uma acentuada expressão dos níveis de ABCA1 (NIKITINA *et al.*, 2011), assim como de LDL-R, LRP-1, SRB1 em tecidos placentários (WADSACK *et al.*, 2007). No entanto, em contraste com os dados correntes, Wadsack e colaboradores mostraram uma expressão de LDL-R RNAm inferior em CIUR, e Stepane colaboradores (STEPAN, FABER e WALTHER, 1999), uma expressão mais elevada no mesmo grupo. Acredita-se que diferentes critérios de seleção da população do estudo podem explicar essas diferenças (STEPAN, FABER e WALTHER, 1999).

2.2.1.6.3 O estudo e a expressão proteica placentária

Valores contrastantes de proteína também têm sido observados em vários estudos. Neste trabalho, foi examinada a localização e expressão de proteínas de LRP-1, devido às diferenças observadas na PE com neonatos PIG ao analisar o RNAm. Esses dados sugerem uma menor expressão no grupo PIG, embora não tenha atingido significância, possivelmente devido ao pequeno tamanho amostral. Sabe-se que o LRP-1 é altamente expresso em macrófagos e, por conseguinte, não é surpreendente que a expressão de LRP-1 esteja localizada principalmente nos macrófagos fetais, conhecidos como células de *Hofbauer*. Essas

células são encontradas predominantes no estroma das vilosidades coriônicas da placenta durante toda a gestação (WOOD, 1980; BULMER e JOHNSON, 1984; GOLDSTEIN *et al.*, 1988). As células de *Hofbauer* desempenham um papel central no desenvolvimento e manutenção da placenta humana, pois secretam citocinas importantes para o crescimento e diferenciação do trofoblasto (KHAN *et al.*, 2000). Há evidências de que citocinas inflamatórias aumentem durante o trabalho de parto, principalmente IL-1 e TNF α , sendo essas citocinas secretadas pelos macrófagos – as células mais frequentes do estroma viloso placentário.

2.2.1.6.4 O transporte de colesterol: considerações importantes

Muito precisa ser estudado para elucidar o transporte placentário em patologias gestacionais, já que o mecanismo de transporte de lipídios e lipoproteínas está longe de ser compreendido.

É importante notar que o colesterol é transportado não apenas pelos receptores, mas também evidências experimentais sugerem que ocorra um efluxo de colesterol para células do trofoblasto semelhantemente a quaisquer outras células polarizadas (WOOLLETT, 2005). As consequências fisiológicas da regulação de receptores para nutrição da placenta, suas funções e para o desenvolvimento fetal não são claras. Ainda, não se sabe exatamente qual a proporção da captação de colesterol pela placenta que é liberada na circulação fetal e aquela que é consumida pelo próprio órgão, sendo utilizada, por exemplo, para a síntese de esteróis (principalmente de progesterona).

Em estudos prévios, foram propostos três diferentes mecanismos para o transporte de colesterol, como já foi descrito, em parte, na introdução deste estudo, sendo eles: 1) difusão aquosa, uma via independente de proteína, baseada em gradientes de concentração; 2) transporte bidirecional mediado por SRB1 entre células e receptores extracelulares; e 3) efluxo unidirecional mediado por ABCA-1 para Apo livres de lipídios (ROTHBLAT *et al.*, 1999; YANCEY *et al.*, 2003).

2.2.1.7 Conclusão

Quando analisamos a relação entre genes placentários e neonatos PIGs, observamos que a LRP-1 foi significativamente menor na placenta de PIGs no grupo de PE. Um possível mecanismo que explicaria isso poderia estar relacionado à família das MMP. As MMPs tipo membrana (MT-MMP) podem degradar LRP-1 em fragmentos de baixa massa molecular. A cadeia solúvel intacta de LRP-1 α (sLRP-1) é derramada no plasma, tendo sido identificada na barreira hematoencefálica após processo isquêmicos.

Sabe-se que as proteínas da família MMP estão envolvidas na quebra da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelagem tecidual, bem como em processos patológicos, tais como artrite e metástases (SELVAIS *et al.*, 2011). O aumento da atividade da MMP-2 (LRP-1 medeia a sua internalização) pode contribuir para a disfunção endotelial, que é central para a fisiopatologia da pré-eclâmpsia e/ou PIGs.

2.2.1.7.1 Limitações do estudo

Uma limitação do estudo é que não temos detalhes sobre a exposição a esteroides pré-natais e outros medicamentos, cirurgia ou o momento da última refeição, o que pode influenciar algumas alterações lipídicas.

Ainda, a amostra de placentas provenientes de fetos PIG talvez não tenha sido suficiente para a análise imuno-histoquímica, podendo justificar os achados sem significância.

2.2.1.7.2 Interesses futuros

Este é um estudo preliminar. Uma análise adicional seria necessária para compreender a via de colesterol, especialmente em relação ao crescimento fetal e patologias associadas, como CIUR e DMG.

Inicialmente, seria conveniente examinar os níveis proteicos de todos os receptores, transportadores e enzimas de lipoproteínas, e não apenas do LRP-1. Para isso, seria extremamente importante uma amostra maior de placentas provenientes de fetos PIG, assim como AIG e GIG.

Outra análise interessante seria a mensuração das lipoproteínas não somente no soro materno e fetal, mas também no tecido placentário, para tentar analisar o consumo placentário

de colesterol. Ainda, fazer análise dos receptores, associados às lipases membros do LTG (LE, LPL).

Por fim, os resultados deste estudo não apoiam a ideia de uma contribuição direta do metabolismo lipídico na fisiopatologia da PE. No entanto, parece mostrar o envolvimento do mesmo em relação ao crescimento fetal, o que justifica dar continuidade a essa linha de pesquisa.

O trabalho do estudo acima foi publicado com o título “*Is the atherosclerotic phenotype of pre-eclamptic placentas due to altered lipoprotein concentrations and placental lipoprotein receptors? Role of a small for gestational age phenotype*” no *Journal of Lipids Research* (Ver Apêndice I, Artigo 2).

Projeto B

Proteínas das cavéolas e a pré-eclâmpsia

2.2.2 Bloco 2: Projeto B: Proteínas das cavéolas e a pré-eclâmpsia

2.2.2.1 O endotélio vascular e o óxido nítrico

A importância do estudo do endotélio vascular – monocamada de epitélio pavimentoso, um componente indispensável na regulação do tono vascular – foi observada experimentalmente em 1980 por Furchgott e colaboradores (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980). Experimentos mostraram que, quando o endotélio era estimulado, uma substância vasoativa era liberada, reconhecida como um Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*), e por fim chamada de Óxido nítrico (IGNARRO *et al.*, 1987), um composto que causava relaxamento nas células musculares lisas. O NO passou a ser estudado incessantemente, rendendo, em 1998, a Robert F. Furchgott, Ferid Murad e Louis J. Ignarro, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina. Descobertas de outras moléculas de EDRF liberadas pelo endotélio, como a prostaciclina (PGI_2), assim como fatores constritores (EDCF, do inglês *endothelium-derived contracting factors*), como a endotelina (ET-1), produtos da via da ciclo-oxigenase, como o tromboxano A_2 (TXA_2) e espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (VILA e SALICES, 2005), também foram estudadas. Essas descobertas, associadas à caracterização do endotélio como um sensor biológico capaz de detectar e responder a qualquer estímulo mecânico, físico ou químico fez dele um tecido multifuncional, com papel importante na homeostasia de todos os sistemas fisiológicos. (Texto adaptado do artigo de revisão de Dias e colaboradores, 2011 (DIAS, NEGRÃO e KRIEGER, 2011).

2.2.2.2 Óxido nítrico Sintases

A síntese de NO resulta da ação das NOS, que convertem o aminoácido L-arginina em NO e L-citrulina, na presença de dois cofatores: oxigênio e NADPH (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; MARLETTA, 1993; SHEN *et al.*, 2011). O NO é produzido por uma ampla variedade de tipos celulares, que incluem células epiteliais, nervosas, endoteliais e inflamatórias. Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamífero. Estudos bioquímicos e análise sequencial de aminoácidos revelaram que essas isoformas são produtos de três genes distintos. Duas delas têm um mecanismo de ativação constitutivo (cNOS) que sintetiza NO em condições normais, e que compreende a NOS neuronal (nNOS, tipo I) – presente normalmente nos neurônios (BREDT e SNYDER, 1989;

KNOWLES *et al.*, 1989)– e a NOS endotelial (eNOS, tipo III) – encontrada nas células endoteliais vasculares (Moncada, Palmer *et al.* 1991) e nas plaquetas (RADOMSKI, PALMER e MONCADA, 1990). Além da cNOS, tem-se a NOS induzível (iNOS, Tipo II), expressa em processos celulares anormais, como na insuficiência cardíaca (FERREIRO *et al.*, 2004). A localização subcelular da síntese de NO exerce grande influência na sua atividade biológica (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; CASINO *et al.*, 1993; MARLETTA, 1993; SELIGMAN *et al.*, 1994; QI *et al.*, 2013).

eNOS

O NO produzido pelas células endoteliais tem um importante papel na manutenção do tônus vascular e é essencial na regulação da pressão sanguínea em condições fisiológicas (SELIGMAN *et al.*, 1994). O endotélio usa o NO para comandar o relaxamento do músculo liso da parede do vaso, fazendo com que aumente o fluxo sanguíneo e diminua a pressão arterial. Estudos sugerem que a produção de NO pelas células endoteliais pode estar aumentada na dislipidemia, em particular, na hipercolesterolemia, reforçando o conceito da degradação acelerada do NO como causa do distúrbio na vasodilatação mediada pelo endotélio (CASINO *et al.*, 1993; EHSANIPOOR *et al.*, 2013).

iNOS

O NO decorrente da ativação da iNOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A iNOS catalisa a produção de NO através da resposta imune, sendo produzida por macrófagos e induzida por citocinas e agentes inflamatórios (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; MARLETTA, 1994) (AALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; O'CONNOR e O'BRIEN, 2009), o que resulta em alto fluxo de NO (ANDREW e MAYER, 1999; ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001; DIAS, NEGRÃO e KRIEGER, 2011).

2.2.2.3 Óxido nítrico, gestação e pré-eclâmpsia

A placenta depende de mediadores vasoativos para regular as suas atividades vasculares; assim, o NO desempenha um papel fundamental no controle da resistência

vascular no interior da placenta, sendo que um defeito na via do NO já foi vista em pacientes com SPE (SLADEK, MAGNESS e CONRAD, 1997).

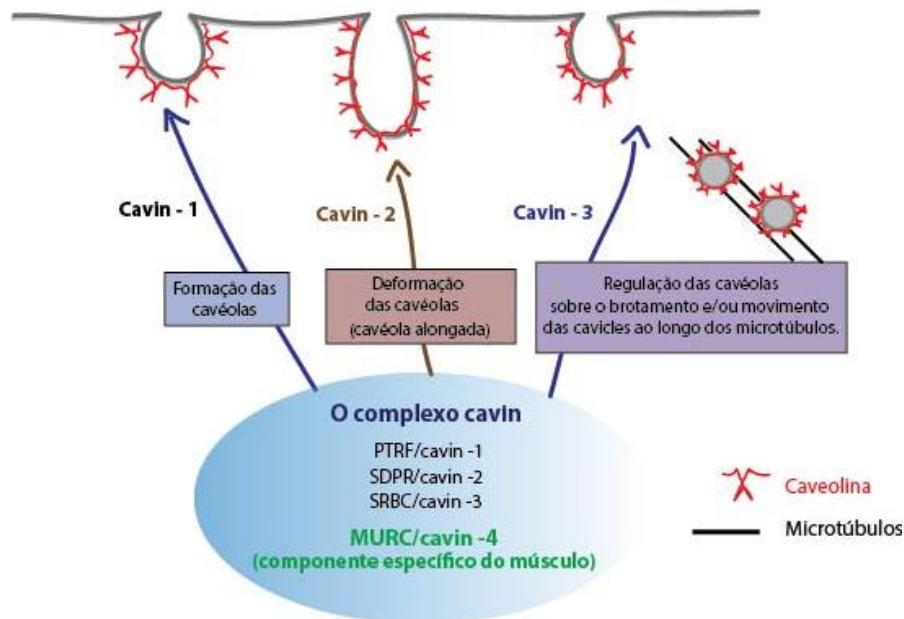
Ainda, estudos mostraram que há um aumento da atividade fosfodiesterásica no plasma de gestantes com SPE. A fosfodiesterase cataboliza a guanosina monofosfato (GMP) cíclico, que é o agente efetor da vasodilatação mediada pelo NO. A ação da fosfodiesterase no plasma de pacientes com DHG resulta em vasoconstrição e pode explicar algumas das manifestações da SPE (PINHEIRO DA COSTA *et al.*, 2006).

2.2.2.4 Complexo da cavéola e a pré-eclâmpsia

Já se passaram quase 60 anos desde que as cavéolas foram visualizadas pela primeira vez por Eichi Yamada e George Palade (PALADE, 1961; PALADE e BRUNS, 1968). As cavéolas, ou “pequenas cavernas”, foram originalmente identificadas como invaginações de 50-100 nm, em forma de balão, presentes na membrana plasmática na maioria dos tipos celulares e tecidos de mamíferos (PALADE, 1961; PALADE e BRUNS, 1968; PINHEIRO DA COSTA *et al.*, 2006; NASSOY e LAMAZE, 2012). Essas invaginações especializadas permanecem sem uma função fisiológica clara e reconhecida até hoje (NASSOY e LAMAZE, 2012). Sabe-se, no entanto, que essas organelas estão abundantemente presentes em células epiteliais, adipócitos e penumócitos tipo I (SEVERS, 1988; ANDERSON, 1993; FIELDING e FIELDING, 1995; PARTON, 1996). As funções originalmente descritas para a cavéola incluem o transporte do colesterol (FIELDING e FIELDING, 1995; SMART *et al.*, 1996), endocitose (SCHNITZER, OH e MCLINTOSH, 1996), potocitose (ANDERSON *et al.*, 1992) e homeostase do Ca^{++} (TAGGART, 2001). A possível regulação da reatividade vascular e da pressão arterial pela cavéola é de interesse em relação à SPE.

As cavéolas são compostas por proteínas que basicamente controlam sua função: as caveolinas (proteínas de revestimento) e as cavins (proteínas adaptadoras) (Figura 17) são consideradas as de maior importância para sua estrutura e função.

Figura 17 – Ilustração do complexo cavéola, suas proteínas e possíveis funções



Fonte: Cristina Grams e Hentschke (2014). Adaptado de (BRIAND, 2011).

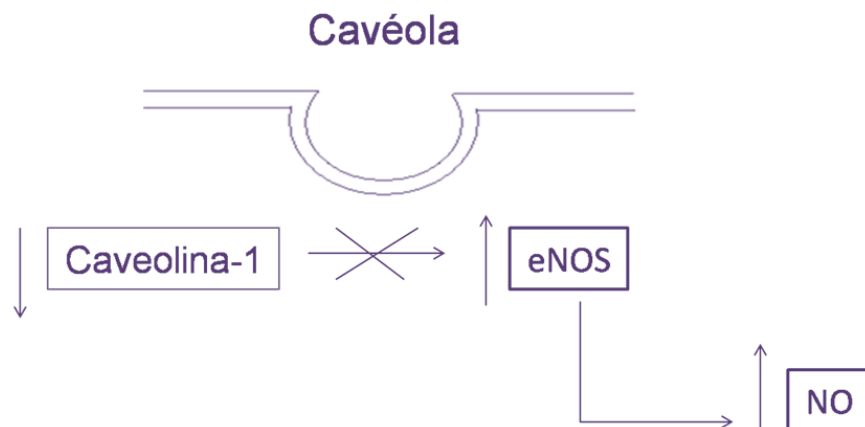
A família dos genes da caveolina (CAV) possui três membros em vertebrados: Caveolina-1 (CAV-1), Caveolina-2 (CAV-2) e Caveolina-3 (CAV-3). CAV-1 e CAV-2 estão expressos na maioria dos tipos celulares, incluindo o sistema cardiovascular, enquanto CAV-3 é expresso principalmente no músculo esquelético e cardíaco. A expressão de CAV-1 é essencial para a formação do complexo cavéola, enquanto que o papel da CAV-2 pode variar dependendo do tipo tecidual em que se encontra (SCHEIFFELE *et al.*, 1998; FUJIMOTO *et al.*, 2000; RAZANI *et al.*, 2002; LAHTINEN *et al.*, 2003; SOWA *et al.*, 2003). As proteínas adaptadoras, as cavins, são quatro: Cavin-1 (PTRF, do inglês *polymerase transcript release factor*), Cavin-2 (SDPR, do inglês *serum deprivation protein response*), Cavin-3 (SRBC, do inglês *srbd-related gene product that binds to c-kinase*) e Cavin-4 (MURC, do inglês *muscle-restricted coiled-coil protein*) (BRIAND, DUGAIL E LE LAY, 2011). Essas proteínas podem ser importantes na regulação da expressão de caveolinas e na morfologia caveolar (HANSEN e NICHOLS, 2010; BRIAND, DUGAIL E LE LAY, 2011), além de muitas outras funções importantes na célula endotelial, principalmente devido à sua capacidade de concentrar e de compartimentalizar várias moléculas de sinalização (HANSEN e NICHOLS, 2010; BRIAND, DUGAIL e LE LAY, 2011). A Cavin-1, por exemplo, é responsável pela formação da cavéola e da estabilização das CAVs (LIU e PILCH, 2008).

Nos vasos sanguíneos, as cavéolas estão presentes na camada de célula endotelial. Estudos mostraram que um grande número de sinalizadores celulares presentes nas cavéolas interage entre si (GARCIA-CARDENA *et al.*, 1997) e com CAV-1 (DURR *et al.*, 2004; SOWA, 2012). Isso leva as cavéolas a serem capazes de recrutar moléculas de sinalização e de regular suas atividades em vez de servirem apenas de suporte para as trocas e transportes celulares (RAZANI e LISANTI, 2001). Esses sinalizadores incluem: eNOS (SHAUL e ANDERSON, 1998; WYATT, STEINERT e MANN, 2004), alguns receptores, como o receptor tirosina-quinase (ex. Receptor VEGF 2), receptores acoplado à proteína G (ex. receptor de bradicinina 2, receptor de endotelina, receptor muscarínico), receptor do fator de TGF β tipo I e II, receptores de certos esteroides e, ainda, subunidades de proteínas G e Canais Potencial Receptor Transiente (TRP) (SOWA, 2012).

eNOS e a cavéola

Em condições basais, eNOS ligado a CAV-1 tem sua função inibida, mantida em um estado menos ativo (BUCCI *et al.*, 2000). No entanto, quando um estímulo é aplicado, o complexo se dissocia e o NO pode então ser sintetizado (FERON e KELLY, 2001) (Figura 18).

Figura 18 – Esquema representativo da relação das proteínas da cavéola com a óxido nítrico sintase



Fonte: Hentschke e Smith-Jackson (2012). eNOS: óxido nítrico sintase endotelial. NO: óxido nítrico.

Vários grupos têm apresentado que o eNOS interage diretamente com sub-regiões do esqueleto celular (*scaffolding domain*) do CAV-1, causando uma interrupção aguda da interação CAV-1/eNOS, resultando em hiperatividade de eNOS, aumentando a vasodilatação e levando à diminuição da pressão sanguínea *in vivo* (SOWA, 2012).

Grande parte da literatura sugere que as cavéolas, as caveolinas e as cavins desempenham papéis importantes na regulação, sinalização e função das células endoteliais, assim como a função cardiovascular e pulmonar a nível celular e sistêmico (MATHEW, 2011). A expressão, em especial, de CAV-1, em células epiteliais, tem mostrado ter um papel regulatório importante na angiogênese patológica de doenças vasculares, como, por exemplo, na aterosclerose, na hipertrofia cardíaca e na hipertensão pulmonar (MATHEW, 2011).

Na literatura, há dados conflitantes em relação à expressão placentária de eNOS e a SPE. Alguns grupos têm mostrado que o eNOS interage diretamente com o CAV-1. Acredita-se que uma dissociação aguda dessa interação CAV-1/eNOS resulta em hiperatividade do eNOS, aumento da vasodilatação e redução da pressão arterial *in vivo* (SOWA, 2012). Ainda, sabe-se que o NOS sintetiza não apenas mais NO na ausência de CAV-1, mas também mais superóxido, com consequências potencialmente patogênicas.

Estudos anteriores confirmaram a expressão da proteína de CAV-1 e 2 no endotélio de capilares da placenta e células do músculo liso em grandes vasos, bem como em fibroblastos de tecido de placenta humana a termo (BYRNE *et al.*, 2001; LYDEN, ANDERSON e ROBINSON, 2002); apenas uma fraca coloração foi observada nas células do sinciciotrofoblasto (LINTON, RODRIGUEZ-LINARES *et al.*, 2003). Por fim, não temos conhecimento de estudos que tenham investigado a expressão desses componentes da cavéola em combinação com eNOS e iNOS em placentas humanas de gestantes com PE.

Dessa forma, temos como hipótese de que, por a cavéola parecer ter um papel importante em disfunções endoteliais, poderia estar relacionada a fatores envolvidos na SPE. Acreditamos que a expressão gênica e proteica de CAV-1, CAV-2, CAV-3, assim como Cavin-1, Cavin-2, Cavin-3, Cavin-4 poderiam estar diminuídas na SPE, já o eNOS e o iNOS aumentados em relação ao grupo controle. A diminuição de CAV-1 poderia resultar numa ativação crônica do eNOS, resultando no aumento de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, contribuindo com o aumento de estresse oxidativo e nitrativo observado na PE.

2.2.2.5 Objetivo

O objetivo deste estudo foi analisar e comparar os genes e proteínas CAV-1, CAV-2, CAV-3, Cavin-1, Cavin-2, Cavin-3, Cavin-4, eNOS e iNOS em placentas de pacientes com e sem PE.

2.2.2.6 Metodologia

Este capítulo usou as mesmas amostras do Projeto A ('Lipoproteínas e a pré-eclâmpsia'), sendo a placenta também coletada e preparada da mesma maneira, como já descrita no Projeto A. Da mesma forma, a técnica de PCR-TR e imuno-histoquímica descrita no capítulo anterior foi a mesma para este capítulo. A diferença esteve nos *primers* utilizados para técnica de PCR-TR (Tabela 8) e na análise protéica por Western Blot realizada após à imuno-histoquímica para a confirmação da especificidade dos anticorpos. A amostra, nesse caso, foi composta por 43 pacientes, sendo 24 selecionadas para compor o grupo controle e 19 pacientes com diagnóstico de SPE (MISTRY *et al.*, 2008). As coletas foram realizadas no *City Hospital, University of Nottingham*, Reino Unido, seguindo aprovação do Comitê de ética do *City Hospital* com consentimento das pacientes. Como no Projeto A, a pré-eclâmpsia foi rigorosamente definida de acordo com as diretrizes da ISSHP (BROWN *et al.*, 2001).

2.2.2.6 1 Dosagens das amostras

Tecido placentário

No tecido placentário, foram analisadas as moléculas CAV-1 a 3 e Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS a partir de seus RNAm, utilizando a técnica de PCR-TR, e proteínas utilizando Western Blot e imuno-histoquímica.

2.2.2.6 2 Técnicas utilizadas para análise das amostras

2.2.2.6 2.1 Ensaio de reação em cadeia da polimerase

Detalhes da sequência dos *primers* dos genes de interesse no Projeto B: CAV-1 a 3 e Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8 –Detalhe da sequência dos *primers* dos nove genes de interesse no estudo dos componentes da cavéola em pacientes com pré-eclâmpsia

Gene	Sequência BLAST No. de Acesso	<i>Primer</i>	Comprimento (pb)
CAV-1	NM_0.12232	5'-gacatctctacaccgttc-3' 5'-ttggtgtgcgcgtctac-3'	109
CAV-2	NM_001206747.1	5' aagcgggacgtacagctct 3' 5' ccagcttgagatgcgagttga 3'	135
CAV-3	NM_001234.4	5' ccttctgaaccactcttc 3' 5' atggggtatggagcagtc 3'	102
CAVIN-1	NM_00116011	5'-aggtgcgcaaggtcagcgtc-3' 5'-ccggcagcttcacttcactctgg-3'	153
CAVIN-2	NM_004657.5	5' gaagcggtggagaacaac 3' 5' ggcagggatctcattttct 3'	88
CAVIN-3	NM_145040.2	5' ggaggagggtgaagtcccagcc 3' 5' ctccaccggctcctctgtccg 3'	133
CAVIN-4	NM_001018116.1	5' aaaacaaattccgcgtgtg 3' 5' agatctactggggatcaaaga 3'	133
eNOS	NM_001172897.1	5'-accctcaccgtacaacat-3' 5'-gccttctgctcatttcca-3'	205
iNOS	NM_000625	5' accagtacgtttggcaatgg 3' 5' tcagcatgaagagcgatttct 3'	70

Fonte: Hentschke (2012). *Primers* utilizados no PCR-TR, Projeto B. CAV-1: Caveolina-1; CAV-2: Caveolina-2; CAV-3: Caveolina-3.

2.2.2.6 2.1 Ensaio de Western Blot

Introdução e definições

A técnica de Western Blot identifica proteínas baseadas em suas habilidades de se ligar a anticorpos específicos (BURNETTE, 1981). Primeiramente, as proteínas são separadas do tecido homogeneizado via gel de eletroforese, em seguida são transferidas para uma membrana que então permitirá a aplicação de anticorpos para detectar a proteína de interesse (HARPER, KIT e KRANGO, 1990). Inicialmente, deve ser aplicado um anticorpo primário que irá se ligar à proteína de interesse. Após a lavagem do anticorpo primário, o anticorpo secundário do mesmo animal é aplicado, o qual irá se ligar ao anticorpo primário (HARPER, KIT e KRANGO, 1990). Os reagentes de quimiluminescência adicionados na sequência se ligam ao anticorpo secundário, permitindo a visualização da proteína-alvo (LEONG, MILSTEIN e PANNELL, 1986). A análise do Western Blot pode fornecer informações sobre o tamanho da proteína e sua expressão proteica no tecido examinado.

Aproximadamente 100 mg de amostras de placenta ou miométrio (controle positivo) foram homogeneizadas em tampão de RIPA (1x PBS (pH 7.4), 0,1% SDS, 1% Igepal CA-630 e 0,5% desoxicolato de sódio) (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) com coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido), para evitar a proteólise. A concentração de proteína foi determinada por uma modificação do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), as amostras (25-30 µg/µl de proteína) foram colocadas em géis pré-moldados Novex (Invitrogen, Reino Unido), juntamente com uma escala de peso molecular da proteína. Realizou-se a eletroforese durante 1,5 horas a 170 V e transferiu-se para uma membrana de Difluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE-Healthcare) durante 1h a 30 V.

A imunodeteccção de proteínas foi realizada com anticorpos primários contra todas as proteínas de interesse. A deteccção do anticorpo primário foi realizada utilizando anticorpos antioelho, anticabra ou anticamundongo conjugados com peroxidase de rábano silvestre (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido). As proteínas foram visualizadas com agente quimioluminescente (GE Healthcare, Reino Unido). As descrições do protocolo padrão e dos tampões, assim como as diluições usadas na técnica de Western Blot, estão no Apêndice G.

Descrição dos anticorpos primários utilizados

Tabela 9 – Descrição dos anticorpos primários e suas diluições para ensaio de Western Blot e imuno-histoquímica

Nome do Produto/Descrição	Diluição WB	Diluição IHQ
CAV-1 Anti-CAV-1 – <i>Santa Cruz biotechnology, INC (sc-894)</i> . Coelho, policlonal	1:600	1:200
CAV-2 Anti-CAV2 – <i>Aviva systems biology, AVARP09020_P050</i> . Coelho, policlonal	1:500	1:200
CAV-3 Anti-CAV3 – <i>Aviva systems biology, AVARP09021_P050</i> . Coelho, policlonal	1:500	1:200
Cavin-1 Anti-PTRF, <i>BD Transduction Laboratories, 611258</i> . Camundongo, monoclonal	1:500	1:50
Cavin-2 Anti-SDPR– <i>Aviva systems biology ARP50499_P050</i> . Coelho, policlonal	1:500	1:50
Cavin-3 Anti-PRKCDBP–Ab 99427. Cabra, policlonal	1:1000	1:200
Cavin-4 Anti- MURC–Ab 121642. Coelho, policlonal	*	1:100
eNOS Anti-eNOS/NOS Type III, <i>BD Transduction Laboratories, 610297</i> . Camundongo, monoclonal	1:1500	1:100
iNOS Anti-NOS2 – <i>Aviva systems biology, ARP63000_P050</i> . Coelho, policlonal	1:500	1:50

Fonte: Hentschke (2012). Relação de anticorpos imuno-histoquímica e Western Blot. CAV-1: Caveolina-1; CAV-2: Caveolina-2; CAV-3: Caveolina-3; Cavin-1, Cavin-2, Cavin-3, Cavin-4 eNOS, iNOS.

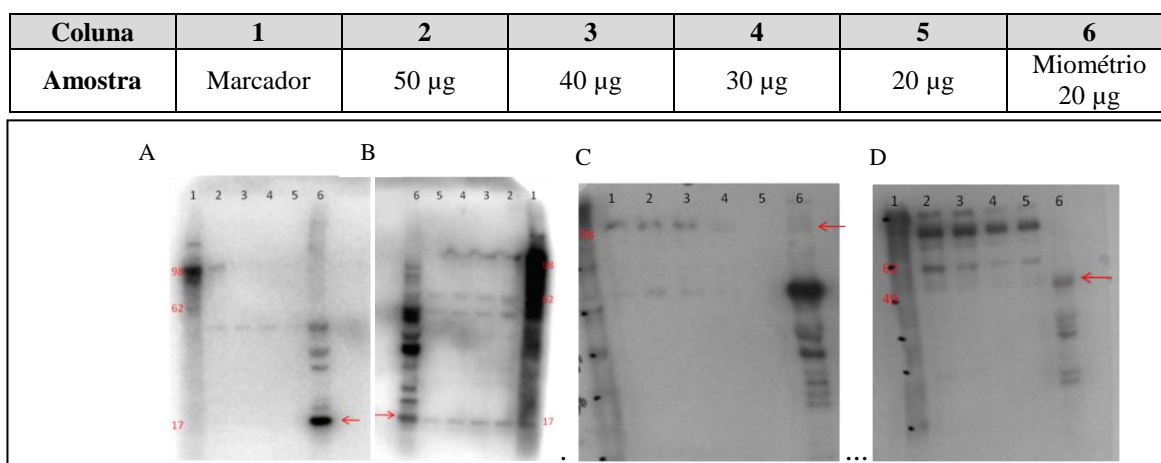
* Não foi possível realizar teste de Western Blot com Cavin-4.

Testes de diluições – Western Blot

As figuras abaixo contemplam os testes de diluições para a técnica de Western Blot, realizados com lise do tecido placentário. Na Figura 19a estão retratados os testes de diluição com quatro concentrações diferentes, para quatro proteínas, com o objetivo de avaliar qual seria a concentração ideal a ser utilizada em cada ensaio. Na Figura 19b, estão retratados os primeiros testes com amostras para iNOS e Cavin-2 com concentração de 30 μg . Por fim, na Figura 19c estão retratados os exemplos de teste com amostras das proteínas CAV-2, Cavin-2 e CAV-3.

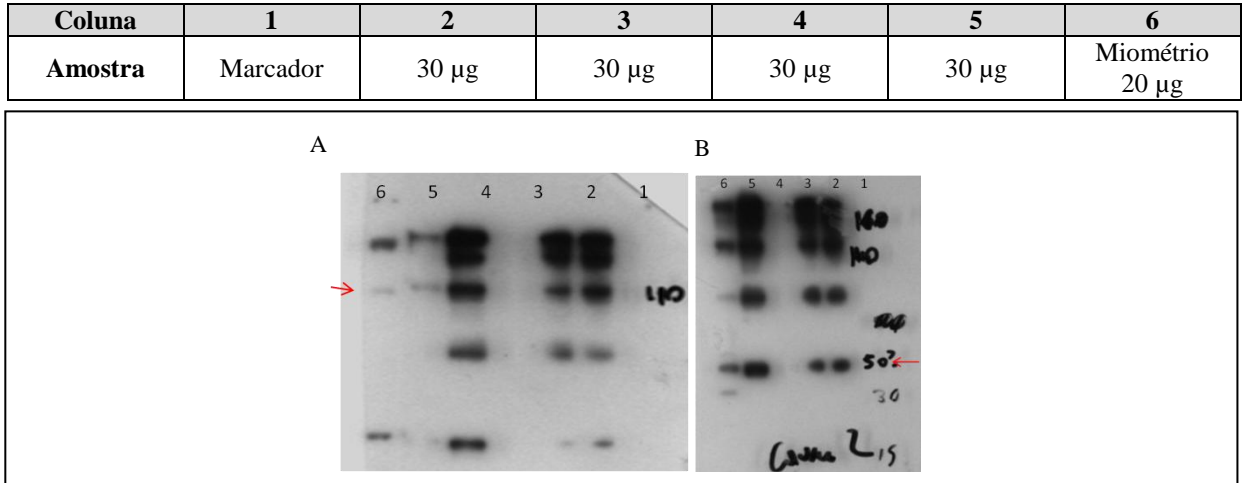
Figura 19– Ilustração de exemplos de testes de diluições para a técnica Western Blot para diferentes concentrações e moléculas específicas

Figura 19a – Ilustrações de quatro diferentes concentrações - análise da técnica Western Blot



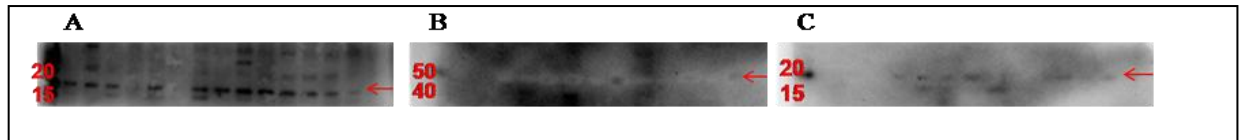
Fonte: Hentschke (2012). Exemplos de testes de diluições com a técnica Western Blot para quatro concentrações diferentes. A) Caveolina-2 (18kDa), B) Caveolina-3 (17kDa), C) iNOS (110kDa), D) Cavin-2 (47 kDa). iNOS: óxido nítrico sintase induzível.

Figura 19b – Ilustração de exemplos de testes com amostras com a técnica Western Blot para as moléculas de iNOS e Cavin-2



Fonte: Hentschke (2012). A) iNOS (110 kDa), B) Cavin-2 (47 kDa). Esse resultado foi publicado no site da *Aviva systems biology*

Figura 19c– Ilustração de exemplos de testes com amostras com a técnica Western Blot para as moléculas de Caveolina-2, Cavin-2 e Caveolina-3



Fonte: Hentschke (2012). A) Caveolina-2; B) Cavin-2; C) Caveolina-3.

2.2.2.6 2.2 Ensaio de imuno-histoquímica

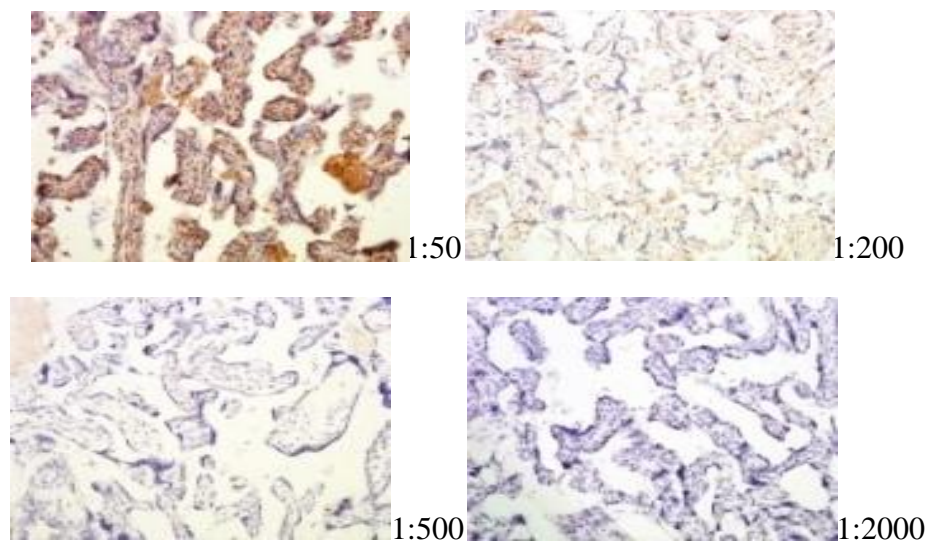
Protocolo e diluições imuno-histoquímica

As descrições de protocolo padrão, tampões e diluições usadas na técnica de imuno-histoquímica estão no Apêndice F. Utilizou-se do mesmo protocolo realizado no Projeto A, quando se avaliou a proteína LRP-1.

Testes de diluições – imuno-histoquímica

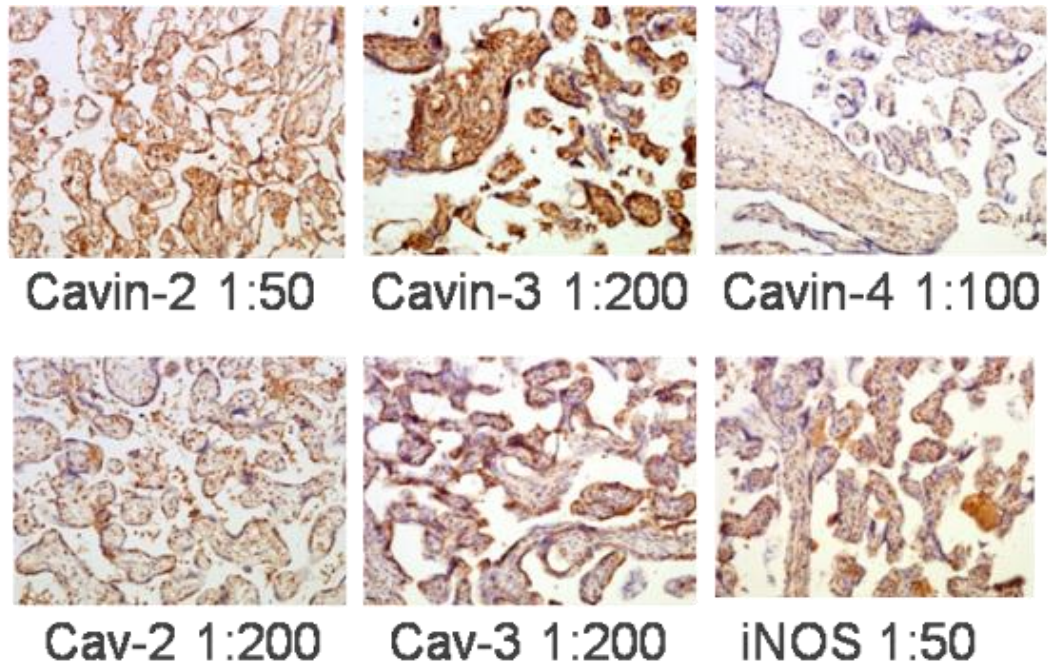
Todas as proteínas foram testadas para 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 e 1:2000, como mostra, em parte, o exemplo da Figura 20, com a proteína iNOS. A Figura 21 apresenta as diluições finais de seis das nove proteínas analisadas.

Figura 20 – Ilustração de exemplo de teste de diluições para análise imuno-histoquímica de uma proteína específica, no exemplo a óxido nítrico sintase indizível



Fonte: Hentschke (2012). Exemplo de teste de diluições imuno-histoquímica com óxido nítrico sintase induzível(iNOS). Todas as proteínas foram testadas para: 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 e 1:2000.

Figura 21– Ilustração das concentrações finais das proteínas Cavin-2-4, Caveolina-2, Caveolina-3 e iNOS para análise com imuno-histoquímica



Fonte: Hentschke (2012). Cav-2: Caveolina-2; Cav-3: Caveolina-3; iNOS: óxido nítrico sintase induzível. Representação das diluições finais para cada uma das proteínas ilustradas.

2.2.2.6 3 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados usando SPSS para Windows versão 20. Os dados foram apresentados como médias \pm DP ou mediana e IQR, conforme apropriado, teste *t* de Student ou teste U de Mann-Whitney foram usados, dependendo da distribuição dos dados, após o teste de Kolmogorov-Smirnov. As correlações entre os parâmetros foram testados com teste de correlação de Spearman. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

2.2.2.7 Resultados

2.2.2.7.1 Sujeito do estudo

Os sujeitos do estudo são os mesmo do Projeto A; no entanto, para o Projeto B, o número da amostra foi de 43 pacientes. Dessa forma, a descrição das pacientes está na sessão de resultados do Projeto A, sendo que os dados clínicos e bioquímicos das pacientes e dos

neonatos estão recalculados para a amostra menor, na Tabela 10, abaixo. As descrições clínicas foram anteriormente publicadas (MISTRY *et al.*, 2008).

Tabela 10 – Dados clínicos e bioquímicos dos sujeitos do estudo em relação a gestantes normais e com pré-eclâmpsia

Parâmetros maternos e fetais	GN (24)	PE (19)
Idade materna, anos	30,0 ± 7,0	32,0 ± 5,0
Primíparas, n (%)	14,0 (58)	14,0 (73)
Índice de massa corporal, kg/m ²	26,2 ± 5,3	26,4 ± 4,8
PAS, mmHg †	116,0 ± 5,0	156,0 ± 6,9 **
PAD, mmHg †	76,0 ± 3,0	97,0 ± 4,2 **
Proteinúria, g/L	-	1,0 [0,3; 11,5]
Idade gestacional no parto, semanas	40,1 ± 1,2	36,9 ± 3,8 **
Cesarianas, n (%)	4,0 (16,6)	8,0 (42,1) *
Peso fetal, kg	3,51 [3,25, 3,75]	3,14 [2,32; 3,53]**
Percentil fetal	45,0 [23, 64]	13 [2, 77]

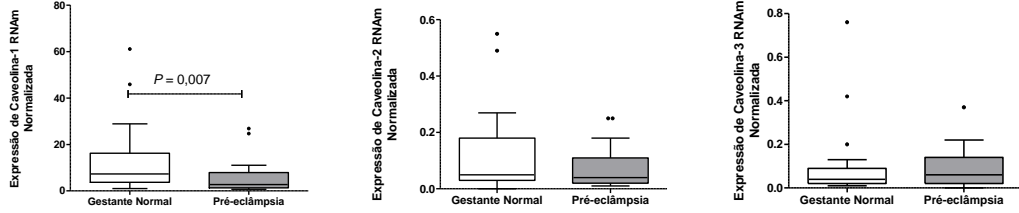
Fonte: Hentschke (2012). Dados clínicos e bioquímicos das participantes do estudo. Os dados estão apresentados em média±DP ou mediana [IQR] como apropriado, com exceção da proteinúria: mediana (min, Max) e da paridade (número (percentagem)). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ entre GN e com PE. † Máxima, fora do trabalho de parto.

2.2.2.7.2 Expressão placentária de RNAm

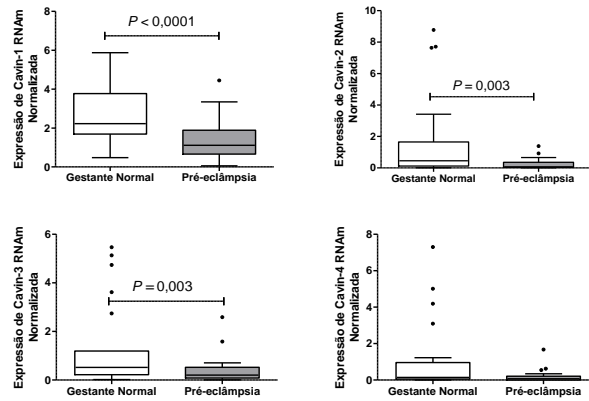
O resultado da expressão de RNAm de CAV-1 a 3, Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS em tecido placentário de gestantes normotensas e em mulheres com PE estão apresentados na Figura 22. Todos os genes analisados foram encontrados em tecido placentário. Em comparação com os controles normotensos, CAV-1 e Cavin-1 a 3 apresentaram uma expressão significativamente menor nas placentas pré-eclâmpicas ($p < 0,05$ para todas; Figuras 22a e 22b). CAV-2 e 3, e Cavin-4 não foram significativamente diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). Por outro lado, foi vista uma diminuição de eNOS na PE ($p = 0,045$; Figura 22c); iNOS não foi diferente entre os grupos ($p > 0,05$). Devido à diferença significativa entre as idades gestacionais entre controle *vs.* pré-eclâmpsia, o grupo PE foi subdividido em parto pré-termo (IG < 37 semanas, $n = 8$) e aqueles a termo ($n = 11$). Todas as diferenças previamente significativas permaneceram presentes na comparação entre os grupos ($p < 0,05$ para todos).

Figura 22 – Expressão placentária normalizada de RNAm de Caveolina-1 a 3, Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS em gestantes normais e pacientes com pré-eclâmpsia

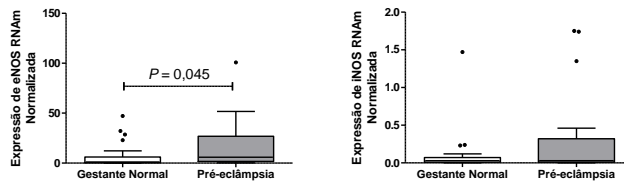
22a



22b



22c



Fonte: Mistry (2013). Expressão placentária normalizada de RNAm de a) Caveolina-1 a 3, b) Cavin-1 a 4 e c) eNOS e iNOS entre gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ e $p < 0,0001$. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; iNOS: óxido nítrico induzível.

2.2.2.7.3 Expressão placentária proteica

A expressão de todas as proteínas de CAV, Cavin, eNOS e iNOS em tecido placentário de pacientes GN e com SPE estão apresentadas na Tabela 11 e Figura 23.

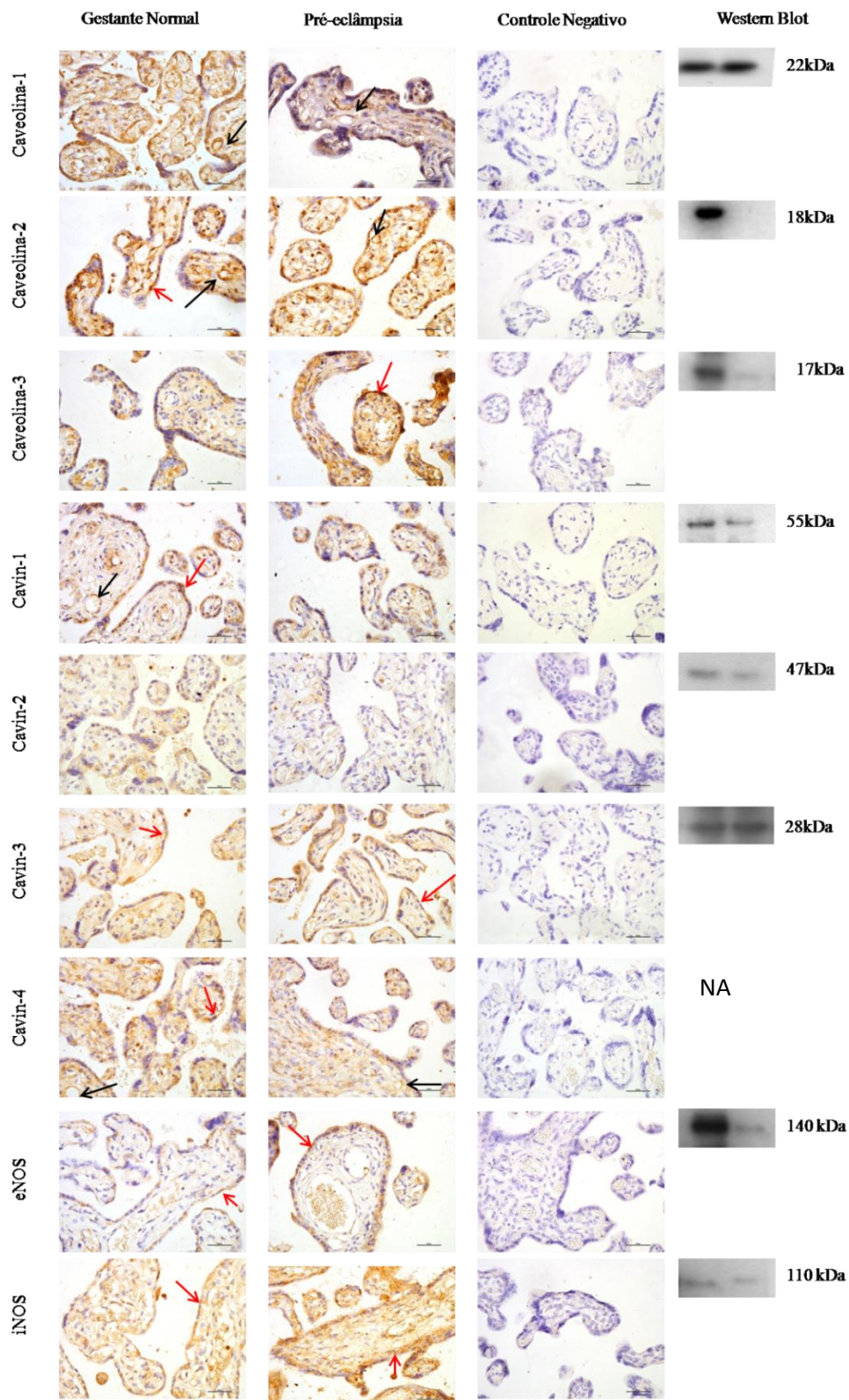
A especificidade dos anticorpos foi confirmada por Western Blot. A coloração para a maioria das isoformas CAV e Cavin foi localizada ao redor dos vasos fetais e fibroblastos, com coloração fraca em sinciciotrofoblasto. Por outro lado, tanto a expressão de eNOS quanto de iNOS foi localizada no sinciciotrofoblasto. Comparados aos controles normotensos, a expressão placentária da proteína CAV-1 foi significativamente reduzida na PE ($p = 0,001$; Tabela11). Não foram observadas diferenças significativas para todas as outras proteínas ($p > 0,05$).

Tabela 11 – Análise imuno-histoquímica. Expressão placentária de Caveolinas, Cavin, iNOS e eNOS em gestantes controles e com pré-eclâmpsia.

Proteína Mediana [IQR]	GN (n=24)	PE (n=19)
CAV-1	0,87 [0,82; 0,90]	0,78 [0,73; 0,82]*
CAV-2	0,75 [0,60; 0,85]	0,77 [0,52; 0,87]
CAV-3	0,55 [0,43; 0,67]	0,59 [0,45; 0,65]
Cavin-1	0,65 [0,61; 0,75]	0,61 [0,53; 0,72]
Cavin-2	0,57 [0,37; 0,66]	0,44 [0,30; 0,52]
Cavin-3	0,66 [0,58; 0,72]	0,62 [0,55; 0,72]
Cavin-4	0,52 [0,40; 0,67]	0,55 [0,48; 0,68]
Enos	0,77 [0,67; 0,83]	0,68 [0,60; 0,80]
Inos	0,68, [0,56; 0,82]	0,76 [0,67; 0,84]

Fonte: Hentschke (2013). GN: Gestante normal. PE: Pré-eclâmpsia. CAV-1: Caveolina-1. CAV-2: Caveolina-2. CAV-3: Caveolina-3. eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; iNOS: óxido nítrico induzível. * $p < 0,001$.

Figura 23—Expressão e localização das proteínas Caveolina-1 a 3, Cavin-1 a 4, eNOS e iNOS em placenta de gestantes normais e com pré-eclâmpsia



Fonte: Hentschke, Mistry, Czajka, Kurlak (2013). Caveolina-1 foi significativamente diminuída em pré-eclâmplicas em relação a placentas de pacientes normotensas ($p < 0,05$). A coloração positiva foi localizada principalmente ao redor dos vasos fetais (setas pretas) e alguma coloração fraca no sincitiotrofoblasto (setas vermelhas).

2.2.2.7.4 Análise de correlações

RNAm

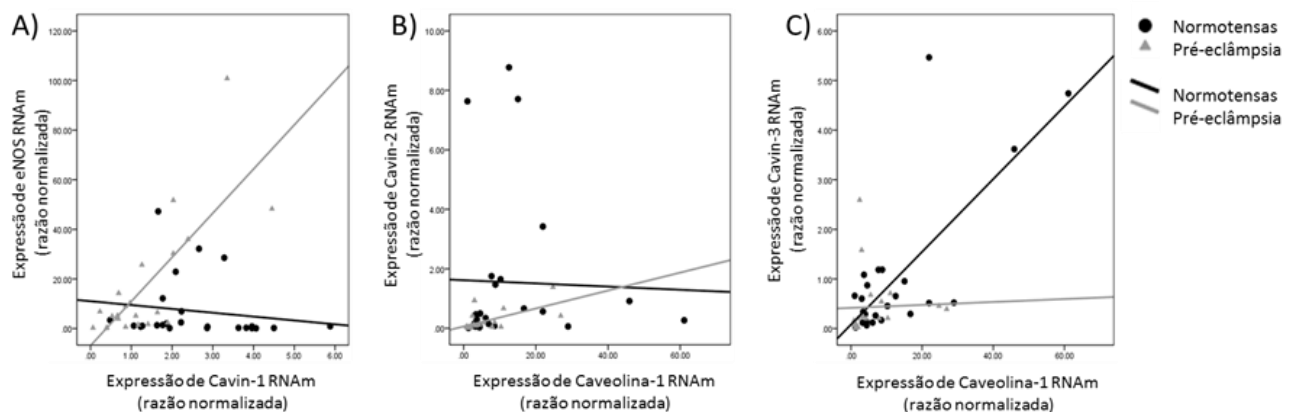
As Figuras 24 (a-c) apresentama análise de correlação entre expressões de RNAm das moléculas estudadas em relação a gestantes normotensas e pré-eclâmpticas.

Na Figura 24a está a correlação de Cavin-1 vs. eNOS RNAm. Uma associação positiva significativa foi encontrada para o grupo PE ($r = 0,584$, $p = 0,003$), mas não para o grupo controle ($p > 0,05$).

Na Figura 24b observou-se uma associação positiva significativa entre CAV-1 e Cavin-2 no grupo PE ($r = 0,626$, $p = 0,003$), mas não no grupo controle ($p > 0,05$). O total de dados foi altamente associado ($r = 0,53$, $p < 0,0001$).

A Figura 24c mostra que CAV-1 vs .Cavin-3 RNAm também estão positivamente correlacionada tanto no grupo controle quando no de PE ($r = 0,491$, $p = 0,015$, $r = 0,689$, $p = 0,001$, respectivamente). O total de dados também foi significativamente correlacionado positivamente ($r = 0,554$, $p < 0,0001$).

Figura 24 – Ilustração da análise de correlação entre expressões de RNAm das moléculas estudadas em relação a gestantes normotensas, pré-eclâmpticas e no grupo como um todo



Fonte: Mistry (2013). Análises de correlação: a) Cavin-1 RNAm vs. eNOS RNAm, PE e GN, b) Caveolin-1 RNAm vs. Cavin-2 RNAm, PE e GN, c) Caveolin-1 RNAm vs. Cavin-3 RNAm, PE e GN. PE: pré-eclâmpsia; GN: gestante normal.

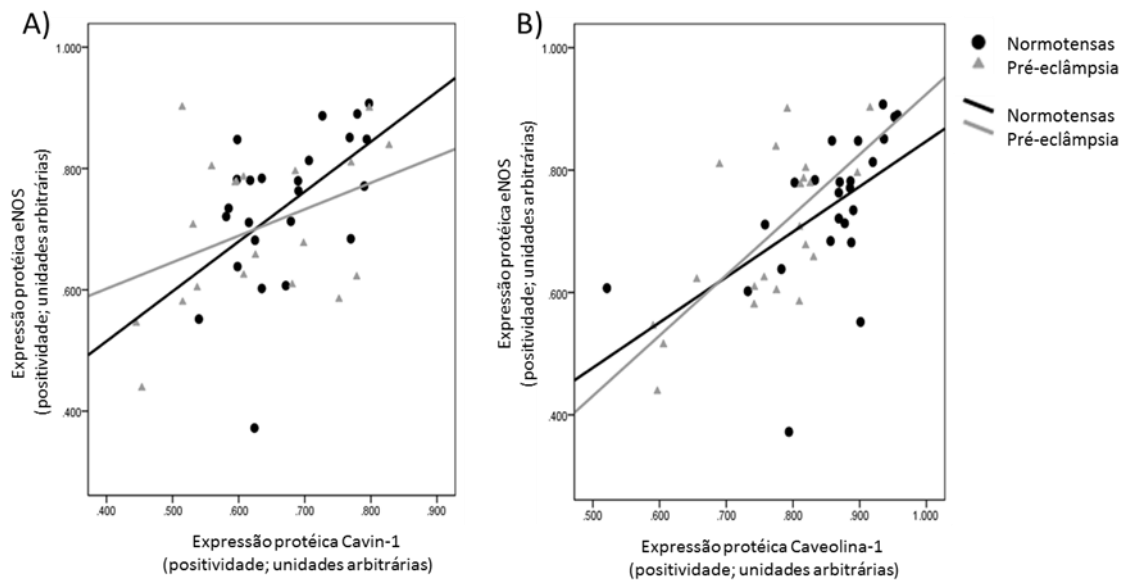
Imuno-histoquímica

As Figuras 25 (a, b) ilustram a análise de correlações entre expressões de proteínas das moléculas estudadas em relação a gestantes normotensas e pré-eclâmpticas.

A Figura 25a apresenta a correlação de Cavin-1 *vs.* eNOS, que foi igualmente correlacionado de forma positiva no grupo controle ($r = 0,518$, $p = 0,001$), mas não no grupo de PE ($p > 0,05$). O total de dados teve associação positiva ($r = 0,424$, $p = 0,004$).

Na Figura 25b, está representada a correlação de CAV-1 *vs.* eNOS, que, da mesma forma, também esteve associado de forma positiva tanto no grupo controle quanto no grupo de PE ($r = 0,647$, $p = 0,001$, $r = 0,622$, $p = 0,003$, respectivamente), o que também foi o caso para os dados globais ($r = 0,628$, $p < 0,0001$).

Figura 25– Ilustração da análise de correlação entre expressões de proteína das moléculas estudadas em relação a gestantes normotensas, pré-eclâmpticas e no grupo como um todo



Fonte: Mistry (2013). Análises de correlação: A) Cavin-1 *vs.* eNOS; B) Caveolina-1 *vs.* eNOS.

2.2.2.7.4.1 Correlação Projeto A com Projeto B

Após a análise dos dados do Bloco 2, Projeto A e Projeto B, e uma possível associação entre as moléculas estudadas, optou-se por correlacionar os achados de um projeto com o outro. A análise de correlação pode ser observada no Quadro 15.

Quadro 15 – Análise de correlação entre moléculas mediadoras de lipoproteínas com aquelas do complexo das cavéolas em gestantes normais e com pré-eclâmpsia

A) RNAm – GN	LDL-R	SRB1	ABCA1	LRP-1
Cavin-1	r=0,02 p=0,92	r=-0,13 p=0,53	r=-0,26 p=0,22	r=-0,34 p=0,12
Cavin-2	r=0,004 p=0,98	r=0,12 p=0,61	r=-0,06 p=0,79	r=-0,41 p=0,05
Cavin-3	r=0,09 p=0,66	r=0,19 p=0,35	r=0,23 p=0,28	r=0,03 p=0,89
Cavin-4	r=-0,31 p=0,12	r=-0,14 p=0,48	r=-0,006 p=0,97	r=-0,21 p=0,34
Caveolina-1	r=-0,15 p=0,48	r=0,10 p=0,64	r=0,46 p=0,024	r=0,29 p=0,17
Caveolina-2	r=0,38 p=0,054	r=0,37 p=0,06	r=0,32 p=0,12	r=0,26 p=0,23
Caveolina-3	r=0,88 p<0,001	r=0,68 p<0,001	r=0,37 p=0,079	r=0,33 p=0,12
eNOS	r=0,58 p=0,003	r=0,54 p=0,006	r=0,48 p=0,017	r=0,53 p=0,01
iNOS	r=0,70 p<0,001	r=0,40 p=0,039	r=0,32 p=0,12	r=0,34 p=0,12

B) RNAm - PE	LDL-R	SRB1	ABCA1	LRP-1
Cavin-1	r=0,27 p=0,25	r=0,06 p=0,82	r=0,77 p<0,001	r=0,85 p<0,001
Cavin-2	r=0,07 p=0,76	r=-0,06 p=0,81	r=0,15 p=0,55	r=-0,24 p=0,32
Cavin-3	r=0,15 p=0,52	r=-0,04 p=0,88	r=0,26 p=0,28	r=-0,13 p=0,59
Cavin-4	r=-0,03 p=0,90	r=-0,21 p=0,39	r=0,08 p=0,74	r=-0,32 p=0,18
Caveolina-1	r=-0,03 p=0,89	r=-0,13 p=0,59	r=0,62 p=0,004	r=0,36 p=0,13
Caveolina-2	r=0,57 p=0,009	r=0,29 p=0,22	r=0,23 p=0,35	r=-0,03 p=0,89
Caveolina-3	r=0,70 p=0,001	r=0,50 p=0,028	r=0,39 p=0,11	r=0,17 p=0,49
eNOS	r=0,57 p=0,009	r=0,40 p=0,081	r=0,61 p=0,005	r=0,68 p=0,002
iNOS	r=0,69 p=0,001	r=0,53 p=0,017	r=0,14 p=0,56	r=0,05 p=0,85

Correlação fraca (r:0,1-0,3)

Correlação moderada (r: 0,3-0,5)

Correlação forte (r:0,5-0,7)

Correlação muito forte (r:0,7-0,9)

Fonte: Hentschke (2013). LRP-1:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade – Proteína relacionadas 1, LDL-R:Receptor de lipoproteínas de baixa densidade, SRB1:ReceptorScavenger classe B tipo 1, ABCA1: Transportador humano – ATP-binding membro 1 subfamília ABCA. GN: gestante normal. PE: pré-eclâmpsia.

2.2.2.8 Discussão

Este é o primeiro relato detalhado do perfil da expressão placentária da cavéola combinado com eNOS e iNOS em mulheres com PE. Este estudo demonstra que as expressões de RNAm de Cavin-1, Cavin-2, Cavin-3 e CAV-1 estão diminuídas, enquanto eNOS está aumentado em placentas pré-eclâmpticas. Ainda, o nível da proteína CAV-1 esteve também significativamente reduzido nesse mesmo grupo. O aumento de eNOS em placentas pré-eclâmpticas está de acordo com estudos prévios (NAPOLITANO *et al.*, 2000; DOTTSCH *et al.*, 2001; FAXÉN, NISELL e KUBLICKIESE, 2001), sendo atribuído ao aumento e posterior maturação da placenta para controlar a resistência vascular através de mediadores parácrinos (DOTTSCH *et al.*, 2001). A localização placentária dos CAV-1 e eNOS também são semelhantes aos estudos anteriores (BYRNE *et al.*, 2001; LYDEN, ANDERSON e ROBINSON, 2002; LINTON *et al.*, 2003).

Foi previamente sugerido que o aumento de eNOS RNAm poderia ser um mecanismo compensatório em resposta a uma má placentação decorrente de redução do fluxo sanguíneo uteroplacentário. Portanto, um aumento no eNOS produziria um aumento NO, visando à vasodilatação da unidade uteroplacentária e à melhora do fluxo sanguíneo (MYATT *et al.*, 1997). Além disso, a expressão do gene eNOS pode estar aumentada em placentas pré-eclâmpticas devido ao estresse oxidativo (GALLE *et al.*, 1991). Essa hiper-regulação da eNOS em conjunto com o aumento no superóxido em placentas pré-eclâmpticas poderia levar à formação de peróxido, o que, por sua vez, poderia resultar na peroxidação lipídica e na disfunção endotelial, característica de pré-eclâmpsia. A diminuição da expressão de Cavin-1-3 e CAV-1 no presente estudo destaca outro possível mecanismo que explicaria esse aumento de eNOS: é possível que a redução de Cavin-1 resulte em uma redução de CAV-1, essa por sua vez, imobilizada na membrana plasmática, seria incapaz de exercer sua inibição tônica sobre eNOS, levando à expressão crônica e à hiper-regulação do mesmo.

A falta de Cavin-1 pode levar à redução no número total de cavéolas e de CAV-1 em células Hela, como tem sido relatado (HANSEN *et al.*, 2009). Da mesma forma, foi visto que um camundongo deficiente em Cavin-1 tem uma perda significativa de Cavin-3 e de todas as proteínas caveolinas (KARBALAEI *et al.*, 2012). Em células de mamíferos e no peixe Paulistinha (*zebrafish*), a perda de Cavin-1 e a redução do número de cavéolas aumentou a mobilidade lateral de CAV-1 (HILL *et al.*, 2008). Esses estudos nos permitem traçar paralelos com os resultados atuais, em que as expressões de RNAm de Cavin-1 e CAV-1 poderiam ser controladas de forma sinérgica (ex. a redução em um poderia levar a uma redução similar no

outro, através de um mecanismo adaptativo), potencialmente causando alterações na expressão de todos os outros Cavins e CAVs que são necessários para formar cavéola funcional. A associação positiva entre RNAm Cavin-1 e eNOS, apenas evidente no grupo de pré-eclâmpsia, sugere uma rota metabólica específica na pré-eclâmpsia envolvendo Cavin-1 e eNOS; no entanto, o papel de Cavin-1 na sinalização eNOS não é totalmente compreendido. Estudos com camundongos submetidos a *knockout* de Cavin-1 têm reforçado a liberação de NO em comparação com controles de tipo selvagem, mas a proliferação de células endoteliais, migração e diferenciação estavam ausentes neste estudo. As associações entre proteínas da cavéola (especialmente CAV-1) e a mitocôndria também foram relatadas. Fridolfsson e colaboradores relataram que as interações proteína-cavéola mitocondrial têm um efeito protetor sobre as células que sofreram estresse oxidativo (FRIDOLFSSON *et al.*, 2012). A transferência de CAV-3 para a mitocôndria protege as células dos danos através da indução de respiração e de adaptação ao estresse oxidativo mitocondrial (FRIDOLFSSON *et al.*, 2012). Ainda, células fibroblásticas de camundongos com deficiência de CAV-1 apresentam prejuízo na respiração mitocondrial e redução na defesa antioxidativa intrínseca, levando à apoptose (BOSCH *et al.*, 2011). Mudanças nos níveis de proteína CAV-1 na mitocôndria parecem influenciar nos níveis de colesterol livres em organelas, o que eventualmente afeta a função da mitocôndria e induz o estresse oxidativo seguido de apoptose. A redução da expressão de CAV-1 nas placentas pré-eclâmplicas pode, portanto, resultar na falta de efeito protetor na resposta celular para a injúria celular causada pelo estresse oxidativo e a apoptose.

2.2.2.9 Conclusão

Nossos achados apresentam evidências de uma rota metabólica em potencial em que a redução da CAV-1 na placenta leva à ativação crônica do eNOS na PE. Isso pode atenuar a vasoconstrição caracteristicamente vista na PE; por outro lado, isso pode ser consequência do estado de estresse oxidativo observado na PE. Embora essas diferenças em eNOS e Cavin-1 não sejam observadas nos níveis de proteína, modificações pós-translacionais podem afetar a localização e a atividade entre os grupos. Esses dados sustentam que Cavin-1 pode funcionar como um regulador de eNOS, quer esse seja mediado por CAV-1 (já que o *knockout* de Cavin-1 reduz CAV-1) (DAVALOS *et al.*, 2010), quer seja um mecanismo independente, ainda desconhecido. Novas alterações do complexo das cavéolas em placentas com pré-eclâmpsia sugerem a necessidade de trabalhos futuros com o objetivo de esclarecer os mecanismos subjacentes às modificações relatadas neste estudo.

2.2.2.9.1 Perspectivas

A fim de determinar se as diferenças encontradas são anteriores à eclosão da doença, estudos longitudinais são necessários, o que nos permitiria determinar se os resultados são causa ou efeito. A análise de placentas no primeiro e segundo trimestre de gravidez nos permitiria olhar para a expressão de RNAm e proteínas nas cavéola nos três trimestres da gravidez, auxiliando no entendimento do mecanismo dessas moléculas.

A crítica ação regulatória de CAV-1 sobre a angiogênese, os receptores da angiotensina II e eNOS, juntamente com os nossos resultados nas placentas pré-eclâmpicas, fazem dele um candidato ideal para futuras pesquisas a fim de ampliar o conhecimento em relação ao seu papel fisiológico na placenta e nas pacientes com pré-eclâmpsia. Da mesma forma, o novo achado de Cavin-1 e sua correlação positiva com eNOS merece uma investigação mais aprofundada em todos os domínios da fisiologia cardiovascular, já que pode ser um contribuinte ativo à reatividade vascular.

O artigo referente a esse trabalho encontra-se no Apêndice I, Artigo 5.

Conclusão Geral

3 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo analisou três diferentes grupos de moléculas possivelmente envolvidas na fisiopatologia da PE. Cada vertente partiu de objetivos específicos diferentes, mas o conjunto das três contemplou um objetivo geral: investigar moléculas que pudessem estar associadas com a PE, a fim de se tentar contribuir para a compreensão da fisiopatologia dessa doença, e, por conseguinte, encontrar possíveis biomarcadores para tal.

Bloco 1: no estudo chamado *Moléculas mediadoras e a fisiopatologia da pré-eclâmpsia*, o objetivo geral foi analisar e comparar níveis de Endocan-1, PlGF, LIGHT, TNF α , IL-6, MCP-1, NGF e Leptina, no plasma materno, plasma fetal e no tecido placentário de mulheres com SPE e GN, no terceiro trimestre da gestação. Este objetivo foi concluído com êxito. Todas essas moléculas mediadoras foram medidas nos três tipos de amostra estudados, podendo ser comparadas entre os dois grupos. Nossos achados sugeriram uma nova molécula até então avaliada em somente dois estudos, publicados apenas em forma de resumo, em relação à PE: a Endocan-1. Essa molécula, por apresentar-se aumentada em plasma materno de gestantes com SPE, pode ser alvo de futuros estudos se a considerarmos como concorrente para biomarcador dessa doença. O aumento dos níveis de TNF α também encontrado em SPE, em plasma materno, caracterizou a nossa amostra adequadamente, visto que o TNF α já está consagrado como uma citocina pró-inflamatória e sua relação com a SPE já foi vista em estudos prévios (SERIN *et al.*, 2002; KUMAR *et al.*, 2013). Da mesma forma, o achado de níveis de IL-6 diminuído em plasma fetal, nos remete à teoria de tolerância imunológica fetal, na tentativa de amenizar seu envolvimento na cascata inflamatória desencadeada na decídua materna no início da gestação (GAUNT e RAMIN, 2001; ARCK e HECHER, 2013). Em contradição à nossa hipótese, não encontramos aumento de níveis de citocinas pró-inflamatórias na placenta desta amostra.

Os resultados foram reavaliados após estratificações do grupo SPE em relação à IG materna, níveis de proteinúria e de PAS, bem como para um subgrupo em que excluímos gestantes com PES e síndrome HELLP, avaliando somente a PE pura; e um grupo em que subdividimos a SPE em PE pura e PES. O principal achado foi a visualização da Endocan-1 mantendo-se estatisticamente significativa em plasma materno em todas as estratificações da SPE, confirmando ainda mais a importância dessa molécula na SPE. Outro achado interessante foi em relação ao PlGF que se mostrou diminuído em pacientes com PE pura; na estratificação SPE precoce (IG < 34 semanas) e em níveis de proteinúria entre 0,3 – 0,5.

Atualmente, o PIGF tem sido visto como um potente biomarcador de PE (KRAUSS, PAUER e AUGUSTIN, 2004; GHOSH *et al.*, 2012; CHAPPELL *et al.*, 2013), o que caracteriza novamente a nossa amostra como estando de acordo com os achados encontrados em outros estudos. No entanto, a ideia do PIGF estar possivelmente correlacionado à proteinúria é um achado novo que deve ser melhor investigado em estudos futuros. O achado da Leptina aumentada na placenta de gestantes com SPE na maioria das estratificações também sugere essa molécula como possível biomarcador placentário de SPE. O fato de a citocina IL-6 ter se apresentado diminuída também na maioria das estratificações deixa ainda mais clara a ideia da tolerância fetal à exacerbação inflamatória materna, expressa por vários mecanismos como a redução inespecífica de imunorreatividade sistêmica (GAUNT e RAMIN, 2001; ARCK e HECHER, 2013).

Seguindo nos objetivos propostos, fizemos relações diversas entre os achados, tanto com a intenção de buscar correlações entre as citocinas e os dados clínicos maternos e fetais, quanto correlação de uma citocina e outra, objetivando entender como uma mesma citocina se comporta em relação às três amostras estudadas.

As citocinas pró-inflamatórias apresentaram uma série de correlações. Interessante constatar que quanto maior os níveis de MCP-1 em plasma fetal, menor foram a IG, o peso fetal e o peso placentário; sugerindo o envolvimento desta molécula com o trabalho de parto pré-termo, já observado em estudos prévios (ESPLIN *et al.*, 2005). Foi visto em amostra total de placenta e no grupo SPE, uma correlação direta forte entre MCP-1 e TNF α , assim como, no plasma fetal, entre a MCP-1 e a Endocan-1, ambas reguladas por TNF α (ESPLIN *et al.*, 2005); sugerindo uma interação na sinalização da matriz extracelular com a cascata inflamatória, no cordão umbilical. Em relação à citocina LIGHT, apesar de um estudo recente ter apresentado níveis circulantes e placentários aumentados em pacientes com SPE (WANG *et al.*, 2013), em nosso estudo, o LIGHT não foi diferente na comparação entre grupos em nenhuma das amostras. No entanto, ressalta-se uma correlação forte direta encontrada na placenta entre a IL-6 e a LIGHT no grupo SPE - achado que nos remetem ao mecanismo inflamatório de uma placenta pré-eclâmpica. O TNF α e IL-6 já foram associadas à SPE em diversos estudos prévios (SERIN *et al.*, 2002; GADONSKI *et al.*, 2006; XIA *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). No presente estudo, ambos apresentaram uma correlação positiva baixa entre plasma fetal e placenta, sendo a IL-6 também positivamente moderada entre plasma materno e placenta no grupo total. Por fim, a IL-6 esteve correlacionada positivamente na placenta do grupo SPE, tanto com o LIGHT quanto com

TNF α , indicando uma possível interação entre essas moléculas na sinalização celular placentária.

Em se tratando da molécula de Endocan-1 e variáveis clínicas, observa que quanto maiores os níveis de Endocan-1 em plasma materno e fetal, menores os pesos do feto e da placenta, e menor a idade gestacional materna no nascimento, mostrando uma correlação leve a moderada de níveis plasmáticos maternos e fetais de Endocan-1 com prematuridade e baixo peso. Ainda, à medida que os níveis de Endocan-1 aumentam no plasma materno, aumentam a PAS e PAD no final da gestação. Esse conjunto de achados nos remete a pensar na Endocan-1 como presente em casos mais graves de PE. Por ser uma citocina que revela ativação endotelial e ter apresentado magnitude moderada na SPE, concordamos com estudos prévios que sugerem a importância dessa molécula em patologias que apresentam dano vascular, como a SPE.

Por fim, em relação ao PIGF, foi observado que quanto maior o peso do recém nascido e da placenta, maior o nível de PIGF. Isso faz sentido visto que o PIGF é um fator de crescimento placentário e a placenta tem papel crucial na nutrição fetal. Correlações fortes entre o Endocan-1 materno e PIGF materno; TNF α placenta e MCP-1 placenta e ainda, Leptina na placenta com PIGF materno, mostraram que quanto maior o Endocan-1 materno e a Leptina placentária, menor o PIGF materno, em ambos os grupos (GN e SPE).

A hipótese de aumento das citocinas inflamatórias em plasma materno e placenta e diminuição em plasma fetal mantém-se, entretanto não pôde ser avaliada dentro de um único grupo de citocinas. Dessa forma, fica clara a importância de se analisar um grupo de moléculas concomitantemente, assim como mais de um tipo de amostra (plasma materno, plasma fetal e placenta).

Bloco 2A: no estudo chamado *Lipoproteínas e a pré-eclâmpsia* tínhamos como objetivo quantificar e comparar a expressão placentária de RNAm dos genes *LRP-1*, *LDL-R*, *SRB1*, *ABCA1*, *MTTP*, *PON-1*, *PDIA2* em gestantes com e sem PE. Esse objetivo foi alcançado, e a análise foi realizada para todos os genes propostos. No entanto, a expressão gênica só foi observada em *LRP-1*, *LDL-R*, *SRB1*, *ABCA1*, não sendo possível a comparação entre PE e GN para os demais genes propostos. A partir da análise estatística, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos no que diz respeito à expressão desses receptores e mediadores de lipoproteínas, indo de encontro à hipótese de que eles poderiam estar aumentados em PE em relação à GN como consequência, em parte pela hiperlipidemia gestacional exacerbada, supostamente encontrada na PE. O nosso segundo objetivo foi

analisar a concentração sérica de lipídios e lipoproteínas em sangue materno e do cordão umbilical e correlacionar com os achados placentários. Além de não encontrarmos diferença estatística entre os grupos no que diz respeito ao perfil lipídico, não houve nenhum tipo de associação com os receptores. Esses dados vão de encontro à literatura (LORENTZEN e HENRIKSEN, 1998; RAY *et al.*, 2006). Acreditamos que o aumento de perfil lipídico visto em estudos prévios em relação à PE possa se dar por alterações metabólicas maternas e não propriamente estar envolvida com a PE (CATAPANO *et al.*, 2011; EMET *et al.*, 2013), sendo um processo fisiológico da gestação. Ainda, visto que o colesterol é extremamente importante para o desenvolvimento fetal, e grande parte desse nutriente é proveniente de recursos maternos, optamos por correlacionar os níveis dos receptores e mediadores placentários com o percentil fetal. Encontramos expressão gênica diminuída de LRP-1 em placentas de gestantes do grupo PE com neonato PIG, a qual não foi observada para análise protéica com Imunohistoquímica, talvez pelo pequeno tamanho amostral. Sabe-se que o LRP-1 é altamente expresso em macrófagos e, por conseguinte, não é surpreendente que a expressão de LRP-1 esteja localizada principalmente nas células de *Hofbauer* (macrófagos fetais), as quais são encontradas predominantes no estroma das vilosidades coriônicas da placenta durante toda gestação (WOOD, 1980; BULMER e JOHNSON, 1984; GOLDSTEIN *et al.*, 1988) e desempenham um papel central no desenvolvimento e manutenção da placenta humana, pois secretam citocinas importantes para o crescimento e diferenciação do trofoblasto (KHAN *et al.*, 2000). Ainda, por o LRP-1 fazer a mediação de MMP-2, a diminuição do LRP-1 placentário poderia levar a diminuição de MMP-2, e um aumento de sua atividade de forma compensatória, contribuindo com a disfunção endotelial característica dessa molécula, e que é central para a fisiopatologia da pré-eclâmpsia e/ou PIGs.

A partir dessa análise, concluímos que o transporte placentário ainda precisa ser muito estudado, visto sua importância em patologias gestacionais, e para o seguimento desse estudo.

Bloco 2B: no estudo chamado de *Proteínas das cavéolas e a pré-eclâmpsia* objetivo foi analisar e comparar os genes e proteínas CAV-1, CAV-2, CAV-3, Cavin-1, Cavin-2, Cavin-3, Cavin-4, eNOS e iNOS em placentas de pacientes com e sem PE. O objetivo foi alcançado com êxito. Todas as moléculas foram visualizadas na placenta tanto em expressão gênica quanto protéica e comparada entre os grupos. Foi observada uma diminuição na expressão de RNAm de *Cavin-1*, *Cavin-2*, *Cavin-3* e *CAV-1*, e um aumento de eNOS em placentas pré-eclâmpicas. Em relação à expressão protéica, encontramos uma significância em relação aos níveis da proteína CAV-1, também significativamente reduzida nesse mesmo

grupo. Acredita-se que a redução de Cavin-1 resulte em uma redução de CAV-1, que imobilizada na membrana plasmática seria incapaz de exercer sua inibição tônica sobre eNOS, levando a expressão crônica e a hiperregulação do mesmo. Esse aumento de eNOS RNAm poderia também ser um mecanismo compensatório em resposta a uma má placentação decorrente de redução do fluxo sanguíneo útero-placentário. Portanto, um aumento no eNOS produziria um aumento NO, visando a vasodilatação da unidade uteroplacentária e a melhora do fluxo sanguíneo (MYATT *et al.*, 1997), podendo atenuar a vasoconstrição caracteristicamente vista na SPE.

Essa rota metabólica em potencial sugere a necessidade de trabalhos futuros com o objetivo de esclarecer os mecanismos subjacentes às modificações relatadas neste estudo.

Com o decorrer do trabalho, foi proposta outra análise objetivando correlacionar os níveis de RNAm dos receptores e mediadores lipídicos com as proteínas das Cavéolas, eNOS e iNOS. Ao observar que o possível envolvimento dos receptores de lipoproteínas presentes na membrana caveolar, como o SRB1, receptor de colesterol HDL, questionamos uma possível interação entre essas rotas metabólicas até então não estudadas em conjunto. Encontramos correlações fortes e muito fortes entre eNOS e receptores de lipoproteínas nos dois grupos, levando-nos a pensar no possível envolvimento do metabolismo fetal envolvido nessas rotas, em pacientes com PE, sendo uma proposta para estudos futuros.

3.1 COMENTÁRIOS FINAIS

A análise de moléculas mediadoras e sinalizadoras de processos inflamatórios e angiogênicos, estudo de lipoproteínas, seus receptores e a influência desses fatores em recém-nascidos PIG, e, ainda, a análise de proteínas das cavéolas na pré-eclâmpsia realizados neste estudo buscou um maior entendimento da fisiopatologia de uma das doenças hipertensivas gestacionais ampla e mundialmente estudada que ainda guarda muitas dúvidas quanto a sua real causa.

A busca incessante por um biomarcador de pré-eclâmpsia move uma gama de grandes pesquisadores comprometidos com o avanço do conhecimento e com a prática obstétrica na tentativa de auxiliar o homem a conquistar uma vitória na luta contra a principal causa de morte e morbidade materna e fetal no mundo. A certeza de um diagnóstico prévio às manifestações clínicas dessa patologia poderia orientar profissionais da saúde a tomar condutas mais objetivas, evitando desfechos desfavoráveis para o binômio mãe-feto. Da

mesma forma, a descoberta de um inibidor do processo desencadeador da pré-eclâmpsia poderia ser a peça-chave para a prevenção ou o tratamento de milhões de gestantes no mundo.

Por onde começar essa busca? Pelo início do processo? Quando o processo é desencadeado? Seria na fertilização, com a união de duas cadeias de DNA para a criação de uma nova vida, trazendo uma carga genética diferente da encontrada na mãe? Seria nas mitoses de um blastocisto, e na formação da placenta humana, ou em uma má sinalização do tecido embrionário à decídua materna? Seria uma reação imune materna ao concepto, como um aloenxerto? Seria na mediação inflamatória de uma placentação deficiente que comprometeria a circulação materna? Seria no descarte de restos placentários na circulação materna gerando uma cascata inflamatória sistêmica? Enfim, assim como é questionado quando começa a vida, tentando responder as grandes questões retratadas mundialmente em relação ao aborto, perguntamo-nos: quando começa a pré-eclâmpsia?

Pesquisadores reconhecidos nessa investigação apostam na ideia de uma placentação anômala, com conseguinte isquemia placentária, acarretando na liberação de uma variedade de moléculas, tanto pela placenta quanto por diversos tecidos, como o endotélio vascular, atingindo um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores; inflamatórios e antiinflamatórios; pró e antiangiogênicos até o aparecimento das manifestações clínicas da pré-eclâmpsia incluindo aquelas que são a base para seu diagnóstico: hipertensão arterial sistêmica e proteinúria patológica. Essa ideia tem sido trabalhada nos artigos científicos dos mais diversos países. Moléculas já analisadas em doenças cardiovasculares, processos inflamatórios sistêmicos, marcadores e receptores de lesão celular endotelial, fatores oncogênicos e etc., têm sido estudados na pré-eclâmpsia, grande parte em tecido placentário, com o objetivo de, assim como nós, entender o processo patológico dessa doença, no que diz respeito a essa cascata de mediadores desencadeados pela lesão placentária.

O terceiro trimestre de uma gestação normal parece ser um estado controlado de inflamação sistêmica, expressa por níveis elevados de proteína C reativa (SZARKA *et al.*, 2010). Da mesma maneira, se observarmos o início da invasão trofoblástica, principalmente a segunda onda de invasão, constatamos que essa cascata inflamatória já está presente desde o início da remodelação das artérias uterinas espiraladas.

Um estudo de revisão recente deixou clara a importância do estudo da implantação do blastocisto em patologias gestacionais. Sabe-se que, no início da gestação, o blastocisto adere e se implanta no revestimento endometrial uterino em processo de decidualização (diferenciação das células estromais endometriais em células ricas em glicogênio) sob a ação de progesterona e estrogênio (ARCK e HECHER, 2013). Nesse novo ambiente, o blastocisto

se diferencia em embrião e em células trofoblásticas extravilosas fetais. No primeiro trimestre da gestação, as células trofoblásticas expressam apenas um antígeno de linfócitos humanos (HLA) de moléculas de superfície, o que contribui com a tolerância imunológica fetal (GAUNT e RAMIN, 2001). Tanto as células trofoblásticas quanto as células da decídua expressam diferentes receptores de quimiocinas, facilitando a migração das células trofoblásticas na decídua, e a presença de leucócitos maternos nesse tecido (ARCK e HECHER, 2013). A existência de um estado inflamatório no início da gestação parece ser benéfica para o sucesso da implantação do conceito no útero (FEST *et al.*, 2007), e a mediação desse processo se dá através das células do trofoblasto, que, ao orientarem monócitos a produzir e secretar citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, TNF α) e quimiocinas (GRO α , MCP-1, MIP-1 β , RANTES), conseguem crescer e se desenvolver (FEST *et al.*, 2007), configurando a placenta e uma gestação saudável. Assim, a perda de possíveis sinapses funcionais entre as células trofoblásticas invasoras e as do sistema imune materno poderiam gerar um desequilíbrio nessa relação simbiótica entre feto e mãe.

Em uma das vertentes do nosso estudo, analisamos citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fator de crescimento placentário e a proteoglicana Endocan-1 em plasma materno, plasma fetal e placenta de gestantes com e sem pré-eclâmpsia, no terceiro trimestre da gestação. Os achados referentes a uma exacerbação inflamatória detectados pelo aumento de TNF α em gestantes com PE, assim como possível remodelação e reorganização da matriz extracelular notada pelo aumento de Endocan-1 nesse mesmo grupo, nos faz pensar em uma resposta exacerbada de um processo inflamatório fisiológico, assim como a uma resposta sem inibição do processo de cicatrização e remodelação da matriz extracelular. Essa suspeita, acompanhada de relatos relacionados ao aumento de colágeno e à inibição de metaloproteinases, (MMPs – principais proteases envolvidas na invasão trofoblástica) (COHEN *et al.*, 2012; KARTHIKEYAN *et al.*, 2013) nesse grupo, poderia levar à fibrose, então observada tanto no leito placentário, quanto no endotélio vascular. Lembrando que as proteínas da família MMP estão envolvidas na degradação da matriz extracelular, produção de moléculas bioativas e ativação de citocinas/quimiocinas em processos fisiológicos normais, tais como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelagem tecidual, bem como em processos patológicos, tais como artrite e metástases (SELVAIS *et al.*, 2011). A MMP-2, diferentemente das demais parece ter sua atividade aumentada em processos que envolvem disfunção endotelial.

A presença de citocinas e de fatores envolvidos na cascata da cicatrização e remodelação em grande quantidade, parece ser uma resposta exacerbada a um processo

fisiológico. Propõem-se como teoria que na PE ocorra alteração de um dado comando celular, o qual na gestação normal inibiria uma possível resposta cicatricial à lesão aplicada pela invasão do trofoblasto às artérias espiraladas, reconstituindo integralmente a musculatura lisa dos vasos, mantendo-os hígidos e com baixa perfusão sanguínea; um passo anterior à isquemia placentária. Mais anterior ainda, o próprio embrião, necessitando do sucesso na implantação, emite sinais que atenuam tanto a reação imune ao aloenxerto, quanto a resposta de restauração do endométrio ao qual está se fixando. Na PE o desbalanço entre mediadores, ativadores ou supressores da resposta materna à ‘lesão do aloenxerto’ evitaria a adequada penetração do ‘corpo estranho’, desencadeando um processo de cicatrização e recuperação do tecido ‘perdido’.

Em consequência a esse processo, encontraríamos então uma placenta pobre em nutrientes e isquêmica.

Em uma outra vertente, estudamos as influências causadas por esse processo hipoxêmico na sinalização de proteínas das cavéolas. Essa organela é um componente da membrana plasmática, composta por proteínas responsáveis pela sua estrutura e função. Encontramos que a redução da Cav-1 na placenta pode levar de forma compensatória à ativação crônica da eNOS a fim de atenuar a vasoconstrição característica na SPE. A presença de receptores como eNOS e VEGF, na membrana caveolar, corroboram com a idéia do envolvimento da cavéola em processos inflamatórios e angiogênicos. A importância do estudo do NO como vasodilatador endógeno já foi observada em estudos prévios do nosso grupo, assim como a rota da L-arginina (COSTA *et al.*, 2004; GALÃO *et al.*, 2004; PINHEIRO DA COSTA *et al.*, 2010), o GMP cíclico (PINHEIRO DA COSTA *et al.*, 2006) e sua possível influência na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, principalmente no estágio 2, quando as manifestações clínicas já estão presentes.

A partir da hipótese de que a lesão placentária lembra aquela da lesão aterosclerótica, e a fim de compreender o transporte lipídico para o feto – fonte de energia para seu crescimento e desenvolvimento – optamos como terceira e última vertente a análise das lipoproteínas maternas e fetais e dos receptores de colesterol na placenta. De forma interessante, observou-se que as lipoproteínas não foram diferentes entre os grupos, mas que um dos receptores de lipoproteínas, o LRP-1, estava diminuído em placentas de recém-nascidos PIG de mães com PE. Isso nos fez questionar possíveis influências de disfunções metabólicas prévias à gestação, em especial a obesidade materna, como um possível contribuinte para a exacerbação da hiperlipidemia gestacional e o envolvimento dos

receptores e mediadores lipoproteicos não diretamente com a PE, mas com o metabolismo fetal.

Por fim, como visto ao longo desta tese, estudos têm apontado a isquemia placentária decorrente de uma placentação anômala como o evento desencadeador da liberação de moléculas possivelmente envolvidas na PE. No entanto, antes de a isquemia ocorrer, ou até mesmo antes da existência da placenta, uma variedade de moléculas já se encontram em abundância na decídua materna e no tecido trofoblástico fetal, justamente na tentativa de tentar manter a invasão trofoblástica e garantir a evolução da gestação. Fica aqui, então, um questionamento: deveria o foco de futuras pesquisas ser mais voltado para esse período gestacional?

O valor da placenta; a incógnita da pré-eclâmpsia

Estariamos nós novamente na estaca zero? Afinal, um século após o início da busca pelo entendimento científico, não temos a causa nem a cura da pré-eclâmpsia, não sabemos exatamente o que ocorre nos primeiros dias de implantação do conceito no útero, nem mesmo quanto tempo é necessário a uma gestante desenvolver a pré-eclâmpsia. Sabemos apenas, assim como os primeiros estudiosos da toxemia gravídica, que a retirada da placenta é a peça-chave para a involução dos sintomas da pré-eclâmpsia. Poderíamos pensar, então, na placenta como uma entidade *per se*, e dizer até mesmo que só faltaria um DNA próprio para ser chamada de um ‘indivíduo de transição’: um composto de células programadas para viver não mais de 42 semanas, com uma sobrevivência curta ao se comparar com a daquele que ela alimenta, e que, por fim, é descartada pelos mamíferos junto com todo seu teor de proteína e outros nutrientes; um modelo celular humano para analisar possíveis doenças inflamatórias, angiogênicas, oncogênicas etc., que recebe em nove meses informações celulares de um corpo adulto e as repassa para um ser em formação. Algo extremamente valioso, mas intrigante. Patologias consequentes a sua irregularidade não poderiam ser menos do que grandes incógnitas.

Esta tese me trouxe um sentimento de amor e dedicação. Agradeço novamente a todos aqueles que acompanharam este trabalho e ajudaram a me tornar uma amante do “Estado Interessante” e uma pesquisadora engajada na busca incessante pelos dizeres da ciência e da medicina.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. **Cellular and Molecular Immunology**. 6.ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2010. 576 p

ACOSTA-SISON, H. Etiology of preeclampsia-eclampsia and the role of hydatidiform mole. **Obstet Gynecol**, v. 9, n. 2, p. 233-236, 1957.

AL-OTHMAN, S., et al. Differential levels of interleukin 6 in maternal and cord sera and placenta in women with pre-eclampsia. **Gynecol Obstet Invest**, v. 52, n. 1, p. 60-65, 2001.

ALDERTON, W. K., COOPER, C. E., KNOWLES, R. G.. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, 2001.

ALPOIM, P. N., et al. Preeclampsia and ABO blood groups: a systematic review and meta-analysis. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 3, p. 2253-2261, 2013.

ALVAREZ, J. J., et al. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. **J Lipid Res**, v. 37, n. 2, p. 299-308, 1996.

ANDERSON, R. G. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 23, p. 10909-10913, 1993.

ANDERSON, R. G., et al. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. **Science**, v. 255, n. 5043, p. 410-411, 1992.

ANDREW, P. J. e MAYER, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Cardiovasc Res**, v. 43, n. 3, p. 521-531, 1999.

APGAR, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. **Curr Res Anesth Analg**, v. 32, n. 4, p. 260-267, 1953.

ARCK, P. C. e HECHER, K. Hecher. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. **Nat Med**, v. 19, n. 5, p. 548-556, 2013.

ATALAH, E., et al. Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. **Rev Med Chil**, v. 125, n. 12, p. 1429-1436, 1997.

BAKER, A. H. e DELLES, C. Is microRNA-376c a biomarker or mediator of preeclampsia? **Hypertension**, v. 61, p. 4, p. 767-769, 2013.

BALTA, S., et al. Endocan--A Novel Inflammatory Indicator in Newly Diagnosed Patients With Hypertension: A Pilot Study. **Angiology**, 8 jan. 2014.

BECHARD, D., et al. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. **J Vasc Res**, v. 37, n. 5, p. 417-425, 2000.

BELO, L., et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. **Atherosclerosis**, v. 162, n. 2, p. 425-432, 2002.

- BERROUGUI, H., LOUED, S., KHALIL, A., Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 8, p. 1372-1381, 2012.
- BHATTACHARJEE, J., et al. Expression and localization of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in first trimester and term human placenta. **Placenta**, v. 31, n. 5, p. 423-430, 2010.
- BONNEY, V. "Pre-eclampsia" at the Twenty-fourth Week; Acute Toxaemia; Caesarean Section. **Proc R Soc Med**, v. 7 (Obstet Gynaecol Sect), p. 118-121, 1994.
- BOSCH, M., et al. Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility. **Curr Biol**, v. 21, n. 8, p. 681-686, 2011.
- BRAMHAM, K., et al. Association of proteinuria threshold in pre-eclampsia with maternal and perinatal outcomes: a nested case control cohort of high risk women. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76083, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN. **Série A. Normas e Manuais técnicos**, 2004.
- BREDT, D. S. e SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 22, p. 9030-9033, 1989.
- BRIAND, N., DUGAIL, I. LE LAY, S.. Cavin proteins: New players in the caveolae field. **Biochimie**, v. 93, n. 1, p. 71-77, 2011.
- BROUGHTON PIPKIN, F. Maternal Physiology. In: EDMONDS, D. K. *Dewhurst's textbook of obstetrics & Gynaecology*. London: Wiley-Blackwell, 2012. p. 5-15.
- BROWN, M. A., et al. The detection, investigation and management of hypertension in pregnancy: full consensus statement. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 40, n. 2, p. 139-155, 2000.
- BROWN, M. A., et al. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). **Hypertens Pregnancy**, v. 20, n. 1, p. IX-XIV, 2001.
- BUCCI, M., et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. **Nat Med**, v. 6, n. 12, p. 1362-1367, 2000.
- BULMER, J. N. e JOHNSON, P. M. Johnson Macrophage populations in the human placenta and amniochorion. **Clin Exp Immunol**, v. 57, n. 2, p. 393-403, 1984.
- BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal Biochem**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

BURTON, G. J., JAUNIAUX, E., CHARNOCK-JONES, D. S.. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. **Placenta** 28, Suppl A, p. S64-69, 2007.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

BYRNE, S., et al. Immunocytochemical localization of a caveolin-1 isoform in human term extra-embryonic membranes using confocal laser scanning microscopy: implications for the complexity of the materno-fetal junction. **Placenta**, v. 22, n. 6, p. 499-510, 2001.

CASINO, P. R., et al. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. **Circulation**, v. 88, n. 6, p. 2541-2547, 1993.

CATAPANO, A. L., et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). **Atherosclerosis**, v. 217, n. 1, p. 3-46, 2011.

CATARINO, C., et al. Fetal lipoprotein changes in pre-eclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 87, n. 6, p. 628-634, 2008.

CAUGHEY, A. B., et al. Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 106, n. 1, p. 156-161, 2005.

CETIN, I., et al. Fetal growth restriction: a workshop report. **Placenta**, v. 25, n. 8-9, p. 753-757, 2004.

CHAPPELL, L. C., et al. Diagnostic accuracy of placental growth factor in women with suspected preeclampsia: a prospective multicenter study. **Circulation**, v. 128, n. 19, p. 2121-2131, 2013.

CLARK, P. e WU, O. ABO(H) blood groups and pre-eclampsia. A systematic review and meta-analysis. **Thromb Haemost**, v. 100, n. 3, p. 469-474, 2008.

COHEN, M., et al. Expression of metalloproteinases 1, 2, 7, 9, and 12 in human cytotrophoblastic cells from normal and preeclamptic placentas. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 33, n. 4, p. 406-411, 2012.

CONDE-AGUDELO, A. e BELIZAN, J. M. Risk factors for pre-eclampsia in a large cohort of Latin American and Caribbean women. **BJOG**, v. 107, n. 1, p. 75-83, 2000.

COSTA, B. P., et al. L-Arginine erythrocyte transport in normal pregnant and preeclamptic women. **Am J Obstet Gynecol**, v. 190, n. 2, p. 468-471, 2004.

COSTA, L. G., et al. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. **Biochem Pharmacol**, v. 69, n. 4, p. 541-550, 2005.

COZZI, V., et al. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 1039-1044, 2012.

CROSS S., et al. Endocan (ESM-1): A novel soluble endothelial cell injury marker in preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR). **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 28, n. 1, Suplem. p. S276, 2013

CUCHEL, M. e RADER, D. J. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? **Circulation**, v. 113, n. 21, p. 2548-2555, 2006.

DARMOCHWAL-KOLARZ, et al. T helper 1- and T helper 2-type cytokine imbalance in pregnant women with pre-eclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 86, n. 2, p. 165-170, 1999.

DATASUS, <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/C03b.htm>>, acesso 02/04/2014, às 18h)

DAVALOS, A., et al. Quantitative proteomics of caveolin-1-regulated proteins: characterization of polymerase i and transcript release factor/CAVIN-1 IN endothelial cells. **Mol Cell Proteomics**, v. 9, n. 10, p. 2109-2124, 2010.

DEKKER, G. e SIBAI, B. Primary, secondary, and tertiary prevention of pre-eclampsia. **Lancet**, v. 357, n. 9251, p. 209-215, 2001.

DENISON, F. C., et al. Cytokine secretion by human fetal membranes, decidua and placenta at term. **Hum Reprod**, v. 13, n. 12, p. 3560-3565, 1998.

DEPONTIEU, F., et al. Development of monoclonal antibodies and ELISA specific for the mouse vascular endocan. **J Immunol Methods**, v. 378, n. 1-2, p. 88-94, 2012.

DESOYE, G., GAUSTER, M., WADSACK, C. Placental transport in pregnancy pathologies. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 6 Suppl, p. 1896S-1902S, 2011.

DESOYE, G., et al. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 64, n. 4, p. 704-712, 1987.

DESOYE, G. e SHAFRIR, E. Shafrir. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. **Mol Aspects Med**, v. 15, n. 6, p. 505-682, 1994.

DEVECI, K., et al. Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 35, n. 1, p. 94-98, 2009.

DIAS, R. G., NEGRÃO, C. E., KRIEGER, M. H. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n. 1, 2011.

DOTSCH, J., et al. Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 97, n.2, p. 163-167, 2001.

- DULEY, L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. **Semin Perinatol**, v. 33, n. 3, p. 130-137, 2009.
- DULEY, L., MEHER, S., ABALOS, E. Management of pre-eclampsia. **BMJ**, v. 332, n. 7539, p. 463-468, 2006.
- DURR, E., et al. Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. **Nat Biotechnol**, v. 22, n. 8, p. 985-992, 2004.
- DUTTA-ROY, A. K. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 315S-322S, 2000.
- ECONOMIDES, D. L., PROUDLER, A., NICOLAIDES, K. H. Plasma insulin in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. **Am J Obstet Gynecol**, v. 160, n. 5 Pt 1, p. 1091-1094, 1989.
- EHSANIPOOR, R. et al. Nitric oxide and carbon monoxide production and metabolism in preeclampsia. **Reprod Sci**, v. 20, n. 5, p. 542-548, 2013.
- EL SHAHAT, A. M., et al. Maternal serum leptin as a marker of preeclampsia. **Arch Gynecol Obstet**, v. 288, n. 6, p. 1317-1322, 2013.
- EMET, T., et al. Plasma lipids and lipoproteins during pregnancy and related pregnancy outcomes. **Arch Gynecol Obstet**, v. 288, n. 1, p. 49-55, 2013.
- EMET, T., et al. Plasma lipids and lipoproteins during pregnancy and related pregnancy outcomes. **Arch Gynecol Obstet**, v. 288, n. 1, p. 49-55, 2013.
- ERLICH, H. A., GELFAND, D., SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1643-1651, 1991.
- ESPLIN, M. S., et al. Monocyte chemotactic protein-1 expression is increased in human gestational tissues during term and preterm labor. **Placenta**, v. 26, n. 8-9, p. 661-671, 2005.
- ETHIER-CHIASSEON, M., et al. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 359, n. 1, p. 8-14, 2007.
- FAXEN, M., NISELL, H., KUCLICHIIENE, K. R.. Altered mRNA expression of ecNOS and iNOS in myometrium and placenta from women with preeclampsia. **Arch Gynecol Obstet**, v. 265, n. 1, p. 45-50, 2001.
- FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Projeto Diretrizes. Assistência Pré-Natal. Elaboração Final: 11 de junho de 2006
- FERON, O. e KELLY, R. A. The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. **Circ Res**, v. 88, n. 2, p. 129-131, 2001.
- FERREIRO, C. R., et al. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 9, p. 1313-1320, 2004.

FEST, S., et al. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, v. 57, n. 1, p. 55-66, 2007.

FIELDING, P. E. e FIELDING, C. J. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. **Biochemistry**, v. 34, n. 44, p. 14288-14292, 1995.

FREITAS, Fernando. **Rotinas em Obstetrícia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 904p

FRIDOLFSSON, H. N., et al. Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury. **FASEB J**, v. 26, n. 11, p. 4637-4649, 2012.

FUJIMOTO, T., et al. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. **J Cell Sci**, v. 113, n. Pt 19, p. 3509-3517, 2000.

FURCHGOTT, R. F. e ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GADONSKI, G., et al. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 711-716, 2006.

GALÃO, A. O., et al. L-arginine erythrocyte transport increases during pregnancy and immediately postpartum. **Am J Obstet Gynecol**, v. 191, n. 2, p. 572-575, 2004.

GALÃO, Adriani. Oliveira. **Polimorfismos genéticos na pré-eclâmpsia**. 2004. Tese. (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde)-Faculdade de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, 2004.

GALLE, J., et al. Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor. **Arterioscler Thromb**, v. 11, n. 1, p.: 198-203, 1991.

GARCIA-CARDENA, G., et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. **J Biol Chem**, v. 272, n. 41, p. 25437-25440, 1997.

GARDOSI J. Customised assessment of fetal growth potential: implications for perinatal care. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 97, n. 5, p. F314-317, 2012.

GAROVIC, V. D. Hypertension in pregnancy: diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc**, v. 75, n. 10, p. 1071-1076, 2000.

GAUNT, G. e RAMIN, K. Immunological tolerance of the human fetus. **Am J Perinatol**, v. 18, n. 6, p. 299-312, 2001.

GAUSTER, M., et al. Dysregulation of placental endothelial lipase and lipoprotein lipase in intrauterine growth-restricted pregnancies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 6, p. 2256-2263, 2007.

GEORGE, E. M. e GRANGER, J. P. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. **Curr Hypertens Rep**, v. 13, n. 4, p. 269-275, 2011.

GHIO, A., et al. (2011). Triglyceride metabolism in pregnancy. **Adv Clin Chem**, v. 55, p. 133-153, 2011.

GHOSH, S. K., et al. Serum PLGF as a potential biomarker for predicting the onset of preeclampsia. **Arch Gynecol Obstet**, v. 285, n. 2, p. 417-422, 2012.

GHOSH, S. K., et al. Is serum placental growth factor more effective as a biomarker in predicting early onset preeclampsia in early second trimester than in first trimester of pregnancy? **Arch Gynecol Obstet**, v. 287, n. 5, p. 865-873, 2013.

GHULMIYYAH, L. e SIBAI, B. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. **Semin Perinatol**, v. 36, n. 1, p. 56-59, 2012.

GIBSON, U. E., HEID, C. A., WILLIAMS, P. M.. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996.

GILBERT, J. S., et al. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 2, p. H541-550, 2008.

GIRARDI, G., et al. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. **J Exp Med**, v. 203, n. 9, p. 2165-2175, 2006.

GLOMSET, J. A. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. **J Lipid Res**, v. 9, n. 2, p. 155-167, 1968.

GOLDMAN e AUSIELLO. Cecil, Tratado de medicina interna. Ed. 22° Elsevier, 2005.

GOLDSTEIN, J., et al. The phenotype of human placental macrophages and its variation with gestational age. **Am J Pathol**, v. 133, n. 3, p. 648-659, 1988.

GRILL, S., C. et al. Potential markers of preeclampsia--a review. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 7, n. 70, 2009.

GRUBER, C. W., et al. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 8, p. 455-464, 2006.

HANSEN, C. G., et al. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 7, p. 807-814, 2009.

HANSEN, C. G. e NICHOLS, B. J. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. **Trends Cell Biol**, v. 20, n. 4, p. 177-186, 2010.

HARPER, D. R., KIT, M. L., KRANGRO, H. O.. Protein blotting: ten years on. **J Virol Methods**, v. 30, n. 1, p. 25-39, 1990.

HENTSCHKE, M. R., et al. Is the atherosclerotic phenotype of preeclamptic placentas due to altered lipoprotein concentrations and placental lipoprotein receptors? Role of a small-for-gestational-age phenotype. **J Lipid Res**, v. 54, n. 10, p. 2658-2664, 2013.

HENTSCHKE, M. R., et al. Is there any relationship between ABO/Rh blood group and patients with pre-eclampsia? **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2014.03.003>> Acesso em 09 abr 2014.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43-55, 2002.

HERRERA, E., et al. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. **Horm Res**, v. 65, Suppl 3, p. 59-64, 2006.

HERRERA, E., et al. Relationship between plasma fatty acid profile and antioxidant vitamins during normal pregnancy. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 9, p. 1231-1238, 2004.

HILL, M. M., et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 113-124, 2008.

HOPKINS, K. Are Brazilian women really choosing to deliver by cesarean? **Soc Sci Med**, v. 51, n. 5, p. 725-740, 2000.

HUPPERTZ, B. The Placenta and Fetal Membranes. **Dewhurst's textbook of obstetrics & Gynaecology**. D. K. Edmonds, 2012. p. 16-25.

HUSSAIN, M. M., et al. Multiple functions of microsomal triglyceride transfer protein. **Nutr Metab (Lond)**, v. 9, n. 14, 2012.

HUSSAIN, M. M., STRICKLAND, D. K., BAKILLAH, A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 141-172, 1999.

IBGE. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios**. 2011. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000010135709212012572220530659.pdf>>.

IGNARRO, L. J., et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

JONES, H. N., POWELL, T. L., JANSSON, T.. Regulation of placental nutrient transport--a review. **Placenta**, v. 28, n. 8-9, p. 763-774, 2007.

JONSSON, Y., et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. **J Reprod Immunol**, v. 70, n. 1-2, p. 83-91, 2006.

JOOST S., J. W., et al. New prognostic marker for the risk to develop early-onset preeclampsia. **Pregnancy Hypertension**, v. 3, n. 2, p. 94-95, 2013.

JAOUAD L, MILOCHEVITCH C, KHALIL A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. **Free Radic Res.** v. 37, n. 1, p. 77-83.

JUNIOR, M. D. C. Fisiopatologia da Pré-eclâmpsia: aspectos atuais. **Femina**, v. 37, n. 5, p. 247-253, 2009.

KADYROV, M., et al. Maternal-placental interactions and fetal programming. **Z Geburtshilfe Neonatol**, v. 217, n. 3, p. 88-94, 2013.

KARBALAEI, M. S., et al. Impaired contractility and detrusor hypertrophy in cavin-1-deficient mice. **Eur J Pharmacol**, v. 689, n. 1-3, p. 179-185, 2012.

KARTHIKEYAN, V. J., et al. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in hypertension-related pregnancy complications. **J Hum Hypertens**, v. 27, n. 2, p. 72-78, 2013.

KAUMA, S., et al. Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia. **Obstet Gynecol**, v. 100, n. 4, p. 706-714, 2002.

KELLY, A., et al. A WHO Collaborative Study of Maternal Anthropometry and Pregnancy Outcomes. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 53, n. 3, p. 219-233, 1996.

KHALIL, M. M. e ALZAHRA, E. Fetal gender and pregnancy outcomes in Libya: a retrospective study. **Libyan J Med** 8, 2013.

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

KHAN, S., et al. Human villous macrophage-conditioned media enhance human trophoblast growth and differentiation in vitro. **Biol Reprod**, v. 62, n. 4, p. 1075-1083, 2000.

KILARI, A., et al. Nerve growth factor, birth outcome and pre-eclampsia. **Int J Dev Neurosci**, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2011.

KIM, J. H., et al. Expression of endothelial cell-specific molecule-1 regulated by hypoxia inducible factor-1alpha in human colon carcinoma: impact of ESM-1 on prognosis and its correlation with clinicopathological features. **Oncol Rep**, v. 28, n. 5, p. 1701-1708, 2012.

KNOPP, R. H., et al. (1986). Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. **Biol Neonate**, v. 50, n. 6, p. 297-317, 1986.

KNOWLES, R. G., et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 13, p. 5159-5162, 1989.

KONIECZNY, A., et al. Podocytes in urine, a novel biomarker of preeclampsia? **Adv Clin Exp Med**, v. 22, n. 2, p. 145, 2013.

KRAUSS, T., PAUER, H. U., AUGUSTIN, H.G. Prospective analysis of placenta growth factor (PIGF) concentrations in the plasma of women with normal pregnancy and pregnancies complicated by preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 23, n. 1, p. 101-111, 2014.

KUBISTA, M., et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KUC, S., et al. Evaluation of 7 serum biomarkers and uterine artery Doppler ultrasound for first-trimester prediction of preeclampsia: a systematic review. **Obstet Gynecol Surv**, v. 66, n. 4, p. 225-239, 2011.

KUMAR, A., et al. IL-10, TNF-alpha & IFN-gamma: potential early biomarkers for preeclampsia. **Cell Immunol**, v. 283, n. 1-2, p. 70-74, 2013.

LAHTINEN, U., et al. Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. **FEBS Lett**, v. 538, n. 1-3, p. 85-88, 2003.

LAMARCA, B. The role of immune activation in contributing to vascular dysfunction and the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. **Minerva Ginecol**, v. 62, n. 2, p. 105-120, 2010.

LAMARCA, B. D., GILBERT, J., GRANGER, J. P.. Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p.: 982-988, 2008.

LAMARCA, B. D., et al. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. **Curr Hypertens Rep**, v. 9, n. 6, p. 480-485, 2007.

LANGMANN, T., et al. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 1, p. 29-33, 1999.

LAPAIRE, O., et al. Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. **Fetal Diagn Ther**, v. 31, n. 3, p. 147-153, 2012.

LARESGOITI-SERVITJE, E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. **J Leukoc Biol**, 2013.

LASSALLE, P., et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. **J Biol Chem**, v. 271, n. 34, p. 20458-20464, 1996.

LAU, S. Y., et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. **Am J Reprod Immunol**, v. 70, n. 5, p. 412-427, 2013.

LAZAROCIVI, P., MARCINKIEWICZ, C., LELKES, P.I. Cross talk between the cardiovascular and nervous systems: neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic effects of nerve growth factor (NGF)-implications in drug development. **Curr Pharm Des**, v. 12, n. 21, p. 2609-2622, 2006.

- LEE, W. H., et al. Tumor necrosis factor receptor superfamily 14 is involved in atherogenesis by inducing proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 12, p. 2004-2010, 2001.
- LEONG, M. M., MILSTEIN, C., PANNELL, R. Luminescent detection method for immunodot, Western, and Southern blots. **J Histochem Cytochem**, v. 34, n. 12, p. 1645-1650, 1986.
- LIMA, V. J., et al. Serum lipid levels in pregnancies complicated by preeclampsia. **Sao Paulo Med J**, v. 129, n. 2, p.73-6. 2011.
- LINDEGAARD, M. L., et al. Endothelial and lipoprotein lipases in human and mouse placenta. **J Lipid Res**, v. 46, n. 11, p. 2339-2346, 2005.
- LINTON, E. A., et al. Caveolae and caveolin-1 in human term villous trophoblast. **Placenta**, v. 24, n. 7, p. 745-757, 2003.
- LIU, L. e PILCH, P. F. A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. **J Biol Chem**, v. 283, n. 7, p. 4314-4322, 2008.
- LORENTZEN, B. e HENRIKSEN, T. Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia. **Semin Reprod Endocrinol**, v. 16, n. 1, p. 33-39, 1998.
- LOWE, S. A., et al. Guidelines for the management of hypertensive disorders of pregnancy 2008. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 49, n. 3, p. 242-246, 2009.
- LOWRY, O. H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- LYDEN, T. W., ANDERSON, C. L., ROBINSON, J. M. The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae. **Placenta**, v. 23, n. 8-9, p. 640-652, 2002.
- MADAZLI, R., et al. Maternal plasma levels of cytokines in normal and preeclamptic pregnancies and their relationship with diastolic blood pressure and fibronectin levels. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 82, n. 9, p. 797-802, 2003.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927-930, 1994.
- MARTINS-COSTA, S. H. Doença Hipertensiva na Gravidez. In: FREITAS, F. *Rotinas em Obstetrícia*. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.523-552.
- MARY, S., et al. Dynamic proteome in enigmatic preeclampsia: an account of molecular mechanisms and biomarker discovery. **Proteomics Clin Appl**, v. 6, n. 1-2, p. 79-90, 2012.
- MATHEW, R. Cell-specific dual role of caveolin-1 in pulmonary hypertension. **Pulm Med**, v. 2011, artigo: 573432, 2011.

- MAYNARD, S. E., et al. Gestational angiogenic biomarker patterns in high risk preeclampsia groups. **Am J Obstet Gynecol**, v. 209, n. 1, p. 1-9, 2013.
- MERCER, B. M., et al. The NICHD-MFMU antibiotic treatment of preterm PROM study: impact of initial amniotic fluid volume on pregnancy outcome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 2, p. 438-445, 2006.
- MILLER, D. A. Hypertension in Pregnancy. **Current diagnosis & treatment: obstetrics & gynecology**, p. 318-330, 2007.
- MISTRY, H. D. **Etiology and Pathophysiology of Hypertensive Disease**. Hypertensive Disease in Pregnancy, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 2013.
- MISTRY, H. D., et al. Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 881-888, 2008.
- MISTRY, H. D., et al. Novel expression and regulation of voltage-dependent potassium channels in placentas from women with preeclampsia. **Hypertension**, v. 58, n. 3, p 497-504, 2011.
- MISTRY, H., CZAJKA, A., HENTSCHKE, M. R. **Sdpr antibody-N-terminal region (ARP50499_P050) in Human placental and myometrial tissue lysate using Western Blot**. 2012. Disponível em: <http://www.avivasysbio.com/wordpress/product-reviews/product-review-sdpr-antibody-n-terminal-region-arp50499_p050-in-human-placental-and-myometrial-tissue-lysate-using-western-blot-2>.
- MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.
- MOORE, K. L. e PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier / Medicina Nacionais, 2011.
- MULLIS, K., et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 51, n. Pt 1, p. 263-273, 1986.
- MURJI, A., et al. Male sex bias in placental dysfunction. **Am J Med Genet A**, v. 158A, n. 4, p. 779-783, 2012.
- MURTHI, P., et al. GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. **Placenta**, v. 29, n. 9, p.: 798-801, 2008.
- MYATT, L., et al. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. **Hum Reprod**, v. 12, n. 1, p. 167-172, 1997.
- NAPOLITANO, M., et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 6, p. 2318-2323, 2000.

NASSOY, P. e LAMAZE, C. Lamaze. Stressing caveolae new role in cell mechanics. **Trends Cell Biol**, v. 22, n. 7, p. 381-389, 2012.

NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM, 2000). Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* v. 183, n. 1, p. S1-S22.

NIKITINA, L., et al. Expression and localization pattern of ABCA1 in diverse human placental primary cells and tissues. **Placenta**, v. 32, n. 6, p. 420-430, 2011.

NORWITZ, E. R. e FUNAI, E. F. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: hope for the best, but expect the worst. **Am J Obstet Gynecol**, v. 199, n. 3, p. 209-212, 2008.

O'CONNOR, D. M. e O'Brien, T. Nitric oxide synthase gene therapy: progress and prospects. **Expert Opin Biol Ther**, v. 9, n. 7, p. 867-878, 2009.

PALADE, G. E. Blood capillaries of the heart and other organs. **Circulation**, v. 24, p. 368-388, 1961.

PALADE, G. E. e BRUNS, R. R. Bruns. Structural modulations of plasmalemmal vesicles. **J Cell Biol**, v. 37, n. 3, p. 633-649, 1968.

PAPANTONIOU, N., et al. RASSF1A in maternal plasma as a molecular marker of preeclampsia. **Prenat Diagn**, p. 1-6, 2013.

PARK, M. J., et al. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. **J Biol Chem**, v. 282, n. 42, p. 30485-30496, 2007.

PARTON, R. G. Caveolae and caveolins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 8, n. 4, p. 542-548, 1996.

PAUDEL, D., et al. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. **N Am J Med Sci**, v. 3, n. 10, p. 478-485, 2011.

PECKS, U., et al. Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction. **J Perinat Med**, v. 40, n. 3, p. 287-296, 2012.

PIJNENBORG, R., et al. Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 98, n. 7, p. 648-655, 1991.

PINHEIRO DA COSTA, B. E., et al. Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia. **BJOG**, v. 113, n. 5, p. 577-579, 2006.

PINHEIRO DA COSTA, B. E., et al. Erythrocytes L-arginine y+ transporter inhibition by N-ethylmaleimide in ice-bath. **Cell Biochem Biophys**, v. 58, n. 2, p. 69-73, 2010.

POTTER, J. M. e NESTEL, P. J. Nestel The hyperlipidemia of pregnancy in normal and complicated pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, v. 133, n. 2, p. 165-170, 1979.

PORTO ALEGRE. Prefeitura Municipal. **Diretrizes da Assistência ao pré-natal de baixo risco**. Porto Alegre, 2006.

POSTON, L., et al. Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement. **Pediatr Res**. v. 69, n. 2, p.175-80. 2011

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL. Biblioteca Central Ir. José Otão. **Modelo para apresentação de trabalhos acadêmicos, teses e dissertações elaborado pela Biblioteca Central Irmão José Otão**. 2011. Disponível em: <www.pucrs.br/biblioteca/trabalhosacademicos>. Acesso em: 03 abr. 2014.

QI, H. P., et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms and Risk of Preeclampsia. **Am J Perinatol**, v. 30, n. 10, p.. 795-804, 2013.

RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M., MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 13, p. 5193-5197, 1990.

RAO, A. K., CHENG, Y. W., CAUGHEY, A. B. Perinatal complications among different Asian-American subgroups. **Am J Obstet Gynecol**, v. 194, n. 5, p. 39-41, 2006.

RAO, X., LAI, D., HUANG, X. A New Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. **J Comput Biol**, v. 20, n. 9, p. 703-711, 2013.

RASMUSSEN, K. M. **Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines**. Institute of Medicine; National Research Council, 2009.

RAY, J. G., et al. Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. **BJOG**, v. 113, n. 4, p. 379-386, 2006.

RAZANI, B. e LISANTI, M. P. Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. **J Clin Invest**, v. 108, n. 11, p. 1553-1561, 2001.

RAZANI, B., et al. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. **Mol Cell Biol**, v. 22, n. 7, p. 2329-2344, 2002.

REDMAN, C. W. Hypertension in pregnancy: the NICE guidelines. **Heart**, v. 97, n. 23, p. 1967-1969, 2011.

REDMAN, C. W. e SARGENT, I. L. Latest advances in understanding preeclampsia. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1592-1594, 2005.

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

REZENDE, Jorge de; MONTENEGRO, Carlos A. Barbosa. **Obstetrícia Fundamental**. 12. ed. GUANABARA KOOGAN, 2013.1300p

ROBERTS, J. M. Endothelial dysfunction in preeclampsia. **Semin Reprod Endocrinol**, v. 16, n. 1, p. 5-15, 1998.

ROBERTS, J. M., et al. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. **Am J Obstet Gynecol**, v. 161, n. 5, p. 1200-1204, 1989.

ROTHBLAT, G. H., et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. **J Lipid Res**, v. 40, n. 5, p. 781-796, 1999.

RUSTERHOLZ, C., HAHN, S., HOLZGREVE, W.. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. **Semin Immunopathol**, v. 29, n. 2, p. 151-162, 2007.

SAITO, S., et al. Increased T-helper-1-type immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia. **Am J Reprod Immunol**, v. 41, n. 5, p. 297-306, 1999.

SANDRIM, V. C., Increased circulating cell-free hemoglobin levels reduce nitric oxide bioavailability in preeclampsia. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 3, p. 493-500, 2010.

SCHEIFFELE, P., et al. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. **J Cell Biol**, v. 140, p. 4, p. 795-806, 1998.

SCHENKEIN, H. A., et al. Anti-cardiolipin from periodontitis patients induces MCP-1 production by human umbilical vein endothelial cells. **J Clin Periodontol**, v. 40, n. 3, p. 212-217, 2013.

SCHNITZER, J. E., OH, P., MCINTOSH, D. P.. Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. **Science**, v. 274, n. 5285, p. 239-242, 1996.

SCHOCHETMAN, G., OU, C., JONES, W. K. Polymerase chain reaction. **J Infect Dis**, v. 158, n. 6, 1154-1157, 1988.

SELIGMAN, S. P., et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 171, n. 4, p. 944-948, 1994.

SELVAIS, C., et al. Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. **FASEB J**, v. 25, n. 8, p. 2770-2781, 2011.

SERIN, I. S., et al. Predictive value of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in preeclampsia. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 100, n. 2, p. 143-145, 2002.

SEVERS, N. J. Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact?" **J Cell Sci**, v. 90, n. Pt 3, p. 341-348, 1988.

SHAHZAMANI, K., et al. Rapid low-cost detection of hepatitis C virus RNA in HCV-infected patients by real-time RT-PCR using SYBR Green I. **Arch Iran Med**, v. 14, n. 6, p. 396-400, 2011.

- SHAUL, P. W. e ANDERSON, R. G. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 1, p. L843-851, 1998.
- SHEMBREY, M. A. e NOBLE, A. D. Noble. An instructive case of abdominal pregnancy. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 35, n. 2, p. 220-221, 1995.
- SHEN, P., et al. High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 16, p. 6549-6554, 2011.
- SIBAI, B., G., DEKKER, G., KUPFERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 365, n. 9461, p. 785-799, 2005.
- SIBAI, B. M. e FRANGIEH, A. Maternal adaptation to pregnancy. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 7, n. 6, p. 420-426, 1995.
- SIGNORE, C. et al. Circulating angiogenic factors and placental abruption. **Obstet Gynecol.**, v. 108, n. 2, p. 338-44, 2006.
- SILVA, L. M., et al. Low socioeconomic status is a risk factor for preeclampsia: the Generation R Study. **J Hypertens**, v. 26, n. 6, p. 1200-1208, 2008.
- SIM - Sistema de Informações sobre Mortalidade - Dezembro de 2013. Disponível em: <<http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/materna.show.mtw>> acesso 02 abr /2014.
- SLADEK, S. M., MAGNESS, R. R., CONRAD, K. P. Nitric oxide and pregnancy. **Am J Physiol**, v. 272, n. 2 Pt 2, p. R441-463, 1997.
- SMART, E. J., et al. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. **J Biol Chem**, v. 271, n. 46, p. 29427-29435, 1996.
- SMETS, E. M., Novel biomarkers in preeclampsia. **Clin Chim Acta**, v. 364, n. 1-2, p. 22-32, 2006.
- SMITH, J. J. S. W. M. C. **Hypertensive Disorders**. Dewhurst's textbook of Obstetrics & Gynaecology. D. K. Edmonds, 2012. 101-110.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose**, Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2007. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/diretriz-DA.pdf>>.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras Cardiol**; v.95, n.1, supl.1, p.1-51, 2010
- SOWA, G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. **Front Physiol**, v. 2, n. 120, 2012.
- SOWA, G., et al. The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 11, p. 6511-6516, 2003.

- STEELE, A. B. The Nature and Treatment of Puerperal Convulsions. **Br Med J**, v. 2, n. 346, p. 125, 1867.
- STEELE, A. B. The Treatment of Puerperal Eclampsia. **Br Med J**, v. 2, n. 609, p. 240-241, 1872.
- STEFULJ, J., et al. Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1. **Circ Res**, v. 104, n. 5, p. 600-608, 2009.
- STEPAN, H., FABER R., WALTHER, T.. Expression of low density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid in placentas from pregnancies with intrauterine growth retardation. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 106, n. 11, p. 1221-1222, 1999.
- SZABO, A. J. e SZABO, O. Placental free-fatty-acid transfer and fetal adipose-tissue development: an explanation of fetal adiposity in infants of diabetic mothers. **Lancet**, v. 2, n. 7879, p. 498-499, 1974.
- SZARBA, A., et al. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. **BMC Immunol**, v. 11, n. 59, 2010.
- TABANO, S., et al. Placental LPL gene expression is increased in severe intrauterine growth-restricted pregnancies. **Pediatr Res**, v. 59, n. 2, p. 250-253, 2006.
- TAGGART, M. J. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? **News Physiol Sci**, v. 16, n. 61-65, 2001.
- TOBINAGA, C. M., et al. Angiogenic factors and uterine Doppler velocimetry in early and late-onset preeclampsia, **Acta Obstet Gynecol Scand.**, 2014 doi: 10.1111/aogs.12366.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24580069>>
- VAISAR, T., et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 746-756, 2007.
- VAN ANKEN, E. e BRAAKMAN, I. Braakman. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 40, n. 4, p. 191-228, 2005.
- VENKATESHA, S. et al Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med.**, v. 12, n. 6, p.642-649, Epub 2006 Jun 4, 2006
- VIEIRA, M. C., et al. Flow-mediated dilatation of brachial artery as marker of preeclampsia morbidity. **Int J Cardiol**, 2013.
- VICTORIA, C. G., et al. Maternal and child health in Brazil: progress and challenges. **The Lancet**, v. 377, n.9780, p. 1863-1876, 2011

VILA, E. and SALAICES, M. Salaiques. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 3, p. H1016-1021, 2005.

VINCE, G. S., et al. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 102, n. 1, p. 20-25, 1995.

VINNARS, M. T., et al. Association between placental pathology and neonatal outcome in preeclampsia: a large cohort study. **Hypertens Pregnancy**, 2013.

WADSACK, C., et al. Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells. **Placenta**, v. 24, n. 2-3, p. 131-143, 2003.

WADSACK, C., et al. Intrauterine growth restriction is associated with alterations in placental lipoprotein receptors and maternal lipoprotein composition. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 2, p. E476-484, 2007.

WANG, C. Y., GIAMBRONE, J. J. SMITH, B. F. Detection of duck hepatitis B virus DNA on filter paper by PCR and SYBR green dye-based quantitative PCR. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 7, p. 2584-2590, 2002.

WANG, W., et al. Excess LIGHT Contributes to Placental Impairment, Increased Secretion of Vasoactive Factors, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia. **Hypertension**, 2013.

WEBER, M. A., et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community a statement by the american society of hypertension and the international society of hypertension. **J Hypertens**, v. 32, n. 1, p. 3-15, 2014.

WEBER, M. A., et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community: A Statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **J Clin Hypertens** (Greenwich), 2013.

WHITE, T. J., ARNHEIM, N. Arnheim, ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends Genet**, v. 5, n. 6, p. 185-189, 1989.

WHO. World Health Organization international collaborative study of hypertensive disorders of pregnancy. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v.158, p. 80-83, 1988.

WHO. The millennium development goals: Report 2008. New York, United Nations, 2008.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser** v. 894: i-xii p. 1-253, 2000.

WHO. Trends in Maternal Mortality: 1990 to 2008. Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010. Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500265_eng.pdf>.

WIKIPATHWAY, A. P. et al. **Statin Pathway**. Disponível em: <www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP430>

WILKINSON, B. e GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1699, n. 1-2, p. 35-44, 2004.

WITTMAACK, F. M., et al. Localization and regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport. **Endocrinology**, v. 136, n. 1, p. 340-348, 1995.

WOLF, H. J., et al. Fetal leptin and insulin levels only correlate in large-for-gestational age infants. **Eur J Endocrinol**, v. 142, n. 6, p. 623-629, 2000.

WOOD, G. W. Mononuclear phagocytes in the human placenta. **Placenta**, v. 1, n. 2, p. 113-123, 1980.

WOOLLETT, L. A. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 6, p. 1155-1161, 2005.

HOPKINS, W.G. Disponível em: <<http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>>
Acesso: 11/01/2014

WRIGHT, M. L., et al. Validation of DNA methylation patterns: potential biomarker for heritable risk of preeclampsia. **West J Nurs Res**, n. 34, v. 8, p. 1074-1075, 2012.

WYATT, A. W., STEINERT, J. R., MANN, G. E. Modulation of the L-arginine/nitric oxide signalling pathway in vascular endothelial cells. **Biochem Soc Symp**, v. 71, p. 143-156, 2004.

XIA, Y. and KELLEMS, R. E. Receptor-activating autoantibodies and disease: preeclampsia and beyond. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 7, n. 5, p. 659-674, 2011.

XIA, Y. e KELLEMS. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies and hypertension: preeclampsia and beyond. **Circ Res**, v. 113, n. 1, p. 78-87, 2013.

XIAO, J. P., et al. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. **Cytokine**, v. 60, n. 3, p. 856-860, 2012.

YANCEY, P. G., et al. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n. 5, p. 712-719, 2003.

ZHANG, S. M., et al. Expression and distribution of endocan in human tissues. **Biotech Histochem**, v. 87, n. 3, p. 172-178, 2012.

ZHANG, Z., et al. Alterations of IL-6, IL-6R and gp130 in early and late onset severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*, v. 32, n. 3, p. 270-280, 2013.

Apêndices

**APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DO HSL/PUCRS PARA USO
NA LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA:
ENFOQUE NA GESTAÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL
TCLE APROVADO PELO CEP EM 31/05/2005 (OF Nº 440/05)-CEP E APROVADO PELO CONEP
REGISTRO 11972**

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

Entrevistador da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da paciente: _____

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

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

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

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

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

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

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

Acompanhamento ambulatorial: _____ AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Urina: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Placenta _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).

Sangue: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Sangue do Cordão Umbilical: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Ecografia dos vasos: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Análise genética: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Cintilografia renal: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 Sensibilidade Gustativa ao Sal: _____AUTORIZO (Favor escrever SIM ou NÃO).
 *OBS.: Nem todos os testes acima serão necessariamente realizados.

CONFIDENCIALIDADE: Os registros serão mantidos em segredo.

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

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

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

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

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

Caso tiver novas perguntas sobre este trabalho, posso chamar os pesquisadores pelos seguintes telefones (051) 33367700, 33369599, ou 3320 3000 - Ramais 3174 ou 2344, para qualquer dúvida como participante deste estudo.

Esta pesquisa tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS. Sob as condições acima mencionadas, concordo em participar do presente estudo. Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovando-o e assinando-o após lê-lo com todo o cuidado possível.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Paciente ou Responsável

Investigador

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE COLETA PADRONIZADO DA LINHA DE PESQUISA EM NEFROLOGIA - HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO. LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA/IPB

IDENTIFICAÇÃO				ANAMNESE			
Nome:				Data da última menstruação (DUM): Certeza: <i>Sim Não</i>			
Endereço:				Idade gestacional (no dia da coleta): DUM= ECO=			
Cidade:		Bairro:		Gestações: () Partos: () Abortos: () <i>Provocado/ Espontâneos</i>			
Fone: ()				Tabagismo: não 1 a 10 cig/dia > 10 cig/dia			
Data da avaliação:				Número de consultas de pré-natal:			
Registro HSL:				HISTÓRIA MÉDICA PREGRESSA			
Nº do Lab: / / /				Infecção urinária (repetição): <i>Não Sim: Infância Fase adulta</i>			
Raça: <i>branca mista negra</i>				HAS: <i>Não Sim: Idade ou IG no diagnóstico:</i>			
Data de nascimento: / /				PE prévia: <i>Não Sim DM: Não DM I DM II DMG</i>			
Idade:				Outras doenças:			
HISTÓRIA FAMILIAR				Drogas em uso (<i>antes / durante</i> a gestação, qual):			
HAS: <i>Não Sim</i> : Parentesco: mãe pai outros:				Uso de anti-hipertensivos durante a coleta:			
EXAME LABORATORIAL				EXAMES FÍSICO			
Data dos exames:				Data do exame físico:			
IG: semanas dias		TP (RNI): / (%)		IG: semanas dias			
Hematócrito: %		KTTTP: seg/seg		PAS: mmHg			
Hemoglobina: g/dL		Fibrinogênio: mg/dL		PAD: mmHg			
Leucócitos totais: uL		TGO: U/L TGP: U/L		Peso inicial: kg /Peso final: kg / Altura: metros			
Bastoados: % uL		LDH: U/L		Membranas: Integras Bolsa rota (horário que rompeu a bolsa):			
Segmentados: % uL		BD: mg/dL BI: mg/dL		DADOS DO PARTO			
Basófilos: % uL				Data: Hora:			
Eosinófilos: % uL				Tipo de parto: <i>Normal Cesário</i> Por quê?			
Monócitos: % uL		TSM: ABO: Rh:		Se parto normal: episiotomia <i>sim não</i> / uso de fórcepe <i>sim não</i>			
Linfócitos: % uL				DADOS DO RECÉM-NASCIDO			
Plaquetas: mil				Sexo: <i>Masculino Feminino</i>			
Creatinina: mg/dL		Ácido úrico: mg/dL		Apgar: 1º min 5º min			
Proteinúria de amostra: mg/dL				IGO: IGP (capurro):			
Creatininúria de amostra: mg/dL				Classificação: <i>AIG GIG PIG</i>			
Relação prot/creat (P/C) em amostra:				Peso RN: g			
Proteinúria de 24h: mg/24h / Creatininúria de 24h:				Peso da placenta: g			
Glicemia de jejum: mg/dL (data: / /)				CLASSIFICAÇÃO DA GESTANTE			
Exame qualitativo de urina: pH= dens= prot= +				<i>Controle Hipertensa gestacional Hipertensa crônica Pré-</i>			
hem= + leuc= p/c hem= p/c Céls= p/c				<i>eclâmpsia pura sobreposta Eclâmpsia HELLP</i>			
Outros:				Observação:			

APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS - ENSAIO MULTIPLEX

Preparação das amostras de plasma (conforme protocolo Milliplex™ Cat. # HADK2MAG-61K e Cat # HCVD1MAG-67K)

-
- 1 Coletar sangue materno e do cordão umbilical usando tubo de coleta com EDTA
 - 2 Centrifugar por 10 minutos a 1000 Xg
 - 3 Evitar múltiplos ciclos congelar/descongelar (>2)
 - 4 Remover o plasma e fazer o ensaio imediatamente ou alíquotar e armazenar a ≤ -20 °C para ensaios em curto tempo e a -70 °C para ensaios a longo tempo.
 - 5 Ao usar amostras congeladas, é recomendado descongelar as amostras completamente a 4°C, passar em vórtex e centrifugar, antes de usar no ensaio, para remover partículas.
 - 6 Se a diluição foi necessária para as amostras de plasma, usar o *Serum matrix* apresentado no kit, como diluente da amostra.
 - 7 Não colocar as amostras em vidro. Armazenar em tubos de polipropileno.
-

Preparação das amostras de placenta¹⁰

O protocolo utiliza *Protease Inhibitor Cocktail I* (lyophilized Power) Catalog #20-20, e *RIPA Lysis Buffer*, 10X. Catalog #20-188, Millipore, os quais devem ser adquiridos ou processados¹¹ antes de iniciar o ensaio. A reconstituição do Inibidor de protease é realizada com o tampão de RIPA, conforme o fabricante.

-
- 1 Separar e rotular tubos de centrifugação de 1,5 mL e Falcon 15 mL, conforme as amostras e tubos de centrifugação de 0,6 mL, dois ou mais por amostra
 - 2 Separar materiais para alíquotar o tecido congelado. Utilizamos pinça e bisturi.
 - 3 Retirar as amostras do freezer e manter em isopor com gelo.
 - 4 Pesar 0,3 g de tecido congelado de cada amostra e armazenar em Tubo Falcon 15 mL. (sempre mantendo a amostra em gelo).
 - 5 Aplicar tampão de RIPA com inibidor de protease na quantidade de 3 mL/g; aproximadamente 0,9 mL por amostra (fazer o cálculo para cada amostra).
 - 6 Fazer maceração manual usando gral e pistilo e armazenar novamente no mesmo tubo Falcon 15 mL.
 - 7 Fazer sonicação em banho gelado por 10 minutos. (Antes, é interessante fazer um *spin* em centrífuga por 30 segundos para decantação, apenas).
 - 8 Pipetar o conteúdo sonicado nos tubos de centrifugação 1,5 mL previamente rotulados.
 - 9 Centrifugar o extrato: 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. (se tiveres uma centrífuga refrigerada a 4°C que comporte o tubo Falcon 15 mL a uma rotação de 10.00 rpm, não há necessidade do tubo 1,5 mL).
 - 10 Pipetar o sobrenadante em tubos de centrifugação de 0,6 mL, aproximadamente 200 μ l por tubo. Armazenar a ≤ -20 °C para posterior análise.
-

¹⁰ Visto que o Protocolo Milliplex™ não dá detalhes para o pesquisador de como processar a amostra de tecido, elaboramos um protocolo para tal com base em estudos prévios do nosso grupo com ensaio de ELISA e colaboração de pesquisadores que trabalham com tecido.

¹¹ Neste estudo, foi adquirido o Inibidor de protease (ANEXO C) e processado o Tampão de RIPA.

APÊNDICE D – QUADRO REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DE COVARIÂNCIA - ESTRATIFICAÇÃO DO GRUPO DE SÍNDROME DE PRÉ-ECLÂMPSIA POR PREMATURIDADE

		PE IG < 37 sem X Controle							PE IG > 37 sem X Controle							PE IG < 37 sem X PE IG < 37 sem							
		mG_SPE	mG_Co	RM	IC (95%)	p	P _{aj}	mG_SPE	mG_Co	RM	IC (95%)	p	P _{aj}	mG_>37	mG_<37	RM	IC (95%)	p	P _{aj}	p			
Plasma materno	Endocan	3,42	1,85	1,85	1,12	3,06	0,02	0,03	2,72	1,85	1,47	1,18	1,84	0,00	0,00	2,72	3,42	0,80	0,50	1,27	0,34	0,34	0,002
	PIGF	4,47	18,24	0,24	0,03	1,87	0,17	0,24	8,24	18,24	0,45	0,19	1,10	0,08	0,22	8,24	4,47	1,85	0,28	12,16	0,52	0,52	0,161
	LIGHT	208,45	49,43	4,22	1,01	17,62	0,05	0,14	63,68	49,43	1,29	0,69	2,41	0,42	0,42	63,68	208,45	0,31	0,08	1,15	0,08	0,14	0,141
	TNFa	2,60	1,91	1,36	0,83	2,25	0,22	0,31	2,46	1,91	1,29	1,04	1,61	0,02	0,06	2,46	2,60	0,95	0,59	1,50	0,81	0,81	0,07
	IL-6	5,11	8,09	0,63	0,23	1,73	0,37	0,50	5,26	8,09	0,65	0,42	1,01	0,06	0,17	5,26	5,11	1,03	0,40	2,63	0,95	0,95	0,156
	MCP1	107,40	62,81	1,71	0,95	3,08	0,08	0,22	65,46	62,81	1,04	0,80	1,24	0,76	0,76	65,46	107,40	0,61	0,35	1,05	0,08	0,22	0,188
	NGF	2,14	4,97	0,43	0,20	0,94	0,03	0,09	4,39	4,97	0,88	0,63	1,24	0,47	0,47	4,39	2,14	2,05	1,00	4,21	0,05	0,09	0,103
	Leptina	24,15	13,55	1,78	0,82	3,87	0,14	0,20	18,88	13,55	1,39	0,99	1,95	0,06	0,17	18,88	24,15	0,78	0,38	1,61	0,50	0,50	0,116
Plasma fetal	Endocan	4,45	2,82	1,57	1,05	2,35	0,03	0,06	2,81	2,82	1,00	0,83	1,20	0,96	0,96	2,81	4,45	0,63	0,44	0,92	0,02	0,06	0,056
	PIGF	2,47	2,38	1,04	0,21	5,18	0,96	1,00	2,43	2,38	1,02	0,49	2,13	0,96	1,00	2,43	2,38	1,02	0,22	4,40	0,98	1,00	0,999
	LIGHT	176,20	107,89	1,63	0,47	5,65	0,43	0,75	139,64	107,89	1,29	0,73	2,29	0,37	0,75	139,64	176,20	0,79	0,25	2,52	0,69	0,75	0,596
	TNFa	5,38	4,88	1,10	0,74	1,65	0,62	0,88	5,18	4,88	1,06	0,89	1,28	0,51	0,88	5,18	5,38	0,96	0,66	1,40	0,84	0,88	0,776
	IL-6	3,56	4,85	0,73	0,19	2,88	0,66	0,73	2,49	4,85	0,51	0,27	0,96	0,04	0,12	2,49	3,56	0,70	0,19	2,50	0,58	0,73	0,109
	MCP1	308,32	183,23	1,68	0,91	3,13	0,10	0,15	150,31	183,23	0,82	0,62	1,09	0,18	0,18	150,31	308,32	0,49	0,27	0,87	0,02	0,06	0,029
	NGF	1,18	3,48	0,34	0,08	1,43	0,14	0,36	2,53	3,48	0,73	0,37	1,41	0,34	0,36	2,53	1,18	2,15	0,56	8,22	0,26	0,36	0,302
	Leptina	23,17	22,75	1,02	0,38	2,75	0,97	0,97	30,69	22,75	1,35	0,85	2,13	0,20	0,49	30,69	23,17	1,32	0,52	3,35	0,55	0,70	0,389
Placenta	Endocan	1,71	2,05	0,83	0,38	1,78	0,64	0,78	1,63	2,05	0,79	0,56	1,14	0,20	0,49	1,63	1,71	0,95	0,47	1,95	0,90	0,90	0,441
	PIGF	0,54	0,82	0,66	0,30	1,47	0,31	0,67	0,77	0,82	0,95	0,66	1,36	0,77	0,77	0,77	0,54	1,43	0,68	3,00	0,34	0,67	0,586
	LIGHT	4,83	4,15	1,16	0,47	2,88	0,74	0,92	4,68	4,15	1,13	0,74	1,71	0,57	0,92	4,68	4,15	1,13	0,42	2,25	0,94	0,94	0,846
	TNFa	37,07	41,21	0,90	0,45	1,79	0,76	0,76	47,97	41,21	1,16	0,85	1,60	0,35	0,73	47,97	37,07	1,29	0,68	2,45	0,43	0,73	0,499
	IL-6	654,64	805,38	0,81	0,45	1,47	0,49	0,61	891,25	805,38	1,11	0,84	1,46	0,47	0,61	891,25	805,38	1,11	0,78	2,36	0,27	0,61	0,445
	MCP1	7,89	8,75	0,90	0,45	1,79	0,77	0,89	9,71	8,75	1,11	0,81	1,52	0,52	0,89	9,71	7,89	1,23	0,65	2,33	0,52	0,89	0,687
	NGF	515,23	501,19	1,03	0,66	1,59	0,90	0,90	563,64	501,19	1,12	0,92	1,38	0,25	0,58	563,64	515,23	1,09	0,73	1,64	0,66	0,80	0,48
	Leptina	251,19	84,72	2,96	1,01	8,71	0,05	0,07	150,66	84,72	1,78	1,08	2,92	0,02	0,06	150,66	251,19	0,60	0,22	1,63	0,31	0,31	0,038

Fonte: Hentschke (2013). mG_SPE: média geométrica de síndrome de pré-eclâmpsia (SPE); mG_Co: média geométrica de gestante normal (GN). RM: razão de médias entre SPE/GN; e SPE>37/SPE<37. IC: Intervalo de confiança. IG: Idade Gestacional.

P_{aj}: Valor de *p* ajustado para o método de Bonferroni (ajustado por Finner).

APÊNDICE E- PROTOCOLO DO ENSAIO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (PCR-TR)¹²

Protocolo 1 - Realização da curva padrão: *Gel de Eletroforese; Leitura do Gel*

Gel de Eletroforese

O gel de eletroforese separa os produtos do PCR-TR de acordo com o seu tamanho. O gel confirma ou não a presença dos genes propostos no tecido. Um marcador (*see blue* Invitrogen) corre junto com os produtos do PCR-TR permitindo a comparação do marcador com o tamanho das bandas dos genes.

Preparação do gel de Agarose 2%

- 1 100 ml de tampão TBE* + 2g de agarose. *TBE tampão: *Crystal buffer* (10X). 1:10
50 ml de TBE 10X + 950 ml de água
Colocar no microondas em baixa potência (3 minutos – cuidar para não ferver) - A
- 2 agarose deve ficar totalmente dissolvida (líquido transparente). Resfriar a mistura com água fria
- 3 Aplicar à mistura 10µl de SYBR *Save dye* (brometo)
- 4 Colocar a mistura na cuba do gel de eletroforese
- 5 Colocar o pente para criar os poços e aguardar secar o gel. Quando o gel estiver firme, o coloque de acordo com a orientação da cuba e retire o pente.
- 6 Colocar o TBE tampão até a linha indicada na cuba
- 7 Pipetar 10µl do marcador em um dos poços
- 8 Pipetar as amostras: 10 µl amostra + 2 µl blue (*loading buffer*)
Ligar a cuba no leitor de eletroforese, 145V. Checar se os fios estão na posição
- 9 correta: negativo → positivo. Duração: aproximadamente 45min

Leitura e Análise do Gel

- 1 Após correr o gel, retirá-lo da cuba e colocá-lo dentro da câmara de UV para fazer a leitura das bandas no computador.
- 2 Programa: *Carestream programme* / *Settings: Ethidium bromide*
Passos: Colocar o gel na câmara (as bandas voltadas para o fundo da câmara).
- 3 Pressionar *capture* – (checar se a câmara está ligada - *UV on*).
Salvar a imagem/imprimir

¹² Protocolo organizado por Marta Hentschke com auxílio do Dr. Hiten Mistry.

Protocolo 2 - Extração e Quantificação do cDNA

Extração de DNA

- 1 Procedimento realizado após a leitura do gel
- 2 Cortar com bisturi as bandas que apareceram no gel. Após fazer os cortes, observar novamente no computador se elas foram cortadas adequadamente
- 3 Cada banda cortada é colocada em um tubo de centrifugação 1,5ml para então ser feita a extração de DNA. Cada tubo é referente a um gene a ser estudado
Elaborar Tabela para visualização de pesos e medidas, conforme exemplo abaixo:

Gene	Peso do tubo vazio (g)	Peso com o gel (g)	X 100 (ng)	X 3 (µl)
LRP-1amostra X	1	1,12g	120	360

- 5 Aplicar o *Buffer QG* dentro de cada tubo com gel (a quantidade foi calculada anteriormente de acordo com a Tabela acima)
- 6 Colocar no *Termomixer compact* (aproximadamente 10min – 50°C/1400rpm)
- 6 Adicionar o volume de 1 gel (Ex. 120 µl) de Isopropanol e fazer o Vórtex.
- 7 Pipetar a solução dentro de um tubo de centrifugação, com filtro. Centrifugar por 1 minuto.
- 8 Colocar 0,5 ml de *Buffer QG* novamente - Centrifugar por 01 minuto.
- 9 Aplicar 0,75 ml de *buffer PE* e etanol
- 10 Centrifugar por 01 min, descartar e centrifugar mais um minuto. Mudar a tampa do tubo.
- 11 Aplicar 30 µl de *buffer EB*, bem na membrana do tubo – Centrifugar.
- 12 Congelar a amostra

Quantificação do DNA

- 1 Aparelho: *Spectrophotometer – Nanodrop (ND 1000)*. Programa: *ND 1000/Nucleic Acid*
Passos: Limpar a maquina: 70% etanol e água. *Check:* colocar 1,5 µl de água, fechar e apertar ‘ok’ para iniciar. Limpar novamente (etanol + água). Adicionar 1,5 µl *buffer EB* (nesse caso) – pressionar *blank*. Limpar novamente. Adicionar 1,5 µl da amostra – pressionar *measure*.
O programa quantifica o DNA. Observar valores: *CAN ng/ul* e *260/280*. Usando esses valores, calculamos o número de cópias/ µl e criamos as diluições:
- 3 $10^9 - 10^1$ [$10^9 = 1 \mu\text{l de cDNA} + (\text{valor}) \mu\text{l água}$]

APÊNDICE F - PROTOCOLOS PARA A REALIZAÇÃO DO ENSAIO DE IMUNOHISTOQUÍMICA¹³

Protocolo 1 - Relação de tempões e soluções usadas na técnica de Imunohistoquímica

Tampões e Soluções	Formas de Preparo
Tris Buffered Saline (TBS) 10x stock (0,05M, pH 7.2-7.6)	175.2g NaCl 12.12g TRIS Add approx 1500 ml and pH using HCl (if use 1M will take as much as 40 – 100ml). Make up to 2L with distilled water. <u>To use – dilute 1/10</u>
TBS/0.25% BSA	0.25g BSA 100ml TBS Allow BSA to dissolve slowly or else will froth up. Aliquot into 10ml portions and keep frozen until needed
Citrate Buffer, 0.1M stock, pH 6	29.41g trisodium citrate Add 800ml water and pH to 6 with HCl. Make up to 1L. <u>To use – dilute 1/10</u>
0.5% Hydrogen Peroxide in methanol	5 ml 30% Hydrogen Peroxide (Sigma) 295ml methanol - May be stored at +4°C and use within 1 week.
Scott's Tap Water	Potassium bicarbonate 2g Magnesium sulphate 20g Make up to 1L
Acid alcohol	99ml (297ml) 70% alcohol-IMS 1ml (3ml) conc HCl

¹³ Protocolo elaborado por Lesia O. Kurlak, Nottingham University, UK. A autora da Tese optou por não traduzir esse protocolo para português.

Protocolo 2 - Protocolo para o ensaio de Imunohistoquímica

PROTOCOL FOR DAKO ENVISION™ SYSTEM FOR IMMUNOHISTOCHEMISTRY
Mount paraffin-embedded sections on APES-coated slides. Dry the sections overnight at 37°C.

1	Dewax sections in xylene baths	(2x5mins)
2	Immerse in absolute alcohol (<i>IMS is cheaper</i>)	(2x5 mins)
3	Immerse in fresh 0.5% H ₂ O ₂ in methanol – peroxidase block (store up to max 1 wk at 4°C)	(10 mins)
4	Immerse in alcohol	(2x5mins)
5	Immerse in 70% alcohol	(5 mins)
6	Wash in running water	(5 mins)
	Microwave for 15 mins at medium setting in citrate buffer solution (Heat induced epitope retrieval). Time depends on equipment	[20 mins at 70P in CHN lab]
7	Leave to stand for a few mins before cooling in running water	[at least 15 mins total]
8	Wash in TBS	(5 mins)
9	Wipe off excess TBS and draw around section with hydrophobic barrier pen pen, block with appropriate for 2° Ab normal serum (dil 1/10 in TBS/BSA).	(30 mins)
10	Incubate in 1° Ab (dil in BS/BSA) (in a humidified covered chamber to minimise evaporation from slides)	overnight at 4°C, then 30-60 mins at room temp.
11	Wash in TBS	(2x5mins)
12	Incubate with HRP-labelled polymer (2° Ab) at room temp, neat if part of kit or concentration as assessed in a validation run.	(30 mins)
13	Wash in TBS	(2x5mins)
14	Incubate in DAB chromogen [make up in separate tube 1ml of buffer + 20µl DAB]	(1x10mins)
15	Wash in running water for a few minutes	
16	Counterstain in Harris' Haematoxylin	(1x12 secs)
17	Wash in running water	
18	Blue in Scott's Tap water . Look at slides under microscope.	(5 secs)
19	Wash in running water	
20	If too blue, dip in acid alcohol.	
21	Wash in running water	
22	Dip in Scott's Tap water	(5 secs)
23	Wash in running water	
24	Transport in water/TBS	
25	Immerse in 70% alcohol	(5 mins)
26	Immerse in 100% alcohol	(2 x 5 mins)
27	Clear in xylene (III and IV)	(2 x 5 mins)
28	Mount in DPX	

P.S. If the staining procedure must be interrupted, slides may be kept in a buffer bath following incubation of the primary antibody for up to one hour at room temp without affecting the staining.

APÊNDICE G - PROTOCOLOS PARA ENSAIO DE WESTERN BLOT¹⁴

Protocolo 1 - Relação de tempões e soluções usadas para técnica de Western Blot:

Tampões e Soluções	Formas de Preparo
<i>Loading Buffer</i> (µl)	5x concentrado. Estocado em 4°C. Calcular o que é necessário para cada amostra e misturar o tampão com a amostra. Amostra [] <5 → 1µl / Amostra [] 5<10 → 2 µl Amostra [] 10<15 → 3 µl
<i>Novex Marker</i>	Marcador de peso molecular de proteína.
<i>Running buffer</i> (RB) (1X)	50 ml de RB (20X) 950 ml de água deionizada
<i>Running buffer</i> com solução Antioxidante	200 ml RB 500 µl of antioxidant (estocado a 4°C)
<i>Transfer buffer</i> (1X)	100 ml de TB (10X) → (Transfer buffer (10X): 29,3g glycine, 51.8g Tris, 3,75g SDS em 1L de água) 200 ml metanol / 700 ml H ₂ O destilada deionizada
Metanol	Usado para molhar a membrana do Western Blot
TBS (1X) <i>Tris Buffered Saline</i> (Seven biotech)	50 ml de TBS (10X) 450 ml de água deionizada
TBS-Tween (TBST) (1X)	100 ml de TBS (1X) / 1 ml de Tween 20 900 ml de água deionizada
<i>Antibody storage buffer:</i> TBST + BSA	10% de BSA <i>Bovine Serum Albumin</i> TBST (1X) 10g -100ml ou 5g – 50ml
Diluição do anticorpo primário	1µl do anticorpo em 500 µl de TBST+BSA. (6 µl de anticorpo em 3ml de TBST +BSA)
Diluição do anticorpo secundário (1:10.000)	50 ml de TBST 1 µl de anticorpo (ex: anti rabbit)
B-actin (1:5000)	1 µl de b-actin em 5000 µl de TBST+BSA
ECL – Reagente de detecção	Aproximadamente 3 ml por membrana (1,5 ml de A e 1,5 de B) – preparar somente quando for usar.

¹⁴ Protocolo organizado por Yosef Mansour e Marta Hentschke para ensaio Western Blot.

Protocolo 2 - Protocolo Eletroforese - XCell *SureLock* Mini-cell system

Eletroforese - Novex® gels pré-moldados. Transferência de proteínas ¹⁵	
1	Calcular o volume total de proteína (µL) e de <i>Laemlli buffer</i> (<i>loading buffer</i>) exigidos por cada amostra
2	Remover o gel da embalagem, retirar a fita branca que esta colada na parte inferior do cassette. Retirar com calma o pente da parte de cima do cassette e ter certeza de que os poços estão livres de excesso de gel.
3	Posicionar o cassette no aparelho de <i>Mini-cell</i> tendo cuidado para que os poços estejam voltados para o centro da cuba. Se estivermos usando apenas um gel, precisamos colocar do outro lado da cuba uma barreira de plástico. Quando o cassette estiver na posição correta, prenda-o bem.
4	Fazer 1L de <i>Running buffer</i> a partir do estoque de 20X (50 ml RB 20X estocado em 950ml de água destilada). Pegar 200 ml dessa solução e acrescentar 500µl de antioxidante.
5	Preencha a cuba do meio com a solução de RB + antioxidante. Primeiro coloque o uma pequena quantidade da RB para checar se está bem tensionado e não está vazando. Se você detectar um vazamento da cuba alta para a baixa, descarte o buffer, desmonte e monte novamente o <i>Mini-cell</i> . Com o selo apertado, encha a cuba com RB, aproximadamente com 200ml 1X. A câmara do meio deve ser preenchida acima do nível dos poços, assim eles ficam submergidos em solução.
6	Preencha a cuba de fora com o restante da solução de RB
7	Pipete o marcador e as amostras no gel.
8	Coloque a tampa no <i>Mini-cell</i> , conecte os eletrodos. Condições da eletroforese: 175V por 1h e 30min.
9	Após o fim da eletroforese, quando as amostras tiverem corrido para a parte inferior do gel, desligue o aparelho, desconecte os eletrodos e retire o gel da cuba <i>XCell SureLock Mini-cell</i> .
10	Corte a membrana de transferência – membrana de nitro celulose (PVDF) e o papel filtro com as mesmas dimensões do gel. Não tocar a membrana com as mãos
11	Faca 1L de tampão de transferência (<i>transfer buffer</i>) a partir de 10X estocado (100 mL TB 10X em 700 mL dH ₂ O + 200ml de metanol)
12	Umedeça a membrana de PVDF por 30 segundos com metanol a após coloque em um recipiente com aproximadamente 50mL de 1X TB por alguns minutos.
13	Mergulhe as almofadas do gel e o papel filtro no TB também. Tenha certeza de que não tenha ar nas almofadas do <i>blot</i> , pois isso impedirá a transferência das proteínas para a membrana.
14	Separe cada um dos três lados do cassette inserindo uma faca nos espaços entre os dois pratos do gel. A face em que ha um furo no cassette, deve ficar voltada para cima. Cuidadosamente, remova e descarte o prato de cima, permitindo que o gel permaneça no prato de baixo.
15	Com a espátula, remova o topo do gel, onde estão os poços, e a parte inferior, onde há uma protrusão.
16	Posicione as almofadas de <i>blot</i> pré-umedecidas, o papel filtro, a membrana de transferência e o gel de acordo com o desenho abaixo.
17	Para facilitar o posicionamento do gel no sanduíche, coloque o papel filtro em cima do gel quando ele ainda estiver em cima da placa do <i>mini-cell</i> e após bem posicionado, vire ele e o gel de cabeça para baixo, deixando o papel filtro na parte de baixo e o gel na parte de cima, como mostra o desenho.
18	Tenha certeza de que todas as bolhas foram removidas, da para usar uma ponteira grande como um rolo para fazer isso.
19	Posicione o sanduíche na cuba, tranque bem, para que todas as camadas estejam em perfeito contato.
20	Preencha o módulo <i>blot</i> com 1X tampão de transferência até o sanduíche gel / Não encha até o topo, pois isso só irá gerar condutividade extra e calor.
21	Preencha a cuba externa com água deionizada. O nível de água deve atingir cerca de 2 cm a acima da parte superior da cuba inferior. Isto serve para dissipar o calor produzido durante a execução.
22	Coloque o tampa no topo da unidade. Condições de transferência: 30 v, 1hora-1h 30min
23	Quando o <i>blotting</i> tiver terminado, colocar a membrana PVDF em metanol durante 15 segundos e, em seguida, ao ar seco. A membrana mudará para um branco opaco.
24	Prepare a membrana de acordo com seus anticorpos primários (ou seja, se você precisa cortar a membrana ao meio, isso pode ser feito com uma régua e bisturi). Lembre-se: usar o bisturi para cortar o canto de cada membrana para que você possa identificá-las.
25	Corte um comprimento adequado do plástico duplo – utilizado para empacotar a membrana
26	Transferir cuidadosamente a membrana para a bolsa de plástico, usando uma pinça. Mantendo um espaço de aproximadamente 5mm entre o bordo da membrana e da borda do plástico.
27	Use o selador de plástico para fechar as bordas, mantenha um lado aberto, onde possa ser colocado o anticorpo.
28	Preparar uma diluição apropriada do seu anticorpo de interesse (diluído em BSA).
29	Colocar parte da solução para dentro da bolsa onde esta a membrana, ver se não há vazamento, se não houver vazamentos, colocar o resto da solução para dentro da bolsa. Retirar as bolhas e selar o lado que ficou aberto.
30	Incubar a membrana com o anticorpo apropriado em temperatura ambiente por pelo menos 5 horas, ou overnight a 4°C, com a velocidade máxima de agitação.
31	Após incubação durante a noite, fazer uma pequena fenda no canto da bolsa para recolher o anticorpo, pois ele pode ser reutilizado. Pode-se usar um tubo de 15 mL.
32	Coloque a membrana de PVDF em TBST (<i>tween</i>) lavar durante 20 minutos, 3 vezes. Agitação máxima
33	Prepare o anticorpo secundário (dilua em TBST). Adicione a membrana ao anticorpo por 1 hora, em temperatura ambiente.
34	Lave novamente em TBST por 20 minutos, 3 vezes.
35	Coloque a membrana em uma carteira de plástico (<i>Saran Wrap</i>), aberta.
36	Faça um volume adequado de ECL (3 mL por membrana, com a mesma quantidade de reagente A e B), use a pipeta para, com cuidado, cobrir toda a superfície da membrana. Deixe o ECL por 1 minuto e imediatamente despeje o excesso.
38	Feche a carteira de plástico e confira se não há nenhum resíduo de reagente ECL no lado de fora da carteira.
39	Analise o gel na câmara escura. Visualizar as proteínas imunorreativas utilizando quimiluminescência

¹⁵ Equipamentos necessários: Sistema XCell *SureLock* de mini células com *blotting module*, gel, pipetas, ponteiras, basculante mecânico.

**APÊNDICE H - FICHA DE AVALIAÇÃO INICIAL USADA NA ASSISTÊNCIA DAS
PACIENTES QUE CONSULTAM NO AMBULATÓRIO DE HIPERTENSÃO NA
GESTAÇÃO (LABORATÓRIO DE NEFROLOGIA).**

Protocolo 1 - Ficha de Consulta Inicial

**HOSPITAL SÃO LUCAS
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
AMBULATÓRIO DE DOENÇAS HIPERTENSIVAS**

FICHA CONSULTA INICIAL

IDENTIFICAÇÃO

CASO Nº: _____ REGISTRO: _____ DATA DA CONSULTA: ____/____/____
NOME COMPLETO: _____
DN: ____/____/____ SEXO: 1. Masculino 2. Feminino
COR: 1. Negra 2. Branca 3. Mista
PROFISSÃO: _____

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

ESCOLARIDADE:
1. Não estudou 4. 2º grau incompleto
2. 1º grau incompleto 5. 2º grau completo
3. 1º grau completo 6. Pós-graduação

ENDEREÇO RESIDENCIAL: FONE: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____

ENDEREÇO PROFISSIONAL: FONE: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____

NOME DE PARENTE/AMIGO: _____ FONE: _____
ENDEREÇO RESIDENCIAL: _____ CEP: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____

DADOS DE HISTÓRIA

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

02. Em caso afirmativo, como soube?

1. Médico 4. Medidores de rua/supermercado 8. Não se aplica
2. Enfermeiro/auxiliar 5. Suspeita ter 9. Não se lembra
3. Banco de sangue 6. Pré-natal 10. Outros: _____

03. Com que idade foi diagnosticado pressão alta? _____ anos Se paciente for ♂ vá para a pergunta 19.

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

1. Antes da gestação 3. Após a 20ª semana de gestação
2. Antes da 20ª semana de gestação 4. Não se aplica

05. História da gestação atual:

Idade gestacional: _____ sem. (DUM) _____ sem. (Eco com _____ sem.)
Pré-natal: 1. Sim 2. Não 8. Não se aplica

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

Dados do parto: Data: ____/____/____

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

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

09. Amamentação: 1. Sim 2. Não

Dados do RN:

10. Gênero: 1. Masculino 2. Feminino

11. Idade gestacional obstétrica: _____ sem 12. Idade gestacional pediátrica: _____ sem

13. APGAR: _____ / _____

14. 1. PIG 2. AIG 3. GIG

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

1. Não tem atividade
2. Caminha regularmente
3. Corre regularmente
4. Tem atividade física associada ao trabalho
5. Outra: _____

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

37. Anote outros diagnósticos estabelecidos anotados no prontuário:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	___/___/___	_____	1. _____	___/___/___	_____
2. _____	___/___/___	_____	2. _____	___/___/___	_____
3. _____	___/___/___	_____	3. _____	___/___/___	_____

38. Anote outras doenças que o paciente refere ter:

DIAGNÓSTICO	DATA	CID	DIAGNÓSTICO	DATA	CID
1. _____	___/___/___	_____	1. _____	___/___/___	_____
2. _____	___/___/___	_____	2. _____	___/___/___	_____
3. _____	___/___/___	_____	3. _____	___/___/___	_____

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

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

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

41. O paciente tem história de nefropatia do refluxo?

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

42. Que outros remédios usa atualmente?

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

43. Quem é o principal responsável pela renda familiar?

1. O próprio paciente 2. O marido/ companheiro 3. A esposa/companheira 4. Ambos 5. Outro: _____ 9. Não sabe

44. A renda familiar mensal estimada em salários mínimos é:

1. Até um salário 2. De um a três salários 3. De três a dez salários 4. De dez a vinte salários 5. De vinte a cinquenta 6. Mais de cinquenta

DADOS DE EXAME FÍSICO

45. PRESSÃO ARTERIAL Manguito: _____ cm

Início da consulta:

PA MS D: _____ / _____ mmHg

PA MS E: _____ / _____ mmHg

PA DL E: _____ / _____ mmHg

Fim da consulta:

PA MS E ou DL E: _____ / _____ mmHg

46. FREQUÊNCIA CARDÍACA: _____ bpm

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

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

53. Os pulsos carotídeos são

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

54. Há sopros no pré-córdio?

1. Não há sopros 2. Com sopros

55. O ritmo cardíaco é:

1. Regular 2. Irregular, sugere extrassístolia 3. Irregular, sugere fibrilação atrial 4. Irregular inespecífico

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

57. Há edema de membros inferiores?

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

58. Anote as anormalidades de semiologia respiratória:

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

59. Há massas palpáveis no abdômen?

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

60. A aorta é palpável no abdômen?

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

61. Há sopros no abdômen?

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

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

- 1. Normais
- 2. Ausente à D
- 3. Ausente à E
- 4. Ausente bilateralmente
- 5. Diminuído à D
- 6. Diminuído à E
- 7. Diminuídos bilateralmente
- 10. Com sopro (femorais)
- Pulso braquial: _____
- Pulso cubital: _____
- Pulso tibial anterior: _____
- Pulso tibial posterior: _____
- Pulso femoral: _____
- Pulso radial: _____

63. Anormalidades no exame neurológico:

- 1. Não há alterações
- 2. Hemiplegia à D
- 3. Hemiplegia à E
- 4. Hemiparesia à E
- 5. Hemiparesia à D
- 6. Alterações de sensibilidade
- 7. Distúrbio de equilíbrio
- 10. Afasia/disfasia
- 11. Alteração par craneano:
- 12. Outra: _____

64. Anormalidades do fundo de olho:

- 1. Sem anormalidades
- 2. Estreitamento arteriolar
- 3. Apagamento venoso
- 4. Represamento venoso
- 5. Exsudatos
- 6. Hemorragias
- 7. Edema de papila

RESULTADO DOS EXAMES COMPLEMENTARES

65. Exame qualitativo de urina:

- 1. pH: _____
- 2. densidade: _____
- 3. Sem alterações
- 4. Hematúria: _____ hem p/c
- 5. Leucocitúria: _____ leuc p/c
- 6. Proteinúria: _____ +
- 7. Glicosúria: _____ +
- 10. Cilindros granulosos: _____
- 11. Cilindros hialinos: _____
- 12. Cilindros hemáticos: _____

66. Proteinúria/amostra: _____ mg/dL **67. Creatininúria/amostra:** _____ mg/dL **68. Prt/Cr:** _____

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

70. Creatinina: _____ mg/dL **71. Uréia:** _____ mg/dL **72. Potássio:** _____ mEq/L

73. Glicemia em jejum: _____ mg/dL **74. Ácido úrico:** _____ mg/dL

75. TGO: _____ UI/L **76. TGP:** _____ UI/L

77. Colesterol total: _____ mg/dL **78. HDL colesterol:** _____ mg/dL

79. LDL colesterol: _____ mg/dL **80. Triglicérides:** _____ mg/dL

81. Hematócrito: _____ % **82. Hemoglobina:** _____ g/dL

83. Leucócitos: _____ 1. Desvio à E 2. Desvio à D

84. Plaquetas: _____

85. ECG:

86. Rx tórax:

LISTA DE PROBLEMAS

Anotar lesões em órgãos-alvo:

DIAGNÓSTICO

- 1. _____
- 2. _____
- 3. _____
- 4. _____

CID

- _____
- _____
- _____
- _____

CONDUTA

A. Retorno à consulta em:

_____ semanas.
 _____ mês (es).

B. Encaminhado a outro ambulatório: _____.

C. Tratamento não-medicamentoso recomendado:

- | | |
|--|---|
| 1. Parar de fumar | 5. Aumentar a ingestão de frutos e verduras |
| 2. Tratar a obesidade | 6. Limitar a ingestão de álcool |
| 3. Reduzir gorduras saturadas e carboidratos refinados | 7. Realizar exercícios físicos dinâmicos |
| 4. Reduzir a ingestão de sal | 8. Substituir a anticoncepção hormonal |

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

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

E. Exames solicitados:

- | | |
|---|---|
| 1. <input type="checkbox"/> Exame qualitativo de urina | 10. <input type="checkbox"/> Colesterol total, HDL e LDL |
| 2. <input type="checkbox"/> Proteinúria/amostra e Creatinúria/amostra | 11. <input type="checkbox"/> Hemograma |
| 3. <input type="checkbox"/> Proteinúria/ 24 horas | 12. <input type="checkbox"/> Plaquetas |
| 4. <input type="checkbox"/> Creatinina | 13. <input type="checkbox"/> TSH e T4 |
| 5. <input type="checkbox"/> Uréia | 14. <input type="checkbox"/> ECG |
| 6. <input type="checkbox"/> Potássio | 15. <input type="checkbox"/> Rx de tórax |
| 7. <input type="checkbox"/> Glicemia em jejum | 16. <input type="checkbox"/> Ecografia abdominal total/vias urinárias |
| 8. <input type="checkbox"/> Ácido úrico | 17. <input type="checkbox"/> Cintilografia com DMSA |
| 9. <input type="checkbox"/> TGO e TGP | 18. <input type="checkbox"/> Outro: _____ |

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

RESPONSÁVEIS PELA COLETA DOS DADOS BÁSICOS: _____

Protocolo 2 - Ficha de Consulta de Retorno

HOSPITAL SÃO LUCAS
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
AMBULATÓRIO DE DOENÇAS HIPERTENSIVAS

FICHA CONSULTA DE RETORNO

IDENTIFICAÇÃO

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

DADOS DE HISTÓRIA**01. Intorrências:**

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

03. Medicamentos em uso:

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

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

DADOS DE EXAME FÍSICO**05. PRESSÃO ARTERIAL**

Manguito: _____ cm

Início da consulta:

PA MS D: _____ / _____ mmHg

PA MS E: _____ / _____ mmHg

PA DL E: _____ / _____ mmHg

Fim da consulta:

PA MS E ou DLE: _____ / _____ mmHg

06. FREQUÊNCIA CARDÍACA: _____ bpm

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

10. O ritmo cardíaco é:

1. Regular 2. Irregular, sugere extrassístolia
 3. Irregular, sugere fibrilação atrial 4. Irregular inespecífico

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

12. Há edema de membros inferiores?

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

13. Anote as anormalidades de semiologia respiratória:

1. Não há anormalidades 4. Diminuição do MV à E 7. Estertores
 2. Aumento do diâmetro AP 5. Sibilos 8. Outra: _____
 3. Diminuição do MV à D 6. Roncos

14. Há massas palpáveis no abdômen?

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

- 3. Reduzir gorduras saturadas e carboidratos refinados
- 4. Reduzir a ingestão de sal

- 7. Realizar exercícios físicos dinâmicos
- 8. Substituir a anticoncepção hormonal

D. Tratamento medicamentoso recomendado:

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

E. Exames solicitados:

- | | |
|---|---|
| 1. <input type="checkbox"/> Exame qualitativo de urina | 10. <input type="checkbox"/> Colesterol total, HDL e LDL |
| 2. <input type="checkbox"/> Proteinúria/amostra e Creatininúria/amostra | 11. <input type="checkbox"/> Hemograma |
| 3. <input type="checkbox"/> Proteinúria/ 24 horas | 12. <input type="checkbox"/> Plaquetas |
| 4. <input type="checkbox"/> Creatinina | 13. <input type="checkbox"/> TSH e T4 |
| 5. <input type="checkbox"/> Uréia | 14. <input type="checkbox"/> ECG |
| 6. <input type="checkbox"/> Potássio | 15. <input type="checkbox"/> Rx de tórax |
| 7. <input type="checkbox"/> Glicemia em jejum | 16. <input type="checkbox"/> Ecografia abdominal total/vias urinárias |
| 8. <input type="checkbox"/> Ácido úrico | 17. <input type="checkbox"/> Cintilografia com DMSA |
| 9. <input type="checkbox"/> TGO e TGP | 18. <input type="checkbox"/> Outro: _____ |

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

RESPONSÁVEIS PELA COLETA DOS DADOS: _____

APÊNDICE I – ARTIGOS PUBLICADOS/SUBMETIDOS COMO PRIMEIRA AUTORA

ARTIGO 1 – Artigo de revisão publicado sob o título: Tratamento da Hipertensão Arterial na Gestação. Autores: **Hentschke, M.R.**; Farret, T.; Pinheiro-da-Costa, B. e Poli de Figueiredo, C.E.; Gadonski, G. Dados da publicação: *Acta Médica* (Porto Alegre), v. 31, p. 325-337, 2010.

TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL NA GESTAÇÃO

Marta Ribeiro Hentschke*

Tulio Cícero Franco Farret*

Bartira Ercília Pinheiro da Costa**

Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo**

Giovani Gadonski***

UNITERMOS

HIPERTENSÃO ARTERIAL, GESTAÇÃO, DOENÇA HIPERTENSIVA GESTACIONAL, TRATAMENTO

KEYWORDS

ARTERIAL HYPERTENSION, PREGNANCY, PREGNANCY-INDUCED HYPERTENSION, TREATMENT

SUMÁRIO

O aperfeiçoamento da abordagem terapêutica na Doença Hipertensiva Gestacional, especialmente através de ensaios clínicos, é fortemente restringido por preceitos éticos óbvios. Entretanto, esta patologia é uma das principais causas de morbimortalidade materna e perinatal, fazendo-se necessária aplicação de terapêutica medicamentosa. Os anti-hipertensivos são usados principalmente para prevenir e tratar a hipertensão grave, bem como para prolongar a gestação enquanto esta for segura, maximizando assim, a idade gestacional fetal e minimizando a exposição fetal aos efeitos adversos dos medicamentos. Dentre as opções terapêuticas, a metildopa permanece sendo a primeira escolha para uso durante a gestação, havendo ainda a possibilidade do uso de antagonistas do canal de cálcio, hidralazina e betabloqueadores. Estão contra-indicados os inibidores da ECA e os antagonistas dos receptores da angiotensina devido aos seus efeitos deletérios sobre o feto, os diuréticos devem ser evitados durante a lactação. O diagnóstico precoce, a constante monitorização materna e fetal, a instituição da terapia e a escolha adequada da droga, bem como a indicação precisa da

* Doutorandos da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

** Professor da Faculdade de Medicina da PUCRS – Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS

*** Médico do Serviço de Nefrologia da PUCRS – Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS

interrupção da gestação permanecem sendo as medidas mais eficazes disponíveis até o momento.

SUMMARY

The improvement of the therapeutic approach in the hypertensive Disorders of Pregnancy, particularly through clinical trials, is strongly restricted by ethical reasons. However this disease is a major cause of maternal and perinatal morbidity and mortality, leading to the prescription of drug therapy. Antihypertensive drugs are mainly used to prevent and treat severe hypertension, prolonging pregnancy as long and safe as possible, minimizing fetal risks, while avoiding the exposure to medications that may have adverse effects. Methyldopa remains the first drug option to treat hypertension during pregnancy. Calcium channel blockers, Hydralazine and beta-blockers can also be used. ACE Inhibitors and angiotensin II receptor blocker are contraindicated because of their effects in the fetus. Diuretics are avoided during lactation. Early diagnosis, continuous maternal and fetal surveillance, correct drug indication as well as timely pregnancy interruption remain the best available approach.

INTRODUÇÃO

A hipertensão na gravidez pode apresentar-se por manifestações clínicas distintas¹, tendo em vista que há gestantes portadoras de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), que pode agravar-se durante a gestação. Além do aumento da pressão arterial (PA), acompanhada ou não hipertensão prévia a gestação, podem também elevar a níveis patológicos a excreção de proteinúria, caracterizando uma das síndromes gestacionais mais temidas: a pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE). Esse conjunto de patologias recebe o nome de Doença Hipertensiva Gestacional (DHG), que constitui uma das mais importantes complicações do ciclo gravídico-puerperal, apresentando alto risco de morbimortalidade para o binômio mãe-filho¹.

A incidência de DHG é variável, dependendo do critério e da população estudada, pode ser estimada em 5 a 10%, chegando a 28% em hospitais universitários brasileiros². De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 2% a 8% das gestações são acometidas por pré-eclâmpsia e, juntamente com outras DHG, contribuem fortemente para a mortalidade materna mundial³.

A PE é a principal DHG, podendo gerar graves complicações na mãe e no feto. As encontradas na mãe são: descolamento prematuro de placenta, coagulação intravascular disseminada, hemólise, hemorragia cerebral, falência hepática, edema agudo de pulmão e insuficiência renal aguda⁴.

Até hoje, o tratamento definitivo da PE tem sido o parto, procedimento que leva à suspensão dos efeitos patológicos produzidos pela gestação com DHG. No entanto, a interrupção da gravidez nem sempre é benéfica para o feto, especialmente considerando um estado de prematuridade pela baixa idade gestacional. Diante desse fato, em casos selecionados, deve ser considerada a opção pelo tratamento conservador, para que o feto

alcance mais maturidade, mesmo considerando os riscos elevados de crescimento intra-uterino restrito e óbito fetal⁵.

É consenso que a hipertensão grave deve ser tratada com vistas à prevenção de complicações vasculares maternas⁶. Contudo, não está demonstrado o benefício da terapia anti-hipertensiva medicamentosa para hipertensão leve à moderada ($\leq 160/110$ mmHg), ou mesmo na hipertensão crônica e/ou induzida pela gestação⁷. A questão toma outra dimensão quando consideramos que, atualmente, as mulheres têm optado por ter filhos com idade mais avançada, fato que leva a um aumento na incidência de doença hipertensiva prévia. Por essa razão, alguns autores já consideram que mulheres previamente hipertensas com desenvolvimento normal da gravidez, sem co-morbidades, não devem ser tratadas com medicamentos, a menos que sua PA seja superior a 160/110 mmHg⁸. O limiar para iniciar o tratamento anti-hipertensivo é variável sendo que nos Estados Unidos a recomendação é uma pressão arterial de 160/105 mmHg, no Canadá, o limiar é de 140/90 mmHg, e na Austrália de 160/90 mmHg, sendo prática de alguns iniciar o tratamento quando a pressão arterial é de 150/100 mmHg, recomendações adotadas pelas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão de 2010.

Neste capítulo será abordado o tratamento atual da DHG segundo o *National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure Pregnancy* (NHBPEPWG) mostrando seus benefícios e riscos tanto para a mãe, quanto para o feto.

Classificação da Hipertensão Arterial

É importante sabermos identificar as gestantes com DHG de acordo com o seu estágio hipertensivo, pois o conhecimento adequado das classificações hipertensivas, tanto em gestantes quanto em não gestantes, poderá nos levar a ter diferentes condutas. Uma paciente, por exemplo, com hipertensão essencial estágio 1 (Quadro 1)⁷, sem lesão em órgão alvo e em boas condições de saúde, poderá ter um excelente prognóstico durante uma gestação. Por outro lado, uma paciente com hipertensão estágio 3 teria que ponderar muito mais os riscos de uma gestação antes mesmo de engravidar. O mesmo ocorre em pacientes que diagnosticam HAS durante a gestação. Aquelas com PA moderada, sem lesão em órgão alvo, receberão um tratamento diferenciado daquelas pacientes com HAS grave associada à proteinúria, as quais, provavelmente, necessitarão de internação hospitalar.

Quadro 1 – Critérios de Classificação da Hipertensão Arterial Sistêmica de acordo com o sétimo *Joint* e o NHBPEPWG

CLASSIFICAÇÃO JNC -7 (não gestante), mmHg			CLASSIFICAÇÃO NHBPEPWG (gestante) mmHg		
	Sistólica	Diastólica		Sistólica	Diastólica
Normal	≤ 120	e ≤ 80	Normal/aceitável na gestação	≤ 140	e ≤ 90
Pré-hipertensão	120 a 139	ou 80 a 89	Hipertensão Moderada	140 a 159	Ou 90 a 109
Hipertensão estágio 1	140 a 159	ou 90 a 99	Hipertensão grave	≥160	Ou ≥110
Hipertensão estágio 2	160 a 179	ou 100 a 110			
Hipertensão estágio 3	180 a 209	ou 110 a 119			

*JNC-7: Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and treatment of High Blood Pressure. **NHBPEPWG: National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure Pregnancy.

Classificação da Hipertensão na Gestação

Além do conhecimento dos estágios hipertensivos, a classificação da DHG em seus principais subtipos também deve ser considerada para uma adequada conduta terapêutica. No entanto, por não haver um consenso entre os órgãos que estudam esta patologia, a otimização do tratamento para a DHG acaba sendo dificultada. Desta forma, neste capítulo, teremos como base a classificação proposta pelo NHBPEPWG, (Quadro 2)⁹.

Quadro 2 – Doença Hipertensiva Gestacional: classificações propostas por diferentes grupos de pesquisa.

PROPONENTES*					
NHBPEPWG	CHS	OMS	ISSH	ASSH	ACOG
HAS crônica	HAS preexistente, essencial e/ou secundária	HAS preexistente, HAS renal e/ou proteinúria na gestação; HAS sobreposta ou doença renal	HAS crônica, doença renal crônica	HAS crônica, essencial ou secundária	HAS crônica
HAS gestacional (transitória ou crônica)	HAS gestacional sem proteinúria, com ou sem condições adversas	HAS gestacional Proteinúria gestacional	HAS gestacional Proteinúria gestacional	--	--
Pré-eclâmpsia, eclâmpsia	HAS gestacional com proteinúria, com ou sem condições adversas	Pré-eclâmpsia, eclâmpsia	HAS gestacional proteinúrica	Pré-eclâmpsia, leve/severa	HAS induzida na gravidez (inclui pré-eclâmpsia, eclâmpsia e síndrome HELLP)
Pré-eclâmpsia sobreposta à HAS crônica	HAS preexistente + HAS gestacional sobreposta com proteinúria	Pré-eclâmpsia sobreposta	HAS crônica com pré-eclâmpsia sobreposta	Pré-eclâmpsia sobreposta em HAS crônica	HAS crônica com HAS induzida na gestação sobreposta

*Proponentes: NHBPEPWG: National High Blood Pressure Education Program Working Group; CHS: Canadian Hypertensive Society; OMS: Organização Mundial da Saúde; ISSH: International Society for the Study of Hypertension; ASSH: Australasian Society for the Study of Hypertension; ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists; HAS: Hipertensão arterial sistêmica.

A dificuldade na escolha do termo adequado deve-se ao fato de que a hipertensão é uma síndrome, e tentativas de definição utilizam marcadores arbitrariamente selecionados,

incluindo alterações de importância fisiopatogênica¹. O termo Síndrome de pré-eclâmpsia também tem sido empregado quando não é possível diferenciar entre pré-eclâmpsia e pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica¹⁰

As definições dos distúrbios hipertensivos gestacionais segundo o Relatório do NHBEPWG estão listadas abaixo⁹.

Pré-eclâmpsia/eclâmpsia: Síndrome específica da gravidez humana, que ocorre após a vigésima semana de gestação e é caracterizada por HAS e proteinúria. A HAS é definida como PA sistólica acima de 139 mmHg e/ou diastólica acima de 89 mmHg em gestante previamente normotensa. A proteinúria é definida como patológica quando ultrapassar 300 mg em 24 horas e/ou possuir uma relação proteinúria sobre creatinúria de amostra maior ou igual a 0,3. A evolução para eclâmpsia caracteriza-se pela presença de convulsões nestas pacientes.

Hipertensão crônica: Presença de HAS prévia à gestação, ou que se instala durante o período gestacional e permanece após doze semanas do parto.

Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica: É o desenvolvimento da síndrome de pré-eclâmpsia em paciente com HAS crônica.

Hipertensão gestacional: HAS detectada pela primeira vez após a vigésima semana de gestação sem proteinúria patológica. O diagnóstico somente poderá ser confirmado com a normalização da PA no período de até doze semanas após o parto, dessa maneira classificado como HAS transitória.

Tratamento da Doença Hipertensiva Específica da Gestação de Acordo com a Gravidade da Doença

Tratamento Agudo

Hipertensão grave

A hipertensão gestacional grave é definida por níveis tensionais $\geq 160/110$ mmHg. Essa situação requer tratamento medicamentoso devido ao aumento do risco de hemorragia cerebral, levando à redução da possibilidade de morte materna¹.

Pacientes com encefalopatia hipertensiva, hemorragia ou eclâmpsia requerem tratamento com drogas parenterais visando à diminuição da PA média (2/3 pressão diastólica + 1/3 pressão sistólica) em 25% ao longo de minutos a horas, e em seguida, à redução para menos de 160/100 mmHg nas horas subseqüentes¹. Ao tratar a hipertensão grave, é importante evitar a hipotensão, que pode levar ao comprometimento do bem-estar fetal, devido ao agravamento da perfusão placentária, já prejudicado pelo processo fisiopatológico. Em pacientes pré-eclâmpticas com hipertensão aguda, devemos iniciar a terapia administrando a dose mais baixa possível, visto que essas pacientes possuem um volume intravascular reduzido, aumentando o risco de hipotensão. Uma recente meta-análise que comparou diferentes drogas anti-hipertensivas para tratamento de hipertensão grave na gestação concluiu que não existe dados suficientes em benefício de um agente sobre o outro¹¹. Embora outros trabalhos tenham concluído que agentes como labetalol parenteral ou

nifedipina via oral sejam preferíveis em função dos efeitos adversos materno-fetais reduzidos¹². O Quadro 3 mostra os principais tratamentos para crise hipertensiva.

Quadro 3 – Tratamento medicamentoso da hipertensão grave durante a gestação⁷

DROGA	DOSE E VIA	COMENTÁRIOS
Labetalol (C, D no 2º e 3º trimestre)** (NC: <i>Trandate</i>)	10 a 20 mg IV, após 20 a 80 mg a cada 20 a 30 minutos. Dose máxima 300mg; para infusão: 1 a 2 mg/min	Supera a Hidralazina por apresentar poucos efeitos adversos e baixo risco de hipotensão. Ter cuidado em pacientes com asma ou insuficiência cardíaca congestiva
Hidralazina (C) (NC: <i>Nepresol, Apresolina</i>)	5mg, IV ou IM, após 5 a 10mg a cada 20 a 40 minutos; quando PA controlada, repetir a cada 3 horas; para infusão: 0,5 a 10,0 mg/h; sem sucesso com 20mg IV ou 30 mg IM, considerar outra droga.	Droga de escolha segundo o NHBPEPWG. Longa experiência em segurança e eficácia.
Nifedipina (C) (NC: <i>Adalat, Dilaflux</i>)	10 a 30mg VO, repetir em 45 minutos, se necessário	Uso obstétrico de curta ação tem sido favorável, embora não seja aprovado pelo FDA para o tratamento hipertensivo crônico.
Diazóxido (C) (NC: <i>Tensuril</i>)	30 a 50 mg IV a cada 5 a 15 minutos	Pouco usado. Pode causar hiperglicemia
Nitroprussiato de Sódio (C) (relativamente contra-indicado) (NC: <i>Nipride</i>)	Infusão contínua de 0,25 a 5,0 mcg/Kg por minuto	Possível toxicidade a cianeto se usado por > 4 horas. Última opção.

*Food and Drug Administration / NC: nome comercial

** Medicamento não fabricado no Brasil

Tratamento Crônico/Ambulatorial

Hipertensão leve a moderada

A Hipertensão gestacional leve a moderada é definida por níveis tensionais com valores entre 140 a 159 mmHg de PAS e/ou entre 90 e 109 mmHg para PAD.

Medicamentos utilizados no tratamento da DHG¹³ (Risco FDA*)

Quadro 4 – Tratamento medicamentoso da doença hipertensiva gestacional

DROGA	DOSE DIÁRIA	COMENTÁRIOS
Metildopa (B) (NC: <i>Aldomet, Metildopa</i>)	0,5 a 3,0 g divididas em 1 a 4 doses	Droga de primeira escolha
Hidralazina (C) (NC: <i>Nepresol, Apresolina</i>)	50 a 300 mg divididos em 2 a 4 doses	Contra-indicada em cardiopatia isquêmica, usada como segunda escolha, associada à outra droga.
Nifedipina (C) (NC: <i>Adalat, Dilaflux</i>)	10 a 20 mg divididos em 4 a 6 doses Via oral	Pode cursar com cefaléia Não usar sublingual (SL)
Verapamil (C) (NC: <i>Dilacorón</i>)	240 a 320 mg divididos em 3 doses	Pode cursar com tontura, náuseas e constipação

		intestinal
Labetalol** (C, D no 2º e 3º trimestre) (NC: <i>Trandate</i>)	Início com 1-3 mg/kg/dia dividido em 2 doses, chegando ao máximo de 10-12 mg/kg/dia, até 1200 mg/dia	Potencial bradicardia fetal, CIUR e hipotensão.
Pindolol (B) (NC: <i>Visken</i>)	Início com 5 mg 2x/dia, máximo de 10-40mg 2x/dia.	Potencial bradicardia fetal, CIUR e hipotensão.
Metoprolol (C) (NC: <i>Seloken</i>)	Início com 25-100 mg 1x/dia; aumentando a dose semanalmente até efeito desejado. Máximo: 400 mg/dia. Dose usual: 50-100 mg/dia.	Potencial bradicardia fetal, CIUR e hipotensão.
Atenolol (D) (NC: <i>Atenol, Ablok</i>) - EVITAR -	25-50 mg 1x/dia, podendo chegar a 100 mg/dia	Potencial bradicardia fetal, CIUR e hipotensão.
Propranolol (C) e (D no 2º e 3º trimestre) (NC: <i>Propranolol</i>) - EVITAR -	40 mg 2x/dia; Dose usual: 120-240 mg dividido em 2-3 doses/dia; Dose máxima diária: 640 mg;	Potencial bradicardia fetal, CIUR e hipotensão.
Diuréticos: Hidroclorotiazida (B) (NC: <i>Clorana</i>) Furosemida (C) (NC: <i>Lasix</i>) Amilorida (B) (NC: Diupress) Espironolactona (C/D) (NC: <i>Aldactone</i>) - EVITAR -	Conforme a droga utilizada	Depleção transitória de volume intravascular, potencial CIUR.

*Food and Drug Administration / NC: Nome comercial

** Medicamento não fabricado no Brasil. CIUR: Crescimento intrauterino restrito

Nenhum anti-hipertensivo tem sido preconizado como seguro durante o primeiro trimestre de gestação. A terapia medicamentosa é recomendada para hipertensão crônica não complicada quando a PA diastólica é ≥ 100 mmHg (medida no início da Fase V de Korotkoff, quando ocorre o desaparecimento das bulhas e melhor correlação com a pressão intra-arterial)¹⁴. O tratamento medicamentoso para níveis tensionais < 99 mmHg pode ser a indicado para pacientes com diabetes mellitus, doença renal ou dano em órgão alvo⁷.

Classificação Dos Agentes Anti-Hipertensivos:

A classificação apresentada no Quadro 5 baseia-se principal local ou mecanismo de ação de anti-hipertensivos¹⁵.

Quadro 5 - Classificação dos fármacos anti-hipertensivos de acordo com classe, local de ação e medicamentos comumente utilizados

CLASSE	LOCAL/AÇÃO	EXEMPLOS
Diuréticos	Tiazídicos e agentes relacionados Ação no túbulo distal	Hidroclorotiazida; clortalidona
	Diuréticos de alça de Henle	Furosemida
	Diuréticos poupadores de potássio Ação no ducto coletor	Amilorida; espironolactona
Agentes simpaticolíticos	Antagonistas Beta-adrenérgicos	Metoprolol; atenolol
	Antagonistas Alfa-adrenérgico	Prazosina; doxazosina

	Antagonistas adrenérgicos mistos	Labetalol; carvedilol
	Agentes de ação central	Metildopa ; clonidina
Bloqueadores dos canais de cálcio	Não-Diidropiridínicos	Verapamil; diltiazem.
	Diidropiridínicos	Anlodipina; nifedipina.
Inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA)	Formação de angiotensina I	Captopril; enalapril
Antagonistas dos receptores de angiotensina II	Receptores de angiotensina II	Losartana; Valsartana
Vasodilatadores	Arteriais	Hidralazina
	Arterial e venoso	Nitroprussiato

Características das Principais Drogas Utilizadas no Tratamento da DHG ^{15,1,8}:

Para a escolha da melhor droga a ser usada no tratamento da Hipertensão, é importante conhecermos os mecanismos de ação, os efeitos colaterais e as principais contra-indicações das mesmas. Para tanto, no Quadro 6, podemos observar tais características das quatro principais e mais utilizadas drogas no tratamento do aumento dos níveis tensionais na gestação.

Quadro 6 – Propriedades dos Principais Fármacos Utilizados no Tratamento da DHG

	Metildopa
Mecanismo de ação	Age estimulando os receptores alfa2-agonistas, que por sua vez inibem os neurônios dos núcleos centrais do sistema nervoso simpático, levando a hipoativação adrenérgica (redução da noradrenalina nas fendas sinápticas). A consequência desta hipoativação é a redução da resistência vascular periférica e do débito cardíaco, resultando no seu efeito anti-hipertensivo. Além disso, leva à diminuição dos níveis de renina pela redução da atividade adrenérgica.
Efeitos colaterais	Sedação, hipotensão postural, diarreia, pancreatite, xerostomia, impotência sexual, redução da libido, depressão, hepatite (eventualmente, com alteração de provas hepáticas), síndrome <i>lúpus like</i> (pacientes podem apresentar anticorpo antinuclear positivo), anemia hemolítica e trombocitopenia.
Contra-Indicações	Hipersensibilidade a metildopa ou qualquer componente de sua fórmula; doença hepática em atividade; doença hepática previamente associada ao uso de metildopa; em uso de inibidores da Monoaminoxidase; alergia ao bissulfito se uso de suspensão oral ou injetável.
	Hidralazina
Mecanismo de ação	Derivado ftalazínico que penetra na célula muscular vascular exercendo efeito vasodilatador. Produz vasodilatação direta das arteríolas, que são vasos de resistência (com baixo efeito em sistema venoso) diminuindo resistência vascular sistêmica.
Efeitos colaterais	Taquicardia, angina, hipotensão ortostática (raro), hipertensão paradoxal, edema periférico, colapso vascular (raro), rubor facial, febre, urticária, prurido, anorexia, náusea, vômitos, diarreia, constipação, íleo adinâmico, impotência sexual, fraqueza, tremor, conjuntivite, lacrimejamento, congestão nasal, dispnéia, síndrome <i>lupus like</i> , anemia hemolítica, vasculite e glomerulonefrite.
Contra-Indicações	Hipersensibilidade à hidralazina ou a qualquer componente da formulação; cardiopatia mitral reumática.
	Nifedipina
Mecanismo de ação	Age bloqueando os canais de cálcio tipo L presentes na membrana celular, reduzindo significativamente o influxo celular de cálcio. Possui ação preferencial na musculatura lisa vascular (vasosseletividade), especialmente das artérias e arteríolas. Exerce seu efeito anti-hipertensivo pela propriedade vasodilatadora periférica, reduzindo a resistência vascular periférica. Como desvantagem, provoca rápida vasodilatação arterial que desencadeia taquicardia e aumento da

	contratilidade cardíaca pela ativação reflexa do sistema nervoso simpático.
Efeitos colaterais	Rubor facial, edema periférico, tonturas, vertigem, cefaléia, náusea, palpitação, hipotensão transitória, nervosismo, mudança de humor, fadiga, febre, dermatite, prurido, urticária, diarréia, constipação, hiperplasia gengival, flatulência, visão borrada, tosse, congestão nasal, dispnéia, diaforese.
Contra-Indicações	Hipersensibilidade à nifedipina ou a qualquer outro componente da fórmula; uso da forma de liberação lenta para o tratamento de urgência ou crise hipertensiva; infarto agudo do miocárdio.
	Labetalol*:
Mecanismo de ação	Alfa e betabloqueador que age como vasodilatador arterial e venoso, além de possuir efeito cardioinibitório.
Efeitos colaterais	Hipotensão postural, tontura, fadiga, náuseas, hipotensão (1% a 5%), edema, rubor, arritmia ventricular, sonolência, dor de cabeça, vertigem, formigamento do couro cabeludo, prurido, dispepsia, vômito, alteração do paladar, impotência, aumento das transaminases, parestesia, fraqueza, visão borrada, aumento da uréia, congestão nasal, dispnéia, diaforese, alopecia (reversível), angioedema, bradicardia, broncoespasmo, icterícia, diabetes insipidus, necrose hepática, hepatite, hipersensibilidade, doença de Peyronie, rash psoriaforme, síndrome de Raynaud, síncope, lúpus eritematoso sistêmico, miopatia tóxica, retenção urinária, urticária.
Contra-indicações	Hipersensibilidade ao labetalol ou a qualquer outro componente da fórmula; bradicardia severa; bloqueio cardíaco maior que 1º grau (exceto em pacientes com marcapasso artificial funcionante); choque cardiogênico; asma; insuficiência cardíaca descompensada; condições associadas a hipotensão severa prolongada.

* Medicamento não fabricado no Brasil

Drogas Contra-Indicadas na Gravidez

Existem drogas que não são recomendadas durante a gestação em função de seus riscos serem maiores do que os benefícios do tratamento anti-hipertensivo. Os diuréticos, por exemplo, podem reduzir a pressão de perfusão uterina, podendo ser usados apenas em casos específicos. Inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA), assim como os bloqueadores dos receptores da angiotensina II (ARAI) não devem ser usados durante a gestação¹³. Está indicada a suspensão dessas classes de medicamentos naquelas pacientes que vinham em uso crônico, porém, os diuréticos podem ser mantidos em pacientes com doença renal ou doença cardíaca prévias¹⁶.

Os iECA e ARAII, especialmente quando utilizados no segundo e terceiro trimestre, são considerados tóxicos para o feto, podendo levar à ossificação incompleta do escalpo fetal e defeitos renais secundários à redução da perfusão renal¹³.

Nitroprussiato é contra-indicado nos estágios posteriores da gestação devido à intoxicação por cianeto se forem utilizados por mais de quatro horas. Entretanto, nitroprussiato (0,5 a 10 mcg / kg / min) pode ser considerado um agente de último recurso para controle de hipertensão grave refratária⁷.

MANEJO DA HIPERTENSÃO NO PÓS-PARTO:

Drogas anti-hipertensivas devem ser utilizadas se a pressão arterial sistêmica exceder 150 mmHg de pressão sistólica ou 100 mmHg de pressão diastólica nos 4 primeiros dias de puerpério. A escolha do melhor anti-hipertensivo é influenciada pela amamentação; mas, na maioria dos casos, a droga usada durante a gestação continua sendo usada no período pós-parto. A medicação deve ser interrompida ou descontinuada quando a PA normalizar. Isso

pode ocorrer em dias ou semanas após o parto e o controle da PA pela paciente pode auxiliar neste processo⁷.

O uso de furosemida parece beneficiar as pacientes que cursaram com pré-eclâmpsia grave, particularmente nos quadros acompanhados de hipertensão associado a sintomas pulmonares ou edema periférico¹⁷. Alguns casos mostram que o uso de anti-inflamatórios não esteróides pode contribuir para o aumento da PA pós-parto, devendo ser evitados¹⁸.

O período de 12 semanas deve ser respeitado para o diagnóstico de hipertensão crônica persistente. Neste período, a medicação pode ser descontinuada ou suspensa conforme os níveis tensionais apresentados em ambulatório. Os quadros de HAS gestacional sem proteinúria apresentam maior chance de regressão espontânea quando comparados com situações acompanhadas de proteinúria¹³. Em casos de HAS leve, deve ser considerada a suspensão da medicação enquanto ocorrer o aleitamento¹⁶.

Anti-Hipertensivos e Amamentação

Todos os anti-hipertensivos comumente utilizados são excretados no leite materno, mas em quantidades consideradas não-prejudiciais¹³. Os diuréticos podem suprimir a lactação antes do seu estabelecimento, devendo ser evitado o seu uso¹⁹. Não houve efeitos adversos relacionados à utilização de metildopa e hidralazina⁸. Em casos de necessidade do uso de beta-bloqueador, propranolol e labetalol, estes aparecem em menor concentração no leite materno¹⁶. O uso de iECA, como enalapril, são contra-indicados na gestação, mas compatíveis com a amamentação, podendo ser utilizados no puerpério¹³. A relação dos anti-hipertensivos com a lactação pode ser observada no quadro abaixo²⁰.

Quadro 7 – Recomendações para utilização de anti-hipertensivos durante a amamentação

Medicamentos	Recomendações
Diuréticos: Hidroclorotiazida, espironolactona Inibidores Adrenérgicos: alfametildopa, propranolol Vasodilatadores: Hidralazina, minoxidil Antagonistas dos canais de cálcio: Verapamil, Nifedipino, nitrendipino Inibidores da ECA: Benazapril, captopril, enalapril, quinadril	Seguros
Diuréticos: Indapamida, furosemida, triantereno Inibidores Adrenérgicos: Atenolol, bisoprolol, carvedilol, metoprolol Antagonistas dos canais de cálcio: Anlodipino, isradipino, nisoldipino Inibidores da ECA: Fosinopril, lisinopril, ramipril Bloqueadores do receptor AT1: Candesartana, olmesartana, telmisartana	Moderadamente seguros
Inibidores Adrenérgicos: Reserpina, nadolol, prazosina, terazosina Inibidores da ECA: Fosinopril*, quinapril* Bloqueadores do receptor AT1: Telmisartana*, valsartana	Potencialmente perigosos

Discussão

Poucos avanços têm sido registrados recentemente no tratamento ambulatorial dos distúrbios hipertensivos gestacionais. As perspectivas se voltam para uma melhor compreensão da fisiopatologia dessas patologias, resultando em progressos menos inespecíficos do diagnóstico e manejo das pacientes.

As mulheres que já apresentaram pré-eclâmpsia em alguma gestação possuem risco aumentado de desenvolver esta patologia nas próximas gestações, e devem ser instruídas quanto a essa possibilidade. Além disso, devem realizar acompanhamento ambulatorial para monitorizar o risco de desenvolver HAS crônica, podendo este fato justificar um tratamento medicamentoso adequado para cada paciente.

Sabe-se que ainda há muitas controvérsias quanto ao tratamento da hipertensão durante a gestação. Alguns autores acreditam que o tratamento da hipertensão leve deve ser realizado para evitar a progressão da doença; no entanto, esse argumento é considerado insuficiente para justificar a exposição do feto a potenciais efeitos adversos das medicações sobre o seu crescimento. Quanto à hipertensão grave, está estabelecido entre os especialistas que este distúrbio deve ser tratado, buscando a prevenção de complicações maternas. Contudo, não há consenso quanto ao limiar de PA ideal para o início da terapia. A maioria dos estudos utiliza como limiar de tratamento uma PAS maior ou igual a 160 mmHg e uma PAD maior ou igual a 110 mmHg; porém, sem deixar de mencionar possível hipotensão, que acarretaria diminuição do fluxo placentário, prejudicando a perfusão fetal.

A maior indicação de tratamento anti-hipertensivo é a prevenção do acidente vascular encefálico, que está associado à pré-eclâmpsia grave, eclâmpsia e Síndrome HELLP (do inglês: hemólise, elevação de enzimas hepáticas e redução do número de plaquetas)⁵. Além disso, mulheres que tiveram pré-eclâmpsia estão mais suscetíveis a complicações hipertensivas nas gestações subsequentes e a eventos cardiovasculares e renais no futuro. Estas possíveis complicações da DHG, associada ao risco materno-fetal durante o período gestacional, são suficientes para explicar a importância de se conduzir adequadamente estas pacientes, com devidas orientações e com a administração de efetivas drogas²¹.

CONCLUSÃO

A pré-eclâmpsia deve ser diagnosticada adequadamente e o mais precocemente possível durante a gestação, necessitando de acompanhamento pré-natal de alto risco.

O tratamento definitivo da pré-eclâmpsia é a interrupção da gestação e conseqüente remoção da placenta¹. A permanência da gestação aumenta o risco de complicações, tais como, convulsões, edema pulmonar e hemorragia cerebral. Ao tratar a hipertensão arterial na gestante, é importante classificá-la entre HAS crônica, HAS gestacional e pré-eclâmpsia. Desfechos maternos e neonatais são usualmente favoráveis entre gestantes que possuem tanto HAS crônica, quanto HAS gestacional²². O objetivo principal do tratamento é diminuir a morbimortalidade materna e fetal e, quando possível, prolongar a gestação, buscando melhor bem-estar fetal⁹.

A pré-eclâmpsia/eclâmpsia é uma das principais síndromes da gestação potencialmente letais para mãe e feto, não respondendo bem à terapia anti-hipertensiva convencional utilizada em pacientes fora do período gestacional²². Sendo assim, torna-se necessário o profundo conhecimento e treinamento da equipe médica que trata tais patologias, buscando a melhor assistência às gestantes que venham a desenvolver esses distúrbios, a fim de protegê-las dos desfechos desfavoráveis encontrados em nosso meio.

REFERÊNCIAS

1. 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.
2. Neme B. Doença hipertensiva específica da gestação. IN: Neme B: *Obstetrícia básica*. Editora Sarvier. Capítulo 30, p. 216-243, 1994.
3. Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gulmezoglu AM, Van Look PFA. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 1066–74.
4. Garovic VD. Hypertension in Pregnancy: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2000;(75):1071-1076
5. Management of hypertension in pregnancy. Sample doses for treatment of hypertension in pregnancy. 2010 UpToDate
6. Stekkiger E, Zandstra M, Peeters LLH and Spaanderman MEA. Early-Onset Preeclampsia and the Prevalence of Postpartum Metabolic Syndrome. *Obstet Gynecol* 2009;114:1076-84.
7. Tiina Podymow, Phyllis August. Update on the Use of Antihypertensive Drugs in Pregnancy. *Hypertension* 2008;51:960-969
8. Chobanian, A. Seventh Report of the Joint National Committee on prevention, Detection, evaluation, and treatment of High blood pressure. *Hypertension*, v.42, p. 1206-1252, 2003.
9. Comparsi AB, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Paula LG. Pré-eclâmpsia: diagnóstico e tratamento. *ACTA Médica (Porto Alegre)*, v.22, p.293-309,2001. ediPUCRS
10. Odegard, R. A.; Vatten, L. J.; Nilsen, S. T.; Salvesen, K. A. & Austgulen, R. Risk factors and clinical manifestations of pre-eclâmpsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 107: 1410-1416, 2000.
11. Duley L, Henderson-Smart DJ, Meher S. Drugs for treatment of very high blood pressure during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.*2006; 3: CD001449
12. Magee LA, Cham C, Waterman EJ, Ohlsson A, von Dadelszen P. Hydralazine for treatment severe hypertension in pregnancy: meta-analysis. *BMJ.* 2003;327:955-960.
13. Gadonski G. Hipertensão arterial na gravidez: avanços no tratamento ambulatorial. *Revista da sociedade Brasileira de Hipertensão* disponível em: [HTTP://www.sbh.org.br](http://www.sbh.org.br)
14. Filho AP, Schmidt A, Maciel BC. Exame Físico do Sistema Cardiovascular. IN: SOCESP. *Tratado de Cardiologia*. Editora Manole Limitada. 1ª Edição Brasileira, 2005.
15. Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker. Goodman & Gilman. *As Bases da terapêutica*. 11ª edição.
16. Roberts, J.M.; Pearson, G. D.; Cutler, J. A.; Lindheimer, M. D. Summary of the NHLBI Working group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens.pregnancy*, v.22,p.109-127, 2003.
17. Ascarelli MH, Johnson V, McCreary H, Cushman J, May WL, Martin JN Jr. Postpartum preeclampsia management with furosemide: a randomized clinical trial. *Obstet Gynecol.* 2005;105:29-33.
18. Markis A, Thornton C, Hennessy A. Postpartum hypertensive and non-steroidal analgesia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190:577-578
19. Soydemir, F.; Fenny, L. Hypertension in pregnancy. *Curr. Obstet. Gynecol.* V.16,p.315-320,2006.
20. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, *Revista Brasileira de Hipertensão*. volume 17, NÚMERO 1, janeiro/março de 2010
21. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclâmpsia. *Lancet.* 2010 Aug 21;376(9741):631-4
22. Baha M. Sibai, M.D. Treatment of Hypertension in Pregnant Women. *The New England Journal Of Medicine*

ARTIGO 2 – Artigo Original publicado sob o título: Is the atherosclerotic phenotype of preeclamptic placentas due to altered lipoprotein concentrations and placental lipoprotein receptors? Role of a small-for-gestational-age phenotype. Autores: **Marta R. Hentschke**, Carlos E. Poli-de-Figueiredo, Bartira E. Pinheiro da Costa, Lesia O. Kurlak, Paula J. Williams, Hiten D. Mistry. Dados da Publicação: *Journal of Lipid Research*. 2013 Oct;54(10):2658-64. doi: 10.1194/jlr.M036699.

Is the atherosclerotic phenotype of preeclamptic placentas due to altered lipoprotein concentrations and placental lipoprotein receptors? Role of a small-for-gestational-age phenotype

Marta R. Hentschke,^{*†} Carlos E. Poli-de-Figueiredo,[†] Bartira E. Pinheiro da Costa,[†] Lesia O. Kurlak,[§] Paula J. Williams,^{**} and Hiten D. Mistry^{1,*}

Division of Women's Health,^{*} Women's Health Academic Centre, King's College London, London, UK; Laboratory of Nephrology-IPB,[†] School of Medicine, PUCRS, Porto Alegre, Brazil; and Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Clinical Sciences[§] and School of Veterinary Medicine and Science,^{**} University of Nottingham, Nottingham, UK

Abstract Atherosclerosis of spiral arteries in uteroplacental beds from preeclamptic women resemble those of atherosclerosis, characterized by increased plasma lipids and lipoproteins. We hypothesized that: 1) lipoprotein receptors/transporters in the placenta would be upregulated in preeclampsia, associated with increased maternal and fetal lipoprotein concentrations; and 2) expression of these would be reduced in preeclamptic placentae from women delivering small-for-gestational-age (SGA) infants. Placental biopsies and maternal and umbilical serum samples were taken from 27 normotensive and 24 preeclamptic women. Maternal/umbilical cord serum LDL, HDL, total cholesterol, and triglycerides were measured. Placental mRNA expression of lipoprotein receptors/transporters were quantified using quantitative RT-PCR. Protein localization/expression of LDL receptor-related protein 1 (LRP-1) in the preeclamptic placentae with/without SGA was measured by immunohistochemistry. Placental mRNA expression of all genes except paraoxonase-1 (*PON-1*), microsomal triglyceride transfer protein (*MTTP*), and protein disulfide isomerase family A member 2 (*PDIA2*) were observed. No differences for any lipoprotein receptors/transporters were found between groups; however, in the preeclamptic group placental *LRP-1* expression was lower in SGA delivering mothers ($n = 7$; $P = 0.036$). *LRP-1* protein was localized around fetal vessels and Hofbauer cells. This is the first detailed study of maternal/fetal lipoprotein concentrations and placental lipoprotein receptor mRNA expression in normotensive and preeclamptic pregnancies. These findings do not support a role of altered lipid metabolism in preeclampsia, but may be involved in fetal growth.—Hentschke, M. R., C. E. Poli-de-Figueiredo, B. E. Pinheiro da Costa, L. O. Kurlak, P. J. Williams, and H. D. Mistry. Is the atherosclerotic phenotype of preeclamptic placentas due to altered lipoprotein

concentrations and placental lipoprotein receptors? Role of a small-for-gestational-age phenotype. *J. Lipid Res.* 2013. 54: 2658–2664.

Supplementary key words hypertension • lipids • low density lipoprotein cholesterol • high density lipoprotein cholesterol • triglycerides • ATP binding cassette transporter A1 • LDL receptor-related protein 1 • LDL receptor • scavenger receptor class B type 1 • fetal growth

Gestational hyperlipidemia is a common factor in pregnancy in which the maternal circulating lipid profile changes from an anabolic to a catabolic state, increasing lipids, especially triglycerides (TGs) and lipoproteins (1). From the 12th week of gestation, phospholipids, total cholesterol (TC), LDL, HDL, and TGs increase in response to estrogen stimulation and insulin resistance (2). Thus, during the first two trimesters, it is common to see maternal fat accumulation; however, in the third trimester there is enhanced lipolytic activity and decreased lipoprotein lipase (LPL) activity in the adipose tissue, consequently, fat storage declines or ceases (3). Early in gestation, the lipids are required to develop the fetal brain and central nervous system (4), to build cell membranes, and as a precursor of bile acids and steroid hormones (2). However, a maternal source of lipids is still required until term, but in lower amounts, possibly due to some fetal-derived lipids

Abbreviations: AGA, adequate-for-gestational-age; BMI, body mass index; FGR, fetal growth restriction; FGR-M, fetal growth restriction without hemodynamic changes; FGR-S, fetal growth restriction with hemodynamic changes; IQR, interquartile range; LDL-R, LDL receptor; LRP-1, LDL receptor-related protein 1; MMP, matrix metalloproteinase; MTTP, microsomal triglyceride transfer protein; PDIA2, protein disulfide isomerase family A member 2; PON-1, paraoxonase-1; SGA, small-for-gestational-age; SRB-1, scavenger receptor class B type 1; TC, total cholesterol; TG, triglyceride.

¹To whom correspondence should be addressed.
e-mail: hiten.mistry@kcl.ac.uk

This work was supported by Tommy's Charity (charity number: 1060508) and CAPES/CNPq, Brazil.

Manuscript received 12 February 2013 and in revised form 16 July 2013.

Published, JLR Papers in Press, July 29, 2013

DOI 10.1194/jlr.M036699



from the lipogenic activity in the fetal liver, adrenal, and testes (2). Conversely, increased TGs during pregnancy have been shown to augment the risk of preeclampsia, preterm birth, and fetal growth restriction (FGR) (2, 5). The lipid metabolism and plasma levels are also affected by maternal factors such as body mass index (BMI), maternal weight gain, maternal nutrition, prepregnancy lipid levels, and various medical complications of pregnancy such as diabetes (6).

Complicating 2–8% of pregnancies, preeclampsia, along with the other hypertensive disorders of pregnancy, is one of the three leading causes of maternal morbidity and mortality worldwide (7). This disorder increases perinatal outcomes such as prematurity and FGR (8). Preeclampsia is generally defined as high blood pressure (systolic blood pressure of ≥ 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg) and proteinuria (≥ 300 mg/24 h) at or after 20 weeks gestation (9). The cause of preeclampsia remains unknown, but endothelial dysfunction, leading to compromised uteroplacental perfusion and reduced maternal-fetal transport of oxygen and nutrients is thought to be involved (10–13). Different lines of evidence indicate that abnormal lipid metabolism is involved in the pathogenesis of the disease, with acute atherosclerosis seen in preeclamptic uteroplacental beds resembling atherosclerotic lesions of coronary arteries (14). The presence of lipoprotein receptors in placental syncytiotrophoblast, specifically LDL receptor (*LDL-R*), LDL receptor-related protein 1 (*LRP-1*), and scavenger receptor class B type 1 (*SRB-1*) in third trimester placentae, have previously been shown (15). Placental expression of some of these receptors from FGR pregnancies with (FGR-S) and without (FGR-M) fetal hemodynamic changes, based on results of the Doppler velocimetry of umbilical artery and pulsatility index and from non-FGR control pregnancies have been reported. *LDL-R* mRNA levels in FGR-M were similar to controls but lower in FGR-S. In contrast, *LDL-R* protein was higher in both FGR cases than in the control group. *LRP-1* mRNA and protein levels were not altered in all FGR cases. *SRB-1* mRNA was unchanged in FGR, but protein levels were lower in FGR-S than in the other groups. The authors concluded that *LDL-R* and *SRB-1* levels are altered in FGR pregnancies and maternal plasma concentrations of LDL cholesterol are higher in the control group than in the FGR-S group (15). However, these have not previously been examined in relation to preeclampsia.

Based on the literature relating to placental and liver cholesterol transport pathways, we chose to analyze the maternal and fetal lipoprotein concentrations in combination with placental mRNA expression of *LRP-1*, *LDL-R*, *SRB-1*, ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*), paraoxonase-1 (*PON-1*), microsomal triglyceride transfer protein (*MTP*), and protein disulfide isomerase family A, member 2 (*PDI2*).

We therefore hypothesized that the expression of those lipoprotein receptors involved in the cholesterol pathway in the liver, are upregulated in preeclamptic placentae compared with controls as a compensatory factor. In addition, the expression of some of these receptors may be

reduced in preeclamptic placentae from women delivering small-for-gestational-age (SGA) infants versus appropriate-for-gestational-age (AGA) infants.

METHODS

Subjects and selection criteria

The study population consisted of two groups of white European women (27 normotensive, 24 with preeclampsia) (Table 1). Detailed demographics and outcome data have previously been published (16). The study was approved by the Hospital Ethics Committee of the Nottingham University Hospitals; written informed consent was obtained from each participant. Preeclampsia was stringently defined as stated in the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy guidelines (9). Medical and obstetric histories were obtained for each participant. The corrected birthweight percentile for each infant was computed, correcting for gestational age, gender, maternal parity, and BMI (17). SGA was defined as a centile below the 10th, and AGA as an individualized birthweight ratio between the 10th and 90th percentile (18). Table 2 provides demographic, obstetric, and pregnancy description data for the preeclamptic women delivering SGA and AGA infants.

Sample collection and measurements

Before delivery, venous blood samples were taken from mothers and immediately after placental delivery, where possible, umbilical cord venous blood was collected. Venous samples were allowed to clot prior to centrifugation at 1,400 *g* for 10 min at 4°C. Serum samples were stored at -80°C prior to analysis. The number of fetal serum samples missing was 1 in the control ($n = 26$) and 10 in the preeclamptic ($n = 14$) group. All women who took part in this study were laboring and either delivered vaginally or by emergency Caesarean section.

The lipoproteins (LDL, HDL, TC, and TG) were measured using MicroSlide technology on the Vitros Fusion 5.1 Chemistry System (New York, NY) following the manufacturer's instructions. Briefly, 200 μl of each sample were uniformly distributed over the entire slide area that contained all the reagents for the selected assays to allow larger molecules to be broken up and penetrate into the reagent layer. All samples were analyzed in triplicate, with the inter-assay variation being less than 5% and the intra-assay variation less than 10%.

Full depth placental tissue samples were collected within 10 min of the placental delivery from halfway between the cord insertion and the periphery of the placentae, avoiding infarcts. The samples were immediately rinsed in ice-cold phosphate buffered saline, and the membranes were removed and snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA analysis. A second sample was fixed in formalin for immunohistochemistry analysis. All samples were then stored at -80°C until analysis.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from a known amount of placental tissue (~ 100 mg) using QIAzolysis reagent (Qiagen, Crawley, UK). RNA concentration and the quality of each gene were verified spectrophotometrically using the Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Labtech, Ringmer, UK); all of the samples had an A_{260}/A_{280} ratio >1.96 and were stored at -80°C . RNA (1 μg) was then reverse transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription kit containing a mix of random primers and oligo-dT (Qiagen) in a Primus 96 advanced gradient thermocycler (Peqlab Ltd., Fareham, UK).

TABLE 1. Clinical and biochemical data of subject groups

Parameter	NC (n = 27)	PE (n = 24)
Maternal age, years (mean ± SD)	30 ± 6.9	31 ± 6.1
Booking BMI, kg/m ² (mean ± SD)	26.2 ± 5.4	26.6 ± 5.0
Maximum systolic blood pressure outside labor, mm Hg (mean ± SD)	116 ± 4.6	156 ± 7.1*
Maximum diastolic blood pressure outside labor, mm Hg (mean ± SD)	76.0 ± 3.0	98.0 ± 4.5*
Proteinuria, g/l (median [IQR])	—	1.0 [0.3, 11.5]
Gestational age at delivery, weeks (mean ± SD)	40 ± 1.1	36.7 ± 3.8*
Birth weight, kg (median [IQR])	3.5 [3.3, 3.7]	2.9 [2.0, 3.4]*
Birthweight centile (median [IQR])	45 [23, 62]	13 [1, 82]
SGA infants [n (%)]	1 (3.7)	7 (29.2)
Preterm deliveries, ≤37 weeks gestation [n (%)]	0	14 (58.3)

NC, normotensive controls; PE, preeclampsia; IQR, interquartile range. * $P < 0.05$ between normotensive controls and women with preeclampsia.

Quantitative real-time PCR

Real-time PCR was carried out with the use of SYBR Green chemistry (2× QuantiFast SYBR Green, Qiagen) on a RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) using the primers detailed in Table 3, following our previous protocol (19). Briefly, a pre-PCR cycle was run for 5 min at 95°C followed by 45 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 20 s. Melt-curve analysis was performed to confirm the presence of one single product and nontemplate controls run to assess contamination. Cycle threshold values were used for analysis, and abundance data were obtained by the use of quantified cDNA to generate a standard curve. Standards were quantified using densitometry and 10-fold serial dilutions (10^8 to 10^1 copies) run in parallel with the samples. Abundance data for the genes of interest were normalized to *GAPDH*, a stably expressed housekeeping gene suitable for human placental samples (20).

Immunohistochemical staining of LRP-1

LRP-1 protein expression for the 17 AGA and 7 SGA preeclamptic placentae from this cohort were analyzed by immunohistochemistry. Serial sections of placental tissue were cut (5 μm) in the same orientation from paraffin-embedded tissue blocks (Sledge Microtome, Anglia Scientific, Norwich, UK) and mounted onto SuperFrost Plus glass microscope slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Before use, sections were dewaxed by immersion in xylene followed by rehydration in descending concentrations of alcohol (3 min each).

Immunohistochemical staining was performed using the Dako Envision staining kits (Dako Ltd., Germany). LRP-1 rabbit polyclonal antibody (ARP58562_P050; Aviva Systems Biology, USA) was used for immunostaining of paraffin-embedded placental sections; the optimal dilution (1 in 500) was optimized. Heat-induced epitope retrieval was achieved by heating in a citrate buffer (pH 6.0) using a microwave oven for 15 min, followed by incubation for 30 min in normal rabbit serum (Sigma-Aldrich, UK) to block nonspecific binding; slides were then incubated with anti-LRP-1 overnight at 4°C. A negative control was performed for each test section by incubation with rabbit IgG. Sections were dehydrated and cleared in ascending concentrations

of alcohol and xylene before mounting in DPX (BDH, Poole, UK).

All of the slides were assessed by the same observer, blinded to pregnancy outcome. For analysis of placental sections, digital images of five randomly selected, high-power (×400 magnification) fields were captured on NIS-Elements F2.20 microscope (Nikon United Kingdom Ltd., Surrey, UK). Quantification of LRP-1 was performed as described previously (19, 21) using the Positive Pixel Algorithm of Aperio ImageScope software. This software is able to discriminate between positive- and negative-stained pixels and combines the number of positive pixels stained with the intensity of these same pixels to produce the value "positivity." A visual check was also performed to ensure accurate discrimination of immunolabeled regions.

Statistical analysis

All tests were performed using SPSS for Windows version 19. Summary data are presented as means ± standard deviation (SD) or median and interquartile range as appropriate, the Student's *t* test or Mann-Whitney U test were used depending on the distribution of the data, after testing using the Kolmogorov-Smirnov test. Correlations between the parameters were tested with a Spearman's rank test. The null hypothesis was rejected where $P < 0.05$.

RESULTS

Subjects

Demographic, obstetric, and pregnancy description data of the 51 participants are shown in Table 1; clinical descriptions have previously been published (16). All patients carried singleton pregnancies and the women with preeclampsia all had moderate-to-severe disease, without HELLP syndrome. The neonates from both pregnancy groups survived. The number of fetal serum samples that were missing was 1 in the control and 10 in the preeclamptic

TABLE 2. Clinical and biochemical data of the preeclamptic women delivering AGA and SGA infants

Parameter	PE AGA (n = 17)	PE SGA (n = 7)
Maternal age, years (mean ± SD)	32 ± 7.8	32 ± 2.9
Booking BMI, kg/m ² (mean ± SD)	27.2 ± 4.3	27.1 ± 6.8
Gestational age at delivery, weeks (mean ± SD)	38 ± 2.5	35 ± 5
Birth weight, kg (median [IQR])	3.2 [3, 3.5]	2 [1.6, 2.4]**
Birth weight centile (median [IQR])	47.1 [12.6, 69.4]	0.7 [0.3, 1.9]***

PE, preeclampsia; IQR, interquartile range. ** $P = 0.001$ and *** $P < 0.0001$ between PE AGA and PE SGA groups.

TABLE 3. Details the forward and reverse primer sequences and BLAST sequences

Gene	BLAST Sequence Accession Number	Primer	Length (bp)
LDL-R	NM_000527.3	5'-aggacggctacagctacc-3' 5'-ctccagcagatgttcacg-3'	73
LRP-1	NM_002332.2	5'-gggtcaccaccctcaacat-3' 5'-agtcggtcagctacagtttc-3'	88
SRB-1	NM_005505.4	5'-catcaagcagcaggtcctta-3' 5'-cggagagatagaaggggatagg-3'	95
PON-1	NM_000446.5	5'-actatagtcgaagtgagtg-3' 5'-atgagccagcactcagctat-3'	110
ABCA1	NM_005502.2	5'-tgctcatagcttgggactc-3' 5'-atcaccctctctgcatgt-3'	76
MTTP	NM_000253.2	5'-ggcgtgtctcaggtagc-3' 5'-gtctctccccctctc-3'	88
PDIA2	NM_006849.2	5'-ctccaagttcctggacaacg-3' 5'-tggacccatagtgaggatg-3'	104

groups. Within the preeclamptic group, 7 women delivered SGA infants and 17 delivered AGA infants (Table 2); only 1 woman in the normotensive control group delivered an SGA infant, and thus was excluded in this analysis.

Biochemical measurements

For all maternal and umbilical serum lipoproteins, there were no significant differences ($P > 0.05$) between normotensive and preeclamptic samples. However, umbilical venous samples had significantly lower lipid and lipoprotein concentrations compared with maternal concentrations in both groups; TG (normal and preeclampsia: $P < 0.0001$), TC (normal and preeclampsia: $P < 0.001$), LDL (normal: $P = 0.003$; preeclampsia: $P = 0.01$), and HDL (normal and preeclampsia: $P = 0.001$) (Fig. 1).

Placental lipoprotein receptors, transporters, and enzyme expression

The mRNA expression of *LDL-R*, *LRP-1*, *SRB-1*, *ABCA1*, *PON-1*, *MTTP*, and *PDIA2* in placental tissue from normotensive control and women with preeclampsia are shown in Table 4. *LDL-R*, *LRP-1*, *SRB-1*, and *ABCA1* were all found to be expressed in placenta tissue, but there was no expression of *PON-1*, *MTTP*, and *PDIA2*. The placental mRNA expression of the receptors did not significantly differ between groups ($P > 0.05$ for all).

Although the numbers were small, we additionally analyzed the 10 late-onset preeclampsia women (>34 weeks gestation) separately against the control group to test for any gestational-specific differences. The same nonsignificant results were seen for all the maternal and fetal

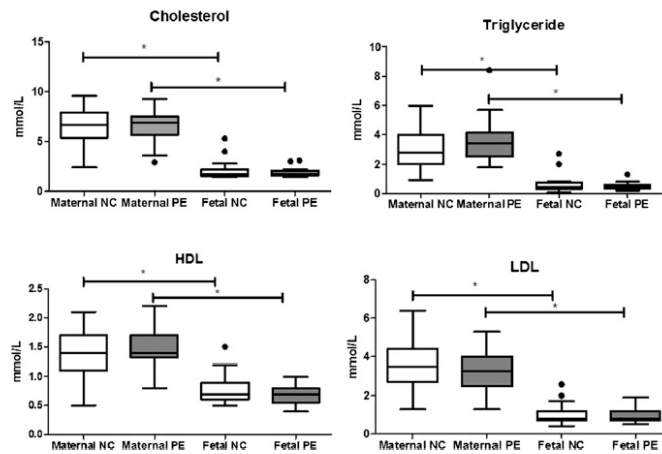


Fig. 1. Serum lipoprotein concentrations in maternal and fetal circulation, from normotensive controls and preeclampsia. The number of fetal serum samples that were missing were 1 in the control (n = 26) and 10 in the preeclamptic (n = 14). NC, normotensive control; PE, preeclampsia. Data presented as median [interquartile range]. * $P < 0.05$ between maternal and umbilical samples for all lipoproteins.

TABLE 4. Placental lipoprotein mRNA expression from normotensive controls and preeclampsia

Placenta Normalized mRNA Expression	NC (n = 27)	PE (n = 24)	P
LDL-R (median [IQR])	0.05 [0.03, 0.07]	0.06 [0.045, 0.11]	0.107
LRP-1 (median [IQR])	7.0 [5.04, 17.33]	12.3 [5.23, 23.89]	0.503
SRB-1 (median [IQR])	0.34 [0.21, 0.51]	0.32 [0.24, 0.56]	0.605
ABCA1 (median [IQR])	31.38 [20.8, 73.55]	28.8 [19.32, 82.81]	0.942

NC, normotensive control; PE, preeclampsia; IQR, interquartile range.

lipoprotein concentrations and for the placental expression of the receptors, transporters, and enzymes ($P > 0.1$ for all).

Placental lipoprotein receptor expression and SGA

In the preeclamptic group only, we found that those delivering SGA infants had significantly lower *LRP-1* expression compared with the AGA group (shown as median [IQR]) (SGA: 4.72 [3.6, 8.7]; AGA: 20.2 [13.5, 27.1]; $P = 0.036$). All the other genes did not show any differences ($P > 0.05$).

Protein expression of LRP-1 was localized mainly around fetal vessels and Hofbauer cells (Fig. 2). Visual inspection suggests lower protein expression in the preeclamptic placentae delivering SGA infants compared with the AGA group, although this was not significant when analyzed semi-quantitatively, possibly due to small sample size (median [IQR]: 0.91 [0.86, 0.95] vs. 0.87 [0.81, 0.89]; $P > 0.05$; Fig. 2).

Maternal serum, umbilical cord serum, and placental tissue

When maternal and umbilical cord serum lipoprotein concentrations were correlated with placental mRNA expression of the lipoprotein receptors, no difference between groups was found ($P > 0.05$). In addition, no associations between serum lipoproteins or receptors with birth

weights or gestational age at delivery were seen ($P > 0.05$ for both).

DISCUSSION

In the present study, we have analyzed the lipid profiles in women with preeclampsia and normotensive pregnant women. To the best of our knowledge, this is the first study that has concurrently investigated the placental, maternal, and fetal lipoprotein system comprehensively in normotensive and preeclamptic pregnancies, and associated these results with SGA infants in the third trimester of pregnancy.

Previous studies have reported that hyperlipidemia is enhanced in preeclampsia (22, 23) and has a negative impact on fetal lipid profiles (24, 25). It has been suggested that dyslipidemia may contribute to the increased oxidative stress and endothelial dysfunction, and possibly insulin resistance, which causes a compensatory increase in insulin concentration, decreased LPL activity, and increased TGs. However, factors that influence preeclampsia, such as chronic hypertension, obesity, and insulin resistance, share common features with dyslipidemia related to oxidative stress and altered vascular function. Our data showed no significant differences in maternal and fetal lipoprotein concentrations between preeclampsia and normotensive controls, which is in line with previous data on maternal levels (26). In addition, in the current study the mean BMI was 26 kg/m² in both groups (Table 1), suggesting that the abnormal lipid profile could be associated with obesity (27), and not necessarily with preeclampsia. This could also be a reason why some previous studies have reported increased lipoprotein concentrations in preeclampsia, because they may not have controlled for this. Thus, the results from this study do not suggest that changes in the lipoprotein concentrations play a direct key role in preeclampsia pathology.

All samples were collected at delivery and in the third trimester of pregnancy. Although not matched for gestation, lipoprotein concentrations are increased between the first two trimesters and last trimester, but are then stable (28); therefore these could be compared between groups even if the gestational age was not exactly the same. Furthermore, the same nonsignificant results were seen when only the term preeclamptic samples were compared with controls.

The highest mRNA expression was *ABCA1*, followed by *LRP-1*. A previous study also reported that *ABCA1* is highly expressed in human placenta (29). *LRP-1* is the direct lipoprotein receptor of intermediate density lipoprotein, a

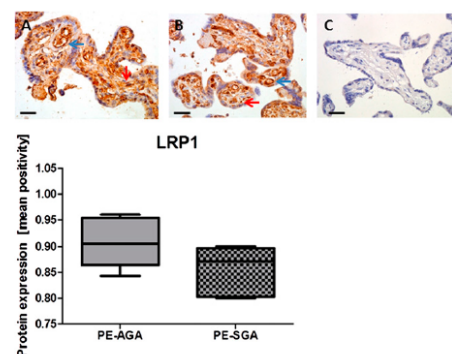


Fig. 2. LRP-1 immunostaining in preeclamptic (PE) placentae from AGA delivering mothers (n = 17) (A), SGA delivering mothers (n = 7) (B), and IgG negative control (C). In photomicrographs, positive cells appear in brown; magnification $\times 400$; scale bar = 100 μm . Protein expression was localized to Hofbauer cells (red arrows) and fetal vessels (blue arrows). In the graph, data is represented as median [interquartile range].

precursor of LDL (15). However *SRB-1* and *LDL-R*, the main cholesterol transporters (30), had very low expression in third trimester placental tissue, which may suggest that the function of *LDL-R* and *SRB-1* may not have an important role toward term, which may reflect a downregulation due to lipids derived from the fetus (2). A previous study at term concluded that *SRB-1* does not play a critical role in controlling plasma cholesterol concentration, even in pregnant women with high or low levels of cholesterol (30). Our findings are in agreement with others who have reported a marked *ABCA1* expression level in diverse placental cell types (31), and the presence of *LDL-R*, *LRP-1*, and *SRB-1* in placental tissues (15). However, in contrast to the current data, Wadsack et al. showed lower mRNA expression of *LDL-R* in FGR-S, and Stepan et al. (32) reported higher. Different criteria in selecting the study population may account for these differences (32); contrasting protein values have also been observed in several studies. In our study, we examined LRP-1 protein localization and expression due to the differences seen in the preeclamptic plus SGA group. These data suggest lower expression in the SGA group, although this didn't reach significance, possibly due to small numbers. LRP-1 is highly expressed in macrophages, and therefore it is unsurprising that the expression is localized to the macrophages of the placenta (Hofbauer cells).

It must be noted that cholesterol is not only transported by the receptors; experimental evidence suggests that trophoblast cells efflux cholesterol from cells like any other polarized cells (33). Three different mechanisms for cholesterol transportation from the circulation and peripheral cells to target tissues have been proposed: 1) aqueous diffusion, a protein-independent pathway based on concentration gradients; 2) the *SRB-1* mediated bidirectional transport between cells and extracellular acceptors; and 3) *ABCA1*-mediated unidirectional efflux to lipid-free apolipoproteins (34, 35). The physiological consequences of the regulation of receptors for placental function and fetal development are unclear. A yet undefined proportion of cholesterol uptake by the placenta may be released into the fetal circulation. The remaining placental cholesterol, however, is used for sterol synthesis, principally of progesterone.

When we analyzed the relationship between placental genes and SGA, we observed that *LRP-1* was significantly lower in placenta from SGA infants in the preeclamptic group. A possible mechanism for this could be through the matrix metalloproteinase (MMP) family. Membrane-type MMPs can degrade LRP-1 into low molecular-mass fragments. Intact soluble LRP-1 α -chain is shed into human plasma and has been identified at the blood-brain barrier following ischemia. Proteins of the MMP family are involved in the breakdown of the extracellular matrix in normal physiological processes, such as embryonic development, reproduction, and tissue remodeling, as well as in disease processes, such as arthritis and metastasis (36). Increased MMP-2 activity (LRP-1 mediates its internalization) may contribute to the endothelial dysfunction that is central to the pathophysiology of preeclampsia and/or SGA.

Further analysis is necessary to understand the cholesterol pathway, especially in relation to fetal growth, in particular alterations in FGR pregnancies and gestational diabetes mellitus, which can result in extremely high birth weight infants (1). It would also be interesting to study the expression of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) gene, as it regulates cholesterol metabolism via degradation of *LDL-R* (37).

This is a preliminary study that contributes to the current knowledge with the need for future research. It would also be desirable to examine changes at both mRNA and protein levels of all the lipoprotein receptors, transporters, and enzymes. Another limitation of the current study is that we did not have details of exposure to antenatal steroids and other medications, surgery, or timing of the last meal, which may influence some of these alterations. Much has to be done to elucidate the placental transport in pregnancy pathologies, as the transport mechanism for lipids and lipoproteins is far from being understood.

The findings of this study do not support a direct contribution of lipid metabolism in the pathogenesis of preeclampsia. However, this is the first study that simultaneously analyzed seven lipoprotein receptors, transporters, and enzymes related to the cholesterol pathway, with the lipids and lipoprotein levels (LDL, HDL, TC, and TG) in maternal and umbilical cord serum, and in relation to fetal growth. ■

The authors thank all the women who participated in the study and the midwives and doctors whose support made this study possible. The authors are also grateful to Professor Fiona Broughton Pipkin (University of Nottingham) for help and advice regarding statistical analysis.

REFERENCES

- Desoye, G., M. Gauster, and C. Wadsack. 2011. Placental transport in pregnancy pathologies. *Am. J. Clin. Nutr.* 94(6 Suppl.): 1896S–1902S.
- Ghio, A., A. Bertolotto, V. Resi, L. Volpe, and G. Di Cianni. 2011. Triglyceride metabolism in pregnancy. *Adv. Clin. Chem.* 55: 133–153.
- Vrijkotte, T. G., N. Krukiener, B. A. Hutten, K. C. Vollebregt, M. van Eijsden, and M. B. Twickler. 2012. Maternal lipid profile during early pregnancy and pregnancy complications and outcomes: the ABCD study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97: 3917–3925.
- Carr, B. R., and E. R. Simpson. 1982. Cholesterol synthesis in human fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55: 447–452.
- Pecks, U., M. Brieger, B. Schiessl, D. O. Bauerschlag, D. Piroth, B. Bruno, C. Fitzner, T. Orlikowsky, N. Maass, and W. Rath. 2012. Maternal and fetal cord blood lipids in intrauterine growth restriction. *J. Perinat. Med.* 40: 287–296.
- Alvarez, J. J., A. Montelongo, A. Iglesias, M. A. Lasuncion, and E. Herrera. 1996. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J. Lipid Res.* 37: 299–308.
- Ghulmiyyah, L., and B. Sibai. 2012. Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia. *Semin. Perinatol.* 36: 56–59.
- Duley, L. 2009. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin. Perinatol.* 33: 130–137.
- Brown, M. A., M. D. Lindheimer, M. de Swiet, A. Van Assche, and J. M. Moutquin. 2001. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypertens. Pregnancy.* 20: IX–XIV.

10. 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.
11. Lim, K. H., Y. Zhou, M. Janatpour, M. McMaster, K. Bass, S. H. Chun, and S. J. Fisher. 1997. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am. J. Pathol.* 151: 1809–1818.
12. Huppertz, B., and L. L. Peeters. 2005. Vascular biology in implantation and placentation. *Angiogenesis* 8: 157–167.
13. Campos, B., M. Chames, J. M. Lanry, J. P. Bill, A. Eis, D. Brockman, J. Neil, E. Tischner, J. Barton, C. Wong, et al. 2006. Determination of non-bilayer phospholipid arrangements and their antibodies in placenta and sera of patients with hypertensive disorders of pregnancy. *Placenta* 27: 215–224.
14. Hubel, C. A. 1999. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 222–235.
15. Wadsack, C., S. Tabano, A. Maier, U. Hiden, G. Alvino, V. Cozzi, M. Hüttinger, W. J. Schneider, U. Lang, I. Cetin, et al. 2007. Intrauterine growth restriction is associated with alterations in placental lipoprotein receptors and maternal lipoprotein composition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292: E476–E484.
16. Mistry, H. D., V. Wilson, M. M. Ramsay, M. E. Symonds, and F. Broughton Pipkin. 2008. Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. *Hypertension* 52: 881–888.
17. Gardosi, J. 2012. Customised centile calculator. Accessed March 26, 2012, at www.gestation.net.
18. Cetin, I., J. M. Foidart, M. Miozzo, T. Raun, T. Jansson, V. Tsatsaris, W. Reik, S. Hauguel-de-Mouzon, N. Illsley, J. Kingdom, et al. 2004. Fetal growth restriction: a workshop report. *Placenta* 25: 753–757.
19. Mistry, H. D., L. A. McCallum, L. O. Kurlak, I. A. Greenwood, F. Broughton Pipkin, and R. M. Tribe. 2011. Novel expression and regulation of voltage-dependent potassium channels in placentas from women with preeclampsia. *Hypertension* 58: 497–504.
20. Murthi, P., E. Fitzpatrick, A. J. Borg, S. Donath, S. P. Brennecke, and B. Kalionis. 2008. GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction. *Placenta* 29: 798–801.
21. Williams, P. J., H. D. Mistry, B. A. Innes, J. N. Bulmer, and F. Broughton Pipkin. 2010. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. *Placenta* 31: 448–455.
22. Ray, J. G., P. Diamond, G. Singh, and C. M. Bell. 2006. Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. *BJOG* 113: 379–386.
23. Lorentzen, B., M. J. Endresen, T. Clausen, and T. Hendriksen. 1994. Fasting serum free fatty acids and triglycerides are increased before 20 weeks of gestation in women who later develop preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* 13: 103–109.
24. Belo, L., M. Caslake, D. Gaffney, A. Santos-Silva, L. Pereira-Leite, A. Quintanilha, and I. Rebelo. 2002. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis* 162: 425–432.
25. Catarino, C., I. Rebelo, L. Belo, P. Rocha-Pereira, S. Rocha, E. B. Castro, B. Patrício, A. Quintanilha, and A. Santos-Silva. 2008. Fetal lipoprotein changes in pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 87: 628–634.
26. Emet, T., I. Ustüner, S. G. Güven, G. Balık, U. M. Ural, Y. B. Tekin, S. Sentürk, F. K. Sahin, and A. F. Avar. 2013. Plasma lipids and lipoproteins during pregnancy and related pregnancy outcomes. *Arch. Gynecol. Obstet.* 288: 49–55.
27. Catapano, A. L., Z. Reiner, G. De Backer, I. Graham, M. R. Taskinen, O. Wiklund, S. Agewall, E. Alegria, M. Chapman, P. Durrington, et al. 2011. ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias the task force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 217: 3–46.
28. Herrera, E., H. Ortega, G. Alvino, N. Giovannini, E. Amusquivar, and I. Cetin. 2004. Relationship between plasma fatty acid profile and antioxidant vitamins during normal pregnancy. *Eur. J. Clin. Nutr.* 58: 1231–1238.
29. Bhattacharjee, J., F. Ietta, E. Giacomello, N. Bechi, R. Romagnoli, A. Fava, and L. Paulesu. 2010. Expression and localization of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in first trimester and term human placenta. *Placenta* 31: 423–430.
30. Ethier-Chiasson, M., A. Duchesne, J. C. Forest, Y. Giguere, A. Masse, C. Mounier, and J. Lafond. 2007. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359: 8–14.
31. Nikiitina, L., F. Wenger, M. Baumann, D. Surbek, M. Korner, and C. Albrecht. 2011. Expression and localization pattern of ABCA1 in diverse human placental primary cells and tissues. *Placenta* 32: 420–430.
32. Stepan, H., R. Faber, and T. Walther. 1999. Expression of low density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid in placentas from pregnancies with intrauterine growth retardation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 106: 1221–1222.
33. Woollett, L. A. 2005. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 82: 1155–1161.
34. Rothblat, G. H., M. de la Llera-Moya, V. Atger, G. Kellner-Weibel, D. L. Williams, and M. C. Phillips. 1999. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J. Lipid Res.* 40: 781–796.
35. Yancey, P. G., A. E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat. 2003. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 712–719.
36. Selvais, C., L. D'Auria, D. Tyteca, G. Perrot, P. Lemoine, L. Troeberg, S. Dedieu, A. Noël, H. Nagase, P. Henriot, et al. 2011. Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB J.* 25: 2770–2781.
37. Levy, E., A. Ben Djoudi Ouadda, S. Spahis, A. T. Sane, C. Garofalo, É. Grenier, L. Emonnot, S. Yara, P. Couture, J. F. Beaulieu, et al. 2013. PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis* 227: 297–306.

ARTIGO 3 – Artigo publicado em formato Resumo¹⁶, sob o título: O Acompanhamento clínico puerperal de gestantes com diagnóstico de Doença Hipertensiva Gestacional: Uma questão de saúde pública. Autores: **Marta Ribeiro Hentschke**, Vicente Bohrer Brentano, Samantha Schneider, Fernanda Borsatto Caruso, Bartira E. Pinheiro da Costa, Carlos E. Polide-Figueiredo, Giovani Gadonski. Dados da publicação: Anais do VI Simpósio Internacional de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da PUCRS. Temas livres em Obstetrícia. p. 23.

INTRODUÇÃO: A Doença Hipertensiva Gestacional (DHG) é umas das principais causas de morbimortalidade materna e fetal no mundo. A DHG é subdividida em quatro classes: Hipertensão gestacional (HG); Hipertensão crônica (HC); Pré-eclâmpsia (PE) e Pré-eclâmpsia sobreposta (PES), sendo esta classificação confirmada após a 12ª semana de puerpério. Até o presente momento, não há diretrizes governamentais que padronizam o atendimento dessas puérperas. A falta de acompanhamento clínico compromete o diagnóstico de importantes distúrbios e patologias as quais, se previamente diagnosticadas, diminuiriam desfechos negativos em próxima gestação e ao longo da vida. **OBJETIVO:** Relatar a importância do acompanhamento ambulatorial padronizado, através da apresentação dos diagnósticos finais da DHG; Hipertensão secundária e Distúrbios metabólicos relacionados a DHG, em puérperas que desenvolveram DHG. **MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo de coorte realizado através de acompanhamento puerperal de pacientes que desenvolveram DHG, atendidas no setor de obstetrícia do Hospital São Lucas/PUCRS, entre agosto de 2003 a dezembro de 2010. A amostra foi composta 249 pacientes, totalizando 1167 consultas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e pesquisa da PUCRS e todas as pacientes consentiram em participar do estudo. Durante as consultas, foi aplicado um questionário padrão, sendo os dados armazenados em banco de dados para posterior análise. Após três meses de puerpério, definiu-se o diagnóstico final da DHG. Para o diagnóstico de patologias associadas à hipertensão secundária foram realizados: ECG de repouso, Cintilografia renal com DMSA, Raio-x de tórax e exames laboratoriais, de acordo com a investigação clínica de cada paciente. **RESULTADOS:** Das 249 pacientes analisadas, 71% tiveram alta ou abandonaram o atendimento, Das 72 pacientes ativas, 38,8% foram classificadas como HC e 19,4% como PES. Assim, 58,2% das pacientes necessitaram de acompanhamento clínico para tratamento de HAS. Ainda, das 249 pacientes do estudo, 30 (12,04%) apresentaram patologias associadas à hipertensão secundária, sendo as mais prevalentes: refluxo vesíco-ureteral (23,3%), síndrome dos ovários policísticos (13,3%) e Diabete Mellitus gestacional (13,3%). Das 232 que possuíam dados de IMC, 28% apresentavam sobrepeso, 18,5% obesidade grau I, 16,8% grau II e 13,79% grau III. Das 119 pacientes que apresentavam dados de perfil lipídico, 77,31% possuíam algum grau de dislipidemia. **CONCLUSÃO:** O acompanhamento clínico puerperal especializado é de extrema importância para pacientes que desenvolveram DHG. Dessa forma, é possível diagnosticar casos de HAS secundária, os quais, em grande parte, possuem caráter reversível com tratamento específico. Ainda, é possível realizar controle metabólico dessas pacientes e evitar desfechos desfavoráveis a curto e longo prazo.

¹⁶ Trabalho realizado a partir do acompanhamento clínico de puérperas que desenvolveram a Doença Hipertensiva Gestacional. O Protocolo de consulta do ambulatório de hipertensão encontra-se no Apêndice H.

ARTIGO 4 – Artigo Original publicado sob o título: Aumento dos níveis do receptor solúvel da Interleucina-6 em pacientes com pré-eclâmpsia em relação a gestantes normotensas. Autores: **Marta Ribeiro Hentschke**, Luiza Silveira Lucas, Bruna Krauspenhar, Raísa Perdomo Felix, Alex Oliboni Sussela, Francine Berlesi, Carlos E. Poli-de-Figueiredo e Bartira E. Pinheiro da Costa. Dados da Publicação: Scientia Medica, 2013, v.23, n.4, p. 213-218.

Artigo Original/Original Article

Aumento dos níveis do receptor solúvel da Interleucina-6 em pacientes com pré-eclâmpsia em relação a gestantes normotensas

Increased levels of the soluble receptor of interleukin-6 in patients with preeclampsia compared to normotensive pregnant women

Marta Ribeiro Hentschke¹, Luiza Silveira Lucas², Bruna Krauspenhar³, Raísa Perdomo Felix², Alex Oliboni Sussela², Francine Berlesi², Carlos E. Poli-de-Figueiredo⁴, Bartira E. Pinheiro da Costa⁵

¹ Médica, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PPGMCS-PUCRS), Porto Alegre, RS.

² Acadêmicos da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (FAMED-PUCRS), Porto Alegre, RS.

³ Farmacêutica, mestranda do PPGMCS-PUCRS, Porto Alegre, RS.

⁴ Médico Nefrologista. Doutor pela University of Oxford, Inglaterra. Professor Titular do Departamento de Medicina Interna da FAMED-PUCRS e do PPGMCS-PUCRS. Chefe do Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas da PUCRS, Porto Alegre, RS.

⁵ Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professora Adjunta do Departamento de Medicina Interna da FAMED-PUCRS e do PPGMCS-PUCRS. Coordenadora da Comissão Científica da FAMED-PUCRS, Porto Alegre, RS.

Estudo realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Objetivos: Comparar níveis plasmáticos do receptor solúvel da interleucina-6 (IL-6sR) entre gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia.

Métodos: Realizou-se coleta de sangue materno no período pré-parto de 21 pacientes com pré-eclâmpsia e 39 controles normotensas. As amostras foram armazenadas a menos 80°C até a análise laboratorial. Os níveis séricos de IL-6sR foram mensurados através do teste imunoenzimático ELISA. Para comparar os grupos foi utilizado teste t de Student. Consideraram-se significantes os resultados com P menor do que 0,05.

Resultados: Os dados de gestantes com pré-eclâmpsia e gestantes normotensas, respectivamente, foram: idade materna 22,3±4,8 vs 26,0±3,7 anos (P=0,06); idade gestacional 32,7±5,8 vs 40,1±0,8 semanas (P=0,01); pressão arterial sistólica 143,0±2,2 vs 118,8±3,1 mmHg (P=0,01); pressão arterial diastólica 112,5±4,0 vs 77,2±10,2 mmHg (P=0,01); ácido úrico 5,87±1,10 vs 4,57±0,12 mg/dL (P=0,02); creatinina 0,82±0,12 vs 0,73±0,09 mg/dL (P=0,01); peso do recém-nascido 2.130,7±839,3 vs 3.555,0±261,0 gramas (P=0,01) e peso da placenta 621,3±167,0 vs 796,3±154,2 gramas (P=0,05). A relação proteinúria/creatininúria no grupo das pacientes com pré-eclâmpsia foi de 2,40±1,31. O valor de IL-6sR (ng/dL) na pré-eclâmpsia foi 28,7±10,8 vs 16,5±6,4 na gestante normotensa (P=0,01).

Conclusões: Estes resultados mostram o aumento dos níveis plasmáticos do IL-6sR em pacientes com pré-eclâmpsia, em relação a gestantes normotensas. Mais estudos se mostram necessários para o esclarecimento da fisiopatologia desta entidade, como a análise de outras citocinas ligadas a esse receptor, visto que elas podem ser a chave para a resposta inflamatória sistêmica que ocorre nestas pacientes e, portanto, para o seu tratamento.

DESCRIPTORES: PRÉ-ECLÂMPZIA; RECEPTORES DE INTERLEUCINA-6; INFLAMAÇÃO

ABSTRACT

Aims: To compare Interleukin-6 soluble receptor (IL-6sR) plasmatic levels between normotensive pregnant controls and preeclamptic women.

Methods: Maternal blood samples were collected before delivery from 21 patients with preeclampsia and 39 normotensive pregnant controls. Samples were stored at -80°C until laboratory assay. IL-6sR was measured by ELISA enzyme immunoassay. To compare groups Student's t test was used. Results with P less than 0.05 were considered significant.

Results: Data from preeclampsia and normotensive pregnant controls were respectively: maternal age 22.3±4.8 vs 26.0±3.7 years (P=0.06); gestational age 32.7±5.8 vs 40.1±0.8 weeks (P=0.01); systolic blood pressure 143.0±2.2 vs 118.8±3.1 mmHg (P=0.01); diastolic blood pressure 112.5±4.0 vs 77.2±10.2 mmHg (P=0.01); uric acid 5.87±1.10 vs 4.57±0.12 mg/dL (P=0.02); creatinine 0.82±0.12 vs 0.73±0.09 mg/dL (P=0.01); birth weight 2130.7±839.3 vs 3555.0±261.0 g (P=0.01); placental weight 621.3±167.0 vs 796.3±154.2 g (P=0.05). Proteinuria over creatininuria ratio in the preeclampsia group was 2.40±1.31. The concentration of IL-6sR (ng/dL) was 28.7±10.8 in preeclampsia vs 16.5±6.4 in normotensive pregnant controls (P=0.01).

Conclusions: These results show an increased plasma levels of IL-6sR in patients with preeclampsia compared to normotensive pregnant women. More studies are necessary to clarify the pathophysiology of this entity, including the analysis of other cytokines linked to this receptor, due to the fact that they can be the key for the systemic inflammatory response that occurs in these patients and therefore for their treatment.

KEY WORDS: PREECLAMPSIA; RECEPTORS; INTERLEUKIN-6; INFLAMMATION.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

MARTA RIBEIRO HENTSCHE
Instituto de Pesquisas Biomédicas – Hospital São Lucas da PUCRS – 2º andar
Av. Ipiranga, 6690
90610-000 Porto Alegre, RS, Brasil
Fax/Phone: +55-51-3320-3000 Ramal 2344
E-mail: martarh@yahoo.com.br

Recebido em agosto de 2013; aceito em novembro de 2013.

Os conteúdos deste periódico de acesso aberto estão licenciados sob os termos da Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial-ObrasDerivadas Proibidas 3.0 Unported.

Scientia Medica (Porto Alegre) 2013; volume 23, número 4, p. 213-218

INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez humana que ocorre após a vigésima semana de gestação e é caracterizada por hipertensão (níveis tensionais acima de 139 mmHg de pressão sistólica e 89 mmHg de pressão diastólica) e proteinúria patológica (≥ 300 mg/24h), em mulheres previamente normotensas.¹ Essa patologia é uma das principais causas de morte materna, sendo responsável por cerca de 3% a 8% da morbidade e mortalidade de gestantes em todo o mundo.^{2,3} Além disso, a PE aumenta a chance de parto prematuro, podendo, dessa forma, causar complicações perinatais.^{4,5,6}

A etiologia da PE ainda não está bem estabelecida, entretanto muitos estudos têm apontado a placenta como a principal responsável pelas manifestações dessa condição, já que o parto é a única cura para a PE.⁷ Em contraste com uma gestação normal, na PE ocorre uma hipoperfusão uteroplacentária, podendo levar a hipóxia tecidual e isquemia placentária. Nesse processo, há liberação de diversos mediadores inflamatórios, além de marcantes alterações hemodinâmicas, responsáveis por um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores, levando a um aumento da resistência vascular periférica e da pressão arterial sistêmica das gestantes.^{8,9} Um dos principais mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo é a Interleucina (IL)-6, um mediador sintetizado por fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos em resposta a estímulos inflamatórios. IL-6 tem sido descrita alterada em mulheres com PE.^{10,11} Estudos experimentais também apresentaram alterações nessa citocina.¹²

Diferentes receptores são necessários para que a IL-6 realize sinalizações intracelulares: o receptor de IL-6 (IL-6R), expresso na membrana plasmática de células específicas, como hepatócitos e alguns leucócitos;¹³ uma forma solúvel desse receptor da IL-6, (IL-6sR), presente em fluidos corporais; e a proteína transmembrana transdutora de sinal, o gp130. IL-6sR forma um complexo solúvel com a citocina IL-6 (IL-6sR/IL-6) que se liga diretamente ao gp130 da membrana plasmática em células em que não há expressão do receptor de superfície IL-6R, em um processo conhecido como trans-sinalização. Esse processo permite que células inicialmente irresponsivas à IL-6 (pela falta do IL-6R ligado à membrana) respondam ao complexo que está presente em respostas inflamatórias.¹⁴ Está demonstrado também que o IL-6sR pode atuar como transportador da IL-6, aumentando a meia-vida dessa citocina, o que levaria o IL-6sR a aumentar a sinalização da IL-6, funcionando como um agonista da mesma.¹⁵

Visto que a PE está associada a uma exacerbação da resposta inflamatória, nossa hipótese é de que, assim como ocorre um aumento de mediadores inflamatórios como IL-6, a elevação dos níveis circulantes do seu receptor solúvel IL-6sR também deverá ocorrer. Desse modo, o objetivo deste trabalho é comparar os níveis plasmáticos de IL-6sR entre gestantes com PE e normotensas.

MÉTODOS

Foi conduzido um estudo transversal em gestantes que receberam atendimento obstétrico no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-671/11) e todas as gestantes consentiram em participar.

Foram analisadas coletas de 60 gestantes, sendo 21 com PE e 39 normotensas. A PE foi diagnosticada de acordo com as recomendações do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* e das VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão.^{1,16} Pacientes com histórico de diabetes mellitus, doenças renais, hepáticas e infecciosas, polidrâmnio, gestação múltipla, ruptura prematura de membranas e normotensas com 1+ ou mais de proteína no exame qualitativo de urina, foram excluídas. Proteinúria foi quantificada apenas em gestantes com PE.

No período pré-parto foram coletados 4 ml de sangue materno em tubo Vacutainer® (Becton Dickinson & Company, New Jersey, Estados Unidos) contendo ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA). A amostra foi centrifugada a 1,000g por 10 minutos, e o plasma armazenado a -80°C até posterior análise laboratorial.

Parâmetros maternos e fetais, como idade materna, idade gestacional obstétrica, tipo de parto, raça, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), peso materno, glicemia de jejum, índice de massa corpórea (IMC) ajustada à idade gestacional,¹⁷ peso do recém-nascido, peso da placenta, percentil de peso fetal e índice de Apgar no 1º e no 5º minuto, foram comparados entre as pacientes com PE e normotensas.

A concentração de IL-6sR no plasma materno foi mensurada através do teste imunoenzimático de ELISA (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN-USA), em duplicata. O ensaio foi validado para dosagem de plasma, alcançando um fator de diluição de 1:128 em reagente diluente. O coeficiente de variação intra e interensaio foi de 5-10%, e 12%, respectivamente.

O protocolo para avaliação da concentração de IL-6sR foi realizado conforme orientações do fabri-

cante. Brevemente, placas de ELISA foram sensibilizadas com antígeno IL-6sR; as lavagens foram realizadas com Tween® 20 0,05%; o bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com albumina sérica bovina; a reação com o anticorpo de detecção foi seguida de estreptavidina. Para mensurar a intensidade de variação da absorbância foi utilizado espectrofotômetro (URIT-660 Microplate Reader, China) em comprimento de onda 450 nm. Tendo em vista o fator de diluição, a concentração final de IL-6sR foi ajustada por cálculo.

A análise foi realizada através do programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 17.0 (SPSS, 17.0) para Windows. As variáveis contínuas foram descritas por medidas de tendência central e dispersão (média e desvio-padrão). Nas comparações entre dois grupos foi empregado o teste *t* de Student. As variáveis categóricas foram expressas em porcentagem e comparadas usando o teste Qui-quadrado. O nível de significância considerado foi de 0,05.

RESULTADOS

Os dados clínicos e bioquímicos das pacientes e de seus neonatos estão apresentados na **Tabela 1**. Mulheres com PE apresentaram relação proteinúria/creatinúria de $2,40 \pm 1,31$ (média±desvio padrão) e as pressões arterial sistólica e diastólica aumentadas

Tabela 1. Perfil demográfico e bioquímico das 60 gestantes incluídas no estudo e dados de seus neonatos.

	Pré-eclâmpsia (n=21)	Normotensas (n=39)	P
Idade média, anos	22,3±4,8	26,0±3,7	0,06
PAS, mmHg	143,0± 2,2	118,8±3,1	0,01
PAD, mmHg	112,5±4,0	77,2±10,2	0,01
Ácido úrico, mg/dL	5,87±1,10	4,57±0,12	0,02
Creatinina, mg/dL	0,82±0,12	0,73±0,09	0,01
Idade gestacional, sem	32,7±5,8	40,1±0,8	0,01
Peso do recém-nascido, g	2.130,7±839,3	3.555,0±261,0	0,01
Peso da placenta, g	621,3±167,0	796,3±154,2	0,05
Índice de Apgar, 1º minuto	7,6 ± 2,0	7,6 ± 2,4	0,89
Índice de Apgar, 5º minuto	9,1 ± 0,9	9,2 ± 1,0	0,59
Percentil de peso fetal, %			0,04
AIG	66,7	73,3	
GIG	13,3	26,7	
PIG	20	0	

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; n: número de casos. AIG: adequado para a idade gestacional; GIG: grande para a idade gestacional; PIG: pequeno para a idade gestacional. Os valores foram apresentados em média±desvio padrão; teste *t* de Student. Os valores de percentil de peso fetal estão expressos em porcentagem; teste Qui-quadrado.

($P < 0,05$). Da mesma forma, os níveis de ácido úrico e creatinina foram significativamente maiores nas pacientes com PE em relação às gestantes normotensas ($P < 0,05$). A idade gestacional e o peso do recém-nascido foram menores em pacientes do grupo PE ($P < 0,05$). Observou-se uma maior proporção de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional em pacientes com PE, e uma maior proporção de grandes para a idade gestacional em gestantes normotensas ($P < 0,05$). Tanto a idade materna quanto o peso da placenta foram equivalentes nos grupos estudados.

Os valores de IL-6sR (ng/dL) no grupo PE foram mais elevados do que nas gestantes normotensas, com resultados de $28,7 \pm 10,8$ na PE vs $16,5 \pm 6,4$ (média±desvio padrão, $P = 0,01$), como demonstrado na **Figura 1**.

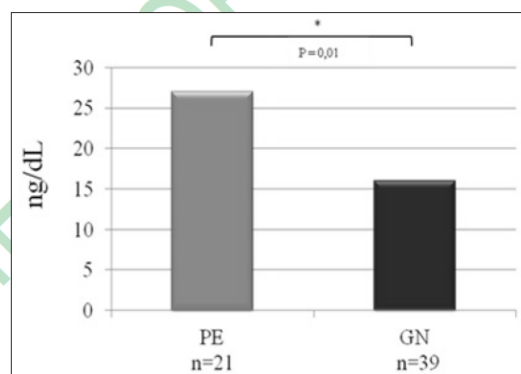


Figura 1. Médias dos níveis de receptor solúvel da interleucina-6 (IL-6sR) nas gestantes com pré-eclâmpsia (PE) ($28,7 \pm 10,8$) e normotensas (GN) ($16,5 \pm 6,4$).

DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta a elevação dos níveis plasmáticos de IL-6sR – o qual forma um complexo ligante-receptor com IL-6, estimulando a proliferação, diferenciação e processos inflamatórios – em amostra de pacientes com PE comparadas às normotensas, no terceiro trimestre gestacional.

Os resultados clínicos obtidos no presente estudo estão de acordo com os esperados nessa patologia. O baixo peso ao nascer dos neonatos de gestantes com PE em relação ao de gestantes normotensas pode ser parcialmente explicado pela tendência à interrupção precoce da gestação observada nessa patologia. Este fato é comprovado pela diferença de idade gestacional no momento do parto entre os dois grupos. A precocidade do parto também pode ocorrer devido a

disfunção placentária que ocorre na PE, acarretando um importante papel no baixo peso dos recém-nascidos, assim como no peso da placenta.^{18,19}

Valores de pressão arterial sistólica e diastólica aumentados em pacientes com PE corroboram com o diagnóstico desse distúrbio, o mesmo valendo para níveis de proteinúria, ácido úrico e creatinina, sendo estes achados esperados e, portanto, de acordo com a literatura.¹

As citocinas estão envolvidas na fisiologia de uma gestação normal, desde a implantação do conceito no útero, até o final do período gravídico, passando por todas as adaptações do desenvolvimento fetal na vida intrauterina.²⁰ O sistema imune adaptativo envolve ações de células T, B e células *Natural Killer*. As células T podem ser divididas em T helper (Th) ou T auxiliar (Ta) expressando CD4+, e T citotóxicas expressando CD8+. As células T CD4+ podem ser subdivididas em duas populações efetoras distintas: Th1 e Th2, as quais produzem respectivamente INF- γ , IL-2, TNF- β e TNF- α essenciais para o estabelecimento de respostas imunes celulares, e IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que são importantes na formação de anticorpos, reações imunes mediadas por eosinófilos e mastócitos.^{21,22,23} Na gestação normal há supressão de Th1 em relação a Th2 para o desenvolvimento fetal, já na PE há um desbalanço nessa relação, não havendo supressão adequada em Th1.²¹

Níveis circulantes de Fator de Necrose Tumoral (TNF)-alfa e IL-6, normalmente aumentados em gestações normais, apresentam-se ainda mais elevados em pacientes com PE.²⁰ Da mesma forma, várias outras citocinas e moduladores, como IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-1R, receptor solúvel de IL-4 e receptor solúvel de TNF, podem ser vistos em grande quantidade nessa síndrome. Os relatos do aumento de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com PE sugere uma exacerbação da resposta pró-inflamatória nessas gestantes.^{1,24,25}

A IL-6 mostrou estar associada à exacerbação inflamatória observada nesse distúrbio hipertensivo gestacional.^{12,24,26,27} No entanto, parece existir ainda uma dúvida em relação ao seu papel na PE, visto que em um trabalho analisando soro materno e fetal e o tecido placentário de gestantes com PE e normotensas, esta associação não foi encontrada.²⁸

O complexo IL-6R, IL-6sR, gp130 é necessário à recepção da mensagem de IL-6, entretanto 70% da IL-6 que circula no sangue está ligada somente ao seu receptor solúvel. Esse complexo IL-6Rs/IL-6 liga-se diretamente ao gp130 da membrana plasmática realizando a trans-sinalização que, a partir de sua dimerização, inicia a sinalização intercelular

pela via JAK/STAT.^{14,29} Os outros 30% da IL-6 ligam-se diretamente ao receptor de membrana IL-6R.³⁰ Acredita-se que a gp130 está expressa em todas as células do corpo, enquanto o IL-6R é expresso principalmente em hepatócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos e alguns linfócitos. Além das moléculas citadas, a expressão do supressor de sinalização de citocina (SOCS) também tem um papel importante na via da IL-6. As SOCS são proteínas induzidas pela via JAK/STAT e inibem a transdução do sinal de STAT, funcionando, portanto como inibidoras por *feedback*. Sabe-se que a SOCS3 pode inibir potencialmente a sinalização da citocina IL-6.³¹

Além da IL-6sR, a gp130 também tem sua forma solúvel, conhecida como sgp130. A sgp130 pode se ligar ao complexo solúvel IL-6sR/IL-6 impedindo que este se vincule ao gp130 da membrana plasmática da célula-alvo, funcionando assim como um antagonista do efeito da IL-6.³² Essas moléculas estão descritas como alteradas na placenta de mulheres com PE.³³ Através de investigações *in vitro*, constatou-se que o IL-6sR contribui para a ativação de uma variedade de processos celulares. No entanto, a compreensão da importância funcional deste receptor *in vivo* ainda é incipiente.^{34,35} Diversas condições, como câncer de próstata e mama, artrite reumatoide, peritonite e esclerose múltipla apresentaram fisiopatologias relacionadas ao IL-6sR até o momento, o qual, associado à IL-6, sugere um importante papel na regulação do sistema imune.^{34,36,37,38,39} Isso parece ocorrer devido à sua propriedade solúvel, podendo circular em diversas células do corpo, diferentemente do IL-6R, que é expresso exclusivamente na membrana plasmática de algumas células.⁴⁰ No entanto, devido à natureza pleiotrópica da IL-6, que, além de efeitos pró-inflamatórios, já teve diversos outros efeitos atribuídos, inclusive de imunossupressão, a compreensão dos efeitos clínicos da IL-6 na PE torna-se complexa.^{24,41}

Por fim, esta pesquisa está de acordo com estudos recentes que enfatizaram as propriedades pró-inflamatórias do IL-6sR mediante associação com IL-6 e gp-130. Resultados avaliando somente o IL-6sR, como visto neste trabalho, contribuem para o conhecimento da participação dessas moléculas na PE. Nossos resultados mostram o aumento dos níveis plasmáticos do IL-6sR em pacientes com PE, em relação a gestantes normotensas. Mais estudos se mostram necessários para o esclarecimento da fisiopatologia desta entidade, como a análise de outras citocinas ligadas a esse receptor, visto que elas podem ser a chave para a resposta inflamatória sistêmica que ocorre nestas pacientes e, portanto, para o seu tratamento.

AGRADECIMENTOS

O Laboratório de Nefrologia da PUCRS recebe apoio de CAPES, FAPERGS, CNPq e PUCRS. Hentschke MR é bolsista da CAPES e Poli-de-Figueiredo CE é pesquisador do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;183(1):S1-S22.
2. Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009;33:130-7.
3. Campbell KH, Savitz D, Werner EF, Pettker CM, Goffman D, Chazotte C, Lipkind HS. Maternal Morbidity and Risk of Death at Delivery Hospitalization. *Obstet Gynecol.* 2013;122(3):627-33. doi: 10.1097/AOG.0b013e3182a06f4e
4. Zhang YP, Liu XH, Gao SH, Wang JM, Gu YS, Zhang JY, Zhou X, Li QX. Risk factors for preterm birth in five Maternal and Child Health hospitals in Beijing. *PloS one.* 2012;7(12):e52780.
5. Gagliardi L, Rusconi F, Da Frè M, Mello G, Carnielli V, Di Lallo D, Macagno F, Miniaci S, Corchia C, Cuttini M. Pregnancy disorders leading to very preterm birth influence neonatal outcomes: results of the population-based ACTION cohort study. *Pediatr Res.* 2013;73(6):794-801.
6. Rana S, Schnettler WT, Powe C, Wenger J, Salahuddin S, Cerdeira AS, Verlohren S, Perschel FH, Arany Z, Lim KH, Thadhani R, Karumanchi SA. Clinical characterization and outcomes of preeclampsia with normal angiogenic profile. *Hypertens Pregnancy.* 2013;32(2):189-201.
7. Chesley LC. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor and remote prognosis. *Kidney Int* 1980;18(2):234-40.
8. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(2):H541-50.
9. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: variations on the theme. *Placenta.* 2009;30:S32-7.
10. Jonsson Y, Rubèr M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, Emerudh J, Ekerfelt C. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol.* 2006;70(1-2):83-91.
11. Takacs P, Grenn KL, Nikaeo A, Kauma SW. Increased vascular endothelial cell production of interleukin-6 in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(3):740-4.
12. Gadonski G, LaMarca BBD, Sullivan E, Bennett W, Chandler D, Granger JP. Hypertension Produced by Reductions in Uterine Perfusion in the Pregnant Rat: Role of Interleukin 6. *Hypertens.* 2006;48(4):711-6.
13. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1237-47.
14. Knüpfner H, Preiss R. sIL-6R: more than an agonist? *Immunol Cell Biol.* 2008;86(1):87-91.
15. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Mullberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med.* 1996;183(4):1399-406.
16. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(1 Suppl):1-51.
17. Atalah E, Castillo C, Castro R, Aldea A. Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women. *Rev Med Chil.* 1997;125(12):1429-36.
18. Hentschke MR, Poli-de-Figueiredo CE, Costa BEP, Kurlak LO, Williams PJ, Mistry HD. Is the atherosclerotic phenotype of preeclamptic placentas due to altered lipoprotein concentrations and placental lipoprotein receptors? Role of a small for gestational age phenotype. *J Lipid Res.* 2013;54(10):2658-64. doi:10.1194/jlr.M036699
19. Kadyrov M, Moser G, Rath W, Kweider N, Wruck CJ, Pufe T, Huppertz B. Maternal-placental interactions and fetal programming. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2013;217(3):88-94. doi: 10.1055/s-0033-1347179. 2013
20. Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. Role of placentally produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol.* 2007;29(2):151-62.
21. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. Immuno regulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. *Reprod Biomed Online.* 2007;14 Spec No 1: 111-7. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61465-4
22. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:387-411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil; 2012.
24. Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronillo F, Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J ObstetGynaecol Res.* 2008;34(6):948-51.
25. Schiessl B. Inflammatory response in preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine.* 2007;28(2):210-9.
26. Zhang Z, Gao Y, Zhang L, Jia L, Wang P, Li H. Alterations of IL-6, IL-6R and gp130 in early and late onset severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2013;32(3):270-80. doi:10.3109/10641955.2013.798332
27. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-alpha, homocysteine, folic acid and vitamin B12 levels with the severity of preeclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy.* 2009;28(2):190-200.
28. Al-Othman S, Omu AE, Diejomaoh FM, Al-Yatama M, Al-Qattan F. Differential levels of interleukin 6 in maternal and cord sera and placenta in women with pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2001;52(1):60-5.
29. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797-819.
30. Gaillard J, Pugniere M, Tresca J, Mani J, Klein B, Brochier J. Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum. *Eur Cytokine Netw.* 1999;10(3): 337-44.
31. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374 (Pt 1):1-20.
32. Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 2001;268(1): 160-7.

33. Zhao S, Gu Y, Dong Q, Fan R, Wang Y. Altered interleukin-6 receptor, IL-6R and gp130, production and expression and decreased SOCS-3 expression in placentas from women with pre-eclampsia. *Placenta*. 2008;29(12):1024-8. doi: 10.1016/j.placenta.2008.09.011
34. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*. 2001;14(6):705-14.
35. Jones SA and Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1592(3):251-63.
36. Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, Andrews B, Zhu K, Wheeler TM, Slawin KM. Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2004;10(6):1992-9.
37. Singh A, Purohit A, Wang DY, Duncan LJ, Ghilchik MW, Reed MJ. IL-6sR: release from MCF-7 breast cancer cells and role in regulating peripheral oestrogen synthesis. *J Endocrinol*. 1995;147(2):R9-12.
38. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Kakehi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood*. 2008;112(10):3959-64.
39. Tilbery CR, Felipe E, Mota IM, Scheinberg MA. Aumento dos receptores solúveis da interleucina-2 na esclerose múltipla. *Arq Neuropsiquiatr*. 1994;52(2):216-20.
40. Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*. 1994;300(Pt 2):281-90.
41. Lau SY, Guild SJ, Barrett CJ, Chen Q, McCowan L, Jordan V, Chamley LW. Tumor Necrosis Factor-Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Levels are Altered in Preeclampsia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2013;70(5):412-27. doi: 10.1111/aji.12138.

ARTIGO 5 - Artigo Original submetido para a revista *Hypertension*, sob o título Placental expression eNOS, iNOS and the major protein components of caveolae in women with pre-eclampsia. Autores: Kate-Smith-Jackson*, **Marta R. Hentschke***, Carlos E. Poli-de-Figueiredo, Bartira E. Pinheiro da Costa, Lesia O. Kurlak, Fiona Broughton Pipkin, Anna Czajka*, Hiten D. Mistry*. *Autores tiveram a mesma participação.

Placental expression eNOS, iNOS and the major protein components of caveolae in women with pre-eclampsia

Kate-Smith-Jackson^{1,2*}, Marta R. Hentschke^{2,3*}, Carlos E. Poli-de-Figueiredo³, Bartira E. Pinheiro da Costa³, Lesia O. Kurlak², Fiona Broughton Pipkin², Anna Czajka^{4*}, Hiten D. Mistry^{2,4*}

¹*Division of Women's Health, King's College London, Women's Health Academic Centre, UK;* ²*Department of Obstetrics & Gynaecology, School of Medicine, University of Nottingham, UK;* ³*Laboratory of Nephrology - IPB, School of Medicine, PUCRS, Brazil;* ⁴*Division of Diabetes and Nutritional Sciences, Diabetes Research Group, King's College London, UK; Division of Hypertension, Department of Nephrology, Hypertension and Clinical Pharmacology, University of Bern, Berne, Switzerland.*

*Authors made equal contribution

Abstract:

Caveolins and cavinins are the major protein components of caveolae, which regulate many cardiovascular functions. Caveolin-1 inhibits eNOS activity, therefore possible regulation of vascular reactivity and blood pressure by the caveolae are of interest in relation to pre-eclampsia. We hypothesised that expression of caveolin and cavin genes would be reduced, mirroring the up-regulated eNOS observed in pre-eclampsia compared to normotensive controls. Expression (mRNA and protein) of caveolin 1-3, cavin 1-4, eNOS and iNOS was measured in placentae from normotensive control (n=24) and pre-eclamptic (n=19) white European women. Placental biopsies were taken midway between the cord and periphery, avoiding infarcts. Gene expression was measured by qRT-PCR and normalised to stably-expressed GAPDH. Protein localisation was identified by immunohistochemistry and expression semi-quantitatively assessed. Expression of mRNA for caveolin-1, cavin-1, cavin-2 and cavin-3 were lower in pre-eclamptic placentae compared to normotensive controls and eNOS expression was increased in the same group ($P < 0.05$ for all). In addition, protein expression for all caveolae components were localised around fetal vessels and fibroblast, with faint staining in syncytiotrophoblasts; caveolin-1 protein expression was reduced in pre-eclampsia ($P = 0.007$). No differences between groups were found for any other gene or protein ($P > 0.05$). As well as their known effects on eNOS expression, caveolae mediate internalisation of numerous hormone receptors, thus potentially changing pressor and depressor responsiveness in the pre-eclamptic placentae.

Keywords: Caveolae; hypertension; cavin; pre-eclampsia; placenta

Introduction

Pre-eclampsia is one of the most important causes of maternal mortality and morbidity worldwide.(2, 3) Although the cause of pre-eclampsia remains unknown, the leading hypothesis of pre-eclampsia pathophysiology is based on placental dysfunction in which impaired early placentation results in shallow invasion and failed remodelling of the uterine spiral arteries. This leads to increased uteroplacental vascular resistance with a subsequent reduction in uteroplacental perfusion(4, 5) and an augmented state of oxidative stress. Coupled with maternal constitutional risk factors, this is thought to result in the maternal syndrome of pre-eclampsia in the later stages of pregnancy.(6) As the placenta receives no autonomic input, it relies upon vasoactive mediators to regulate its vascular reactivity. Nitric oxide (NO) plays an integral role in controlling vascular resistance within the placenta and a disruption of the NO pathway has been identified in pre-eclampsia.(7) The production of NO is catalysed by the conversion of L-arginine to NO by a family of enzymes termed nitric oxide synthases (NOS).(8) Three isoforms of NOS have been identified: endothelial nitric oxide synthase (eNOS) - responsible for most of the vascular NO; neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and inducible nitric oxide synthase which catalyses NO production through immune response (iNOS/NOS2).^(9, 10)

Caveolae are flask-shaped invaginations of the plasma membrane present in most mammalian cell types(11-14) and are involved in many cellular processes not limited to cholesterol transport(12, 15), endocytosis(16), potocytosis(17) and Ca^{2+} homeostasis(18). Caveolins (Cav's) and cavins are the major protein components of caveolae. The Cav gene family has three members: Cav-1, Cav-2 and Cav-3. Cav-1 expression is essential for the formation of caveolae, whereas the role of Cav-2 can vary depending on cell and tissue type.(19-23) In addition to their coat proteins, caveolae also contain adapter proteins, cavins, which are responsible for caveolae formation and Cav protein stabilisation(24); four isoforms of cavins have been identified, cavin-1 (polymerase transcript release factor, PTRF), cavin-2 (serum deprivation protein response, SDPR), cavin-3 (srd-related gene product that binds to c-kinase, SRBC), and cavin-4 (muscle-restricted coiled-coil protein, MURC). These may be important in regulating Cav expression and caveolae morphology and signal trafficking due to their ability to concentrate and compartmentalise various signalling molecules.(25, 26) In blood vessels, caveolae are present in the endothelial cell (EC) layer. A large number of signalling molecules that regulate vascular ECs localise to lipid rafts/caveolae; these include receptor tyrosine kinase,(27) G-protein-coupled receptors (GPCRs), transforming growth factor-beta (TGF- β) type I and II receptors, certain steroid receptors, low molecular weight and heterotrimeric G-proteins and eNOS.(28)

Under basal conditions, eNOS is bound to membrane protein Cav-1 and its action is tonically inhibited. However, when a stimulus is applied the complex dissociates and NO can be synthesised.(29) Several groups have shown that eNOS directly interacts with the scaffolding domain (aa 81-101) of Cav-1 causing an acute disruption of Cav-1/eNOS interaction results in hyperactivity of eNOS, increased vasodilatation and reduced blood pressure *in vivo*.(28)

Much of the literature reviewed here suggests that caveolae, Cavs and cavins play important roles in regulating EC signalling and function and thereby the cardiovascular and pulmonary function both at the cell and systemic levels.(30) In addition to the physiological role, caveolae and Cav's, in particular Cav-1 expressed in ECs, have been shown to have important regulatory roles in pathological angiogenesis and in vascular disease such as atherosclerosis, cardiac hypertrophy, pulmonary hypertension.(30) Previous studies have confirmed protein expression of Cav-1 and 2 in the endothelium of both placental capillaries and smooth muscle cells in larger vessels as well as fibroblasts in term human placental tissue(31, 32); only weak staining has been observed in syncytiotrophoblast cells.(33) We are not aware of any studies that have investigated expression of all the caveolae components in combination with eNOS and iNOS in human placentae following pre-eclampsia. Thus, we hypothesise the expression of both mRNA and protein expression of the Cav-1 to 3 and, cavins 1-4 will be down regulated in pre-eclamptic placentae; this down regulation would result in chronic activation of eNOS, leading to increased reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrative species (RNS) production, contributing to the augmented oxidative and nitrative stress state observed in pre-eclamptic pregnancies.

Methods

Subjects and selection criteria

The study population consisted of two groups of white European women (24 normotensive, 19 pre-eclamptic; Table 1). Detailed demographics and outcome data are previously published.(34) The study was approved by the Hospital Ethics Committee of the Nottingham University Hospitals; written informed consent was obtained from each participant. Pre-eclampsia was stringently defined as per the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy guidelines.(35)

Placental tissue collection

Full depth placental tissue samples were collected within ten minutes of delivery from a standardised location between the cord insertion and periphery of the placenta, avoiding infarcts. The samples were immediately rinsed in ice-cold phosphate buffered saline, the membranes removed, dabbed dry and placed into sterile 30 ml universal tubes and subsequently snap frozen in liquid nitrogen. All samples were then stored at -80°C until analysis. A second sample was formalin-fixed and wax embedded for immunohistochemical analysis.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from a known amount of placental tissue (~100 mg) using QIAzol lysis reagent (Qiagen, Crawley, UK) as previously described.(36) Briefly, RNA concentration and quality were verified spectrophotometrically using the Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Labtech, Ringmer, UK); all of the samples had an A_{260}/A_{280} ratio >1.96 and were stored at -80°C . RNA (1 μg) was then reverse transcribed using the QuantiTect Reverse Transcription kit containing a mix of random primers and oligodT (Qiagen, Crawley, UK) in a Primus96 advanced gradient thermocycler (Peqlab Ltd, Fareham, UK). The conditions used to generate first-strand cDNA were 42°C (15 minutes) and 95°C (3 minutes).

Quantitative Real time Polymerase Chain Reaction

Real-time PCR was carried out using SYBR Green chemistry (2x QuantiFast SYBR Green, Qiagen, Crawley, UK) on a RotorGene 6000 thermal cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) using the primers detailed in Table 2. A pre-PCR step was run for 5 minutes at 95°C followed by 45 cycles of 95°C for 10s and 60°C for 30s. Melt-curve analysis was performed to confirm the presence of one single product and non-template controls were run to assess contamination. Absolute quantification (standard curve method) was used to quantify gene expression. Abundance data for the genes of interest were normalised to GAPDH, a stably expressed housekeeping gene, suitable for human placental samples.(37)

Immunohistochemistry

Serial sections of placental tissue were cut (5 μm) in the same orientation from paraffin-embedded tissue blocks (Sledge Microtome, Anglia Scientific, Norwich, United Kingdom) and mounted onto Superfrost plus glass microscope slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). Before use, sections were dewaxed by immersion in xylene followed by rehydration in descending concentrations of alcohol (3 minutes each).

Immunohistochemical staining was performed using the Dako Envision system (Dako, Germany). Six rabbit, one goat polyclonal and two monoclonal antibodies (Cav-1, Cav-2, Cav-3, cavin-1 (mouse) cavin-2, cavin-3 (goat), cavin-4, eNOS (mouse), iNOS; Table 3) were used for immunostaining of paraffin-embedded placental sections. The optimal dilution for each antibody (Table 3) was established by performing a dilution series, with final selection on the basis of maximal specific reactivity and minimal background staining. Heat-induced epitope retrieval was achieved by heating in a citrate buffer (pH 6.0) using a microwave oven for 15 minutes, followed by incubation for 30 minutes in normal donkey serum (Vector Laboratories) to block non-specific binding. Slides were then incubated with primary antibodies overnight at 4°C (Table 3). A negative control was performed

for each test section by incubation with rabbit, mouse or goat IgG. Sections were dehydrated and cleared in ascending concentrations of alcohol and xylene before mounting in DPX (BDH, Poole, United Kingdom).

All of the slides were blinded to pregnancy outcome and assessed by the same observer (MRH). For analysis of placental sections, digital images of 5 randomly selected, high-power (x400 magnification) fields were captured on NIS-Elements F2.20 microscope (Nikon Ltd, Surrey, United Kingdom). Quantification of the antibodies were performed, as described previously,(36, 38) using the Positive Pixel Algorithm of Aperio Image Scope software. This software is able to discriminate between positive- and negative stained pixels and combines the number of positive pixels stained with the intensity of these same pixels to produce the value “positivity”. A visual check was also performed to ensure accurate discrimination of immunolabeled regions.

Western blotting

Protein extraction was performed as described previously.(39) Briefly 100 mg of placental or myometrial (positive control) samples were homogenised in RIPA buffer (1x PBS (pH 7.4), 0.1% SDS, 1% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, Poole, UK) and 0.5% sodium deoxycholate) with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Poole, UK) to prevent proteolysis. Protein concentration was determined by modification of Lowry method.(40) Samples (25-30 µg/µl of protein) were loaded into Novex pre-cast gels (Invitrogen, UK) alongside a protein molecular weight ladder, electrophoresed for 1.5 h at 170 V and transferred to a PVDF membrane (GE-Healthcare) (30V for 1 h). Immunodetection was performed using primary antibodies against all proteins of interest as stated in Table 3. Primary antibody detection was performed using horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat antibodies (BD Biosciences, Oxford, UK). Proteins were visualised with chemiluminescence agent (GE healthcare, UK).

Statistical Analysis

All tests were performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows version 20.0. Summary data are presented as means ± standard deviation or median and interquartile range (IQR) as appropriate. The Student's *t*-test or Mann-Whitney *U*-tests were used depending on the distribution of the data, after normality testing using the Kolmogorov-Smirnov test. Correlations between the parameters were tested with a Spearman's Rank correlation tests. The null hypothesis was rejected where $P < 0.05$.

Results

Subjects

Demographic, obstetric, and pregnancy description data of the 43 participants are shown in Table 1; clinical descriptions have previously been published.(34) All patients carried singleton pregnancies and the women with pre-eclampsia had moderate-to-severe disease, without HELLP syndrome. No medication was taken by the pregnant women apart from paracetamol and prescribed anti-hypertensive therapy. There was no maternal or infant mortality recorded in either group.

Placental mRNA expression

Placental mRNA expression of *cavin-1-4*, *Cav-1-3*, *eNOS* and *iNOS* was observed in normotensive control and pre-eclamptic women (Figure 1a-c). Compared to normotensive controls, *Cav-1* and *cavin-1-3* all had significantly lower expression in the pre-eclamptic placentae ($P < 0.05$ for all; Figs. 1a & 1b). *Cav-2* and *3* and *cavin-4* were not significantly different between groups ($P > 0.05$ for all). Conversely, *eNOS* was found to be increased in pre-eclampsia ($P = 0.045$; Fig. 1c); *iNOS* did not differ between groups ($P > 0.05$). Due to the significant difference between the gestational ages in the control versus pre-eclamptic cohorts (Table 1), the pre-eclamptic group was further subdivided

into those who had delivered preterm (<37 weeks; n=8) and those who delivered at term (n=11). All differences remained significant in pre-eclamptic placentae delivered at both preterm and term compared with the normotensive controls ($P < 0.05$ for all).

Cavin-1 and *eNOS* mRNA expression was positively associated in the pre-eclamptic ($r = 0.58$; $P = 0.003$) but not the normotensive placentae (Fig. 2). *Cav-1* was also found to positively correlate overall with both *cavin-2* ($r = 0.06$, $P < 0.0001$) and *cavin-3* ($r = 0.554$, $P < 0.001$).

Placental protein expression

The expression of all Cav, cavin, eNOS and iNOS proteins in placental tissue from normotensive control and women with pre-eclampsia are shown in Figs. 3a-c and Table 4. Specificity of the antibodies was confirmed by Western blots. Staining for most Cav and cavin isoforms were localised around fetal vessels and fibroblasts, with faint staining in syncytiotrophoblasts. Conversely, both eNOS and iNOS expression was localised to the syncytiotrophoblast. Compared to normotensive controls, Cav-1 placental protein expression was significantly reduced in pre-eclampsia ($P = 0.001$; Table 4). No significant differences were observed for any other proteins ($P > 0.05$).

Discussion

This is the first report of a detailed expression profile of placental caveolae, combined with both eNOS and iNOS in women with pre-eclampsia. This study demonstrates that the mRNA expression of *cavin-1*, *cavin-2*, *cavin-3* and *Cav-1* are downregulated, whilst *eNOS* is upregulated in pre-eclamptic placentae. Moreover *cav-1* protein expression was also significantly reduced in the pre-eclamptic group. The increased eNOS in pre-eclamptic placentae is in accordance with previous studies(41-43) and was attributable to the increase and subsequent maturation of the placenta to control its vascular resistance through paracrine mediators.(41) Placental localisation of the *cav-1* and eNOS are similar to previous studies(31-33).

It has previously been hypothesised that the increase in *eNOS* mRNA may be a compensatory mechanism in response to poor placentation stemming from reduced uteroplacental blood flow. Therefore, an increase in eNOS would yield an increase in NO, aiming to vasodilate the uteroplacental unit and improve blood flow.(44) Additionally, *eNOS* mRNA expression may be upregulated within pre-eclamptic placentae due to the oxidative stress.(45) This upregulation of eNOS coupled with the increase in superoxynitrite within pre-eclamptic placentae could lead to peroxynitrite formation; this in turn, may result in lipid peroxidation and endothelial cell dysfunction, characteristic of pre-eclampsia.

Reduced expression of *cavin 1-3* and *Cav-1* in the current study highlight another potential mechanistic role whereby in pre-eclampsia, *eNOS* mRNA expression is upregulated. A reduction in *cavin-1* is likely to result in a reduction of Cav-1 immobilised to the plasma membrane and therefore would be unable to exert its tonic inhibition upon eNOS leading to chronic expression and upregulation. A lack of *cavin-1* has been reported to result in a reduction in the total number of caveolae and Cav-1 in Hela cells(46) while *cavin-1* deficient mice have a significant loss of *cavin-3* and all caveolin proteins. (47) In mammalian cells and in zebrafish, loss of *cavin-1* and reduction in caveolae number also increased the lateral mobility of Cav-1.(48) These studies allow us to draw parallels with the current findings, that mRNA expression of both *cavin-1* and *Cav-1* could be controlled synergistically (i.e. that a reduction in one may cause a similar reduction in the other through adaptive mechanisms); potentially causing changes in expression of all other cavins and Caves which are necessary to form functional caveolae. The positive association of *cavin-1* mRNA expression and *eNOS* expression, only evident in the pre-eclamptic group, suggests a pre-eclampsia specific pathway involving *cavin-1* and eNOS, however the role of *cavin-1* in eNOS signalling is not fully understood. *Cavin-1* knockout mice have enhanced NO release compared to wild type controls, but endothelial cell proliferation, migration and differentiation were absent.

Associations between caveolae proteins (especially Cav-1) and mitochondria have also been reported. Fridolfsson *et al* reported mitochondria-caveolae protein interactions having a protective effect on oxidatively stressed cells.(49) Transfer of Cav-3 to mitochondria protects cells from damage by inducing mitochondrial respiration and adaptation to oxidative stress.(49) Moreover, Cav-1 deficient mice fibroblast cells show impairment in mitochondrial respiration and reduction in intrinsic antioxidant defence leading to apoptosis.(50) Changes in Cav-1 protein levels in mitochondria influence free cholesterol levels in organelles, which eventually affect mitochondrial function and induction of oxidative stress followed by apoptosis. The reduced Cav-1 expression in pre-eclamptic placentae could therefore result in a lack of the protective role in cell responses to oxidative stress injury and apoptosis.

The growth of the placenta in a pre-eclamptic pregnancy is thought to be compromised by ischaemia-reperfusion injury, more than just a relatively lower hypoxic environment than in normal pregnancy. Mouse models show that such injury causes loss of Cav-1 in cardiomyocytes(51) whilst in rats, ischaemia/reperfusion causes rapid translocation and activation of p38MAPKs. This results in less p38MAPK α binding to Cav-1 and more p38MAPK β binding to Cav-3: the consequences of this being more p38MAPK α available to induce an apoptotic cellular response.(52) Further evidence that Cav's have a role in cardiac tissue protection is demonstrated in ischemic preconditioning models showing Cav's interacting with the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway.(53, 54)

Our findings provide evidence for a potential mechanistic pathway whereby a reduction in placental Cav-1 leads to chronic activation of eNOS in pre-eclampsia. This may attenuate the characteristic vasoconstriction; conversely, it may be a consequence of the oxidative/nitrative stress state observed in pre-eclampsia. Whilst these differences in eNOS and cavin-1 are not observed at the protein level, post-translational modifications may affect the proteins location and activity between groups. These data support the evidence for cavin-1 as a regulator of eNOS; whether this is mediated through Cav-1 (as cavin-1 knockout reduces Cav-1(55)) or independently remains unknown. Novel alterations in the placental cavoelae complexes in pre-eclamptic placentae suggest the need for future work to elucidate mechanisms underlying the changes reported in this study.

Perspectives

In order to determine if similar differences antedate the clinical onset of the disease, longitudinal studies are needed, which will allow us to determine whether the results are cause or effect. First and second trimester placentae from pregnancies terminated due to social reasons would allow us to look at the mRNA and protein expression of caveolae, enabling us to trace their expression through the trimesters of pregnancy.

The critical regulatory action of Cav-1 upon angiogenesis, the angiotensin II receptors and eNOS coupled with our results within pre-eclamptic placentae make it an ideal candidate for future research to explore its physiological role within the placenta and how this becomes disturbed in pre-eclampsia. The novel finding of cavin-1 and its positive correlation with eNOS warrants further investigation in all realms of cardiovascular physiology, as it may be an active contributor to vascular reactivity.

Acknowledgments

We thank all the women who participated in the study and the midwives and doctors whose support made this study possible.

Sources of Funding: Tommy's Charity (Charity number: 1060508), CAPES/CNPq, Brazil (MRH) and Society for Endocrinology Summer studentship (KS-J). CEPF is a CNq researcher

Conflict of Interest: No conflict of interest for all authors.

References

1. Roberts, J.M., et al., *Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy*. Hypertension, 2003. **41**(3): p. 437-45.
2. Duley, L., *The global impact of pre-eclampsia and eclampsia*. Semin Perinatol, 2009. **33**(3): p. 130-7.
3. Brosens, I.A., *Morphological changes in the utero-placental bed in pregnancy hypertension*. Clin Obstet Gynaecol, 1977. **4**(3): p. 573-93.
4. Pijnenborg, R., et al., *Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol, 1991. **98**(7): p. 648-55.
5. Roberts, J.M. and C.A. Hubel, *The two stage model of preeclampsia: variations on the theme*. Placenta, 2009. **30 Suppl A**: p. S32-7.
6. Sladek, S.M., R.R. Magness, and K.P. Conrad, *Nitric oxide and pregnancy*. Am J Physiol, 1997. **272**(2 Pt 2): p. R441-63.
7. Shen, P., et al., *High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6549-54.
8. O'Connor, D.M. and T. O'Brien, *Nitric oxide synthase gene therapy: progress and prospects*. Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(7): p. 867-78.
9. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
10. Anderson, R.G., *Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10909-13.
11. Fielding, P.E. and C.J. Fielding, *Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol*. Biochemistry, 1995. **34**(44): p. 14288-92.
12. Parton, R.G., *Caveolae and caveolins*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(4): p. 542-8.
13. Severs, N.J., *Caveolae: static in-pocketings of the plasma membrane, dynamic vesicles or plain artifact?* J Cell Sci, 1988. **90** (Pt 3): p. 341-8.
14. Smart, E.J., et al., *A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29427-35.
15. Schnitzer, J.E., P. Oh, and D.P. McIntosh, *Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes*. Science, 1996. **274**(5285): p. 239-42.
16. Anderson, R.G., et al., *Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae*. Science, 1992. **255**(5043): p. 410-1.
17. Taggart, M.J., *Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins?* News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 61-5.
18. Scheiffele, P., et al., *Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 795-806.
19. Fujimoto, T., et al., *Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3509-17.
20. Razani, B., et al., *Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(7): p. 2329-44.
21. Lahtinen, U., et al., *Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells*. FEBS Lett, 2003. **538**(1-3): p. 85-8.
22. Sowa, G., et al., *The phosphorylation of caveolin-2 on serines 23 and 36 modulates caveolin-1-dependent caveolae formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6511-6.
23. Liu, L. and P.F. Pilch, *A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4314-22.
24. Hansen, C.G. and B.J. Nichols, *Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(4): p. 177-86.
25. Briand, N., I. Dugail, and S. Le Lay, *Cavin proteins: New players in the caveolae field*. Biochimie, 2011. **93**(1): p. 71-7.
26. Robinson, M.J., et al., *Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV*. Retrovirology, 2010. **7**: p. 108.
27. Sowa, G., *Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights*. Front Physiol, 2012. **2**: p. 120.
28. Feron, O. and R.A. Kelly, *The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling*. Circ Res, 2001. **88**(2): p. 129-31.
29. Mathew, R., *Cell-specific dual role of caveolin-1 in pulmonary hypertension*. Pulm Med, 2011. **2011**: p. 573432.
30. Byrne, S., et al., *Immunocytochemical localization of a caveolin-1 isoform in human term extra-embryonic membranes using confocal laser scanning microscopy: implications for the complexity of the materno-fetal junction*. Placenta, 2001. **22**(6): p. 499-510.

31. Lyden, T.W., C.L. Anderson, and J.M. Robinson, *The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae*. *Placenta*, 2002. **23**(8-9): p. 640-52.
32. Linton, E.A., et al., *Caveolae and caveolin-1 in human term villous trophoblast*. *Placenta*, 2003. **24**(7): p. 745-57.
33. Mistry, H.D., et al., *Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies*. *Hypertension*, 2008. **52**(5): p. 881-8.
34. Brown, M.A., et al., *The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP)*. *Hypertens Pregnancy*, 2001. **20**(1): p. IX-XIV.
35. Mistry, H.D., et al., *Novel expression and regulation of voltage-dependent potassium channels in placentas from women with preeclampsia*. *Hypertension*, 2011. **58**(3): p. 497-504.
36. Murthi, P., et al., *GAPDH, 18S rRNA and YWHAZ are suitable endogenous reference genes for relative gene expression studies in placental tissues from human idiopathic fetal growth restriction*. *Placenta*, 2008. **29**(9): p. 798-801.
37. Williams, P.J., et al., *Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human*. *Placenta*, 2010. **31**(5): p. 448-55.
38. Mistry, H.D., et al., *Differential expression and distribution of placental glutathione peroxidases 1, 3 and 4 in normal and preeclamptic pregnancy*. *Placenta*, 2010. **31**(5): p. 401-8.
39. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
40. Dotsch, J., et al., *Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001. **97**(2): p. 163-7.
41. Faxen, M., H. Nisell, and K.R. Kublickiene, *Altered mRNA expression of eNOS and iNOS in myometrium and placenta from women with preeclampsia*. *Arch Gynecol Obstet*, 2001. **265**(1): p. 45-50.
42. Napolitano, M., et al., *Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(6): p. 2318-23.
43. Myatt, L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies*. *Hum Reprod*, 1997. **12**(1): p. 167-72.
44. Galle, J., et al., *Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor*. *Arterioscler Thromb*, 1991. **11**(1): p. 198-203.
45. Hansen, C.G., et al., *SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(7): p. 807-14.
46. Karbalaei, M.S., et al., *Impaired contractility and detrusor hypertrophy in cavin-1-deficient mice*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **689**(1-3): p. 179-85.
47. Hill, M.M., et al., *PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 113-24.
48. Fridolfsson, H.N., et al., *Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury*. *FASEB J*, 2012. **26**(11): p. 4637-49.
49. Bosch, M., et al., *Caveolin-1 deficiency causes cholesterol-dependent mitochondrial dysfunction and apoptotic susceptibility*. *Curr Biol*, 2011. **21**(8): p. 681-6.
50. Chaudhary, K.R., et al., *Effect of ischemia reperfusion injury and epoxyeicosatrienoic acids on caveolin expression in mouse myocardium*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013. **61**(3): p. 258-63.
51. Das, M., J. Cui, and D.K. Das, *Generation of survival signal by differential interaction of p38MAPKalpha and p38MAPKbeta with caveolin-1 and caveolin-3 in the adapted heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **42**(1): p. 206-13.
52. Fridolfsson, H.N. and H.H. Patel, *Caveolin and caveolae in age associated cardiovascular disease*. *J Geriatr Cardiol*, 2013. **10**(1): p. 66-74.
53. Roth, D.M. and H.H. Patel, *Role of caveolae in cardiac protection*. *Pediatr Cardiol*, 2011. **32**(3): p. 329-33.
54. Davalos, A., et al., *Quantitative proteomics of caveolin-1-regulated proteins: characterization of polymerase i and transcript release factor/CAVIN-1 IN endothelial cells*. *Mol Cell Proteomics*, 2010. **9**(10): p. 2109-24.

Novelty and Significance:

What Is New?: Novel placental mRNA and protein expression alterations of all caveolae components in combination with eNOS and iNOS in pregnancies complicated with pre-eclampsia compared to normotensive controls.

What is Relevant?: Caveolins and cavins are the major protein components of caveolae which regulate many cardiovascular functions. Caveolin-1 inhibits eNOS activity, therefore possible regulation of vascular reactivity and blood pressure by the caveolae are of interest in relation to pre-eclampsia.

Summary: Reduced expression of cavin-1-3 and caveolin-1 in the current study potentially highlight another mechanistic role whereby in pre-eclampsia, eNOS mRNA expression is upregulated.

Figure Legends

Figure 1: Placental normalised mRNA expression of a) cav-1-3; b) cavin-1-4 and c) eNOS and iNOS between normotensive and pre-eclamptic pregnancies. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$ and $P < 0.0001$. (Idem Figura 22, pg 140)

Figure 2: Scatter plot demonstrating the significant association between cavin-1 and eNOS mRNA expression in pre-eclamptic placentae only ($r = 0.584$; $p = 0.003$) but not in the normotensive controls ($p < 0.05$; ▲). (Idem Figura 24a, pg 143)

Figure 3: Protein expression and localisation of (a) Cav-1, 2 and 3; (b) Cavin-1, 2, 3 and 4 and c) eNOS and iNOS in normotensive control and pre-eclampsia placentae. Cav-1 expression was significantly downregulated in pre-eclamptic vs. normotensive control placentae ($P < 0.05$). Positive staining was localised mainly around fetal vessels (black arrows) and some weak staining in syncytiotrophoblasts (red arrow). . (Idem Figura 23, pg 142)

Tables

Table 1. Demographic, obstetric and pregnancy data of subject groups. (Idem Tabela 10, pg 137)

Table 2. Primers used in qPCR. . (Idem Tabela 8, pg 132)

Table 3. Product descriptions and Dilutions for immunohistochemistry (IHC) and Western blotting . (Idem Tabela 9, pg 134)

Table 4. Immunohistochemical analysis (positivity scores) of placental cavs, cavins, eNOS and iNOS protein expression from normotensive controls and women with pre-eclampsia. ** $P \leq 0.001$. .(Idem Tabela 11, pg 141)

ARTIGO 6 - Artigo Original submetido para a revista *Cytokine* sob o título: *Association between maternal CCL15 plasma concentration and preeclampsia in the third trimester pregnancy*. Autores: **Marta R. Hentschke**; Bruna Krauspenhar; Hiten D. Mistry; Giovani Gadonski; Ivan Carlos Antonello; Carlos E. Poli-de-Figueiredo; Bartira E. Pinheiro da Costa.

Association between maternal CCL15 plasma concentration and preeclampsia in the third trimester pregnancy

Marta R. Hentschke^a; Bruna Krauspenhar^a; Hiten D. Mistry^b; Giovani Gadonski^a; Ivan Carlos Antonello^a; Carlos E. Poli-de-Figueiredo^a; Bartira E. Pinheiro da Costa^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia), Faculdade de Medicina/Instituto de Pesquisas Biomédicas/Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bDivision of Women's Health, King's College London, Women's Health Academic Centre, UK.

E-mail address of each author:

Marta R. Hentschke: martarh@yahoo.com.br

Bruna Krauspenhar: bruna.kraus@ig.com.br

Hiten D. Mistry: hiten.mistry@kcl.ac.uk

Giovani Gadonski: ggadonski@yahoo.com.br

Ivan Carlos Antonello: ivan.antonello@pucrs.br

Carlos E. Poli-de-Figueiredo: cepolif@pucrs.br

Corresponding author

Bartira Ercília Pinheiro da Costa

Laboratório de Nefrologia – IPB – Hospital São Lucas da PUCRS

Av. Ipiranga, 6690

Porto Alegre, RS, Brazil - ZIP code: 90610-000

Tel. ++ 55 51 33367700 - Fax: ++ 55 51 33367700

E-mail: bart@pucrs.br

Abstract

Introduction: Preeclampsia has been demonstrated as an exacerbation of gestational inflammatory process. The human CCL15 is a chemokine secreted by macrophages and participates in the inflammatory response. Our aim was to quantify and compare the concentration of Chemoattractant Chemokine ligand 15 (CCL15) in maternal plasma from preeclampsia and normotensive women. We hypothesised that CCL15, as an inflammatory cytokine, is up regulated in preeclamptic group.

Methods: A cross-sectional study was conducted to estimate CCL15 levels in maternal plasma from preeclampsia (n=22) compared to the control group of normotensive pregnant (n=38) in the third trimester of gestation. It was attended at São Lucas Hospital, Porto Alegre, Brazil. CCL15 concentration was measured by ELISA test.

Results: CCL15 levels were statistically increased in plasma of women with preeclampsia (84.1 ± 28.7 ng/mL) when compared to controls (39.2 ± 14.0 ng/mL; $p < 0.001$). No correlation was observed between CCL15 with gestational age, systolic and diastolic arterial pressure and body mass index adjusted to the gestational age.

Conclusion: The study showed for the first time that CCL15 chemokine is raised in the plasma of pregnant women with preeclampsia compared to the normotensive controls. It seems that CCL15 -as a pro-inflammatory cytokine- is involved in inflammatory response well established by the up regulation of IL-6 and TNF α in preeclampsia.

Keywords: CCL15 protein, human; pre-eclampsia; inflammation; hypertension, pregnancy-induced; MIP-5 protein, human.

Abbreviations

AIG: Adequate-for-gestational-age

BMI: body mass index

CCL15: Chemoattractant Chemokine Ligand 15

CCR1: C-C chemokine receptor type 1

FGF β : Fibroblast Growth Factor Beta

HSL: Hospital São Lucas

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-6: Interleukin-6

LGA: Large-for-gestational-age

MIP-1 or MIP-5: Macrophage Inflammatory Protein

MMPs: Metalloproteinases

NC: Normotensive Controls

PE: Preeclampsia

P/C: Protein:creatinin ratio

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SD: Standard Deviation

SGA: Small-for-gestational-age

TGF-transforming growth factor

TNF-Alpha: Tumoral Necrosis Factor Alpha

1. Introduction

More than half a million women worldwide die each year due to complications from pregnancy, with 99% of these deaths occurring in low-and middle-income countries [1, 2]. Preeclampsia (PE) is the most common cause of maternal and fetal morbidity and mortality, accounting for 2-8% of pregnancy complications [3].

PE is characterized by renal and systemic endothelial dysfunction, presenting hypertension and proteinuria from the 20th week of pregnancy [4]. Although its etiology is unknown, several studies have suggested the involvement of immunological, inflammatory and vascular factors in the pathophysiology of PE [5-8]. Inadequate trophoblast invasion occurs, which may trigger PE through the release of anti-angiogenic factors and cytokines at the maternal-fetal interface [9, 10].

The human CCL15 chemokine - Chemoattractant Chemokine Ligand 15 -, also known as MIP-1delta or MIP-5 - Macrophage Inflammatory Protein -, is secreted by macrophages and participates in the inflammatory response. It exerts its activity predominantly in the CCR1 receptor, also expressed by various inflammatory cells, airway smooth muscle cells [11] and endothelial cells [12, 13]. Also, CCL15 may have an important role in tumorigenesis and tumour invasion in the hepatocellular carcinoma as a proteomic biomarker [14]. CCL15 increases its biological activity when cleaved [15], recruiting eosinophils, monocytes, lymphocytes and dendritic cells to the inflammatory site, and also promoting angiogenic activity [16, 17]. Except for a report of the genes evaluation expressed in the basal decidua [18], we are not aware of any studies linking CCL15 plasma levels and PE.

A previous screening study by our group involving a small number of pregnant women found that the CCL15 chemokine was elevated in plasma of women with PE, when compared to normotensive controls (NC) pregnant women, whilst the placental and cord blood levels showed no difference between groups [19].

The hypothesis of the present study is that CCL15, as an inflammatory chemokine, would be increased in plasma of PE compared to NC pregnant. In order to test this hypothesis, we aimed to quantify and compare the concentration of CCL15 in maternal plasma from NC women and with PE.

2. Material and methods

A cross-sectional study was conducted including 60 pregnant women (38 NC and 22 with PE), attending at São Lucas Hospital of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS), Porto Alegre, Brazil. The disorder was diagnosed based on the National High Blood Pressure Working Group Education Program on High Blood Pressure in Pregnancy guideline [20], that defines PE as a high blood pressure (systolic blood pressure ≥ 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure of ≥ 90 mm Hg) and proteinuria (≥ 300 mg/24 h) at or after 20 weeks' gestation on 2 or more occasions at least 4 hours apart. A urine protein:creatinin ratio (P/C) equal to or greater than 0.3 was considered as equivalent to a 24 hours proteinuria > 0.3 g/24 hours for the diagnosis of PE. The exclusion criteria were women with a previous diagnosis of kidney and liver disease, diabetes mellitus, infections, multiple pregnancies and/or lack of information on the database. Normotensive pregnant women with proteinuria were also excluded. Uric acid and proteinuria were measured only in women with PE. The following data was compared: maternal age, obstetric gestational age, type of delivery, ethnicity, systolic and diastolic blood pressure, body mass index (BMI) at booking adjusted for gestational age [21], birth weight, placental weight, Apgar score at 1 and 5 minutes, and birth weight percentile. The study was approved by the Ethics Committee of PUCRS, and a written informed consent was obtained from each participant.

2.1 Sample collection and analysis of CCL15

Four milliliters of maternal peripheral blood was collected in EDTA tube up to 30 minutes prior to delivery. The samples were processed by centrifugation at 1000g for 10 min. Plasma samples were stored at -80°C until analysis.

CCL15 concentration in the maternal plasma was determined by the ELISA human-specific, colorimetric enzyme immunoassay technique (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN-USA). Initially, the test was validated and optimised for plasma dosage, reaching a dilution factor of 1:128 in reagent diluent. The intra and inter-assay variation coefficient was 12% and 5-10%, respectively. All samples were analyzed in duplicate. In summary, a 96-well plate sensitized with antigen CCL15 reconstituted in 1X phosphate buffered saline (PBS) was used. After washing with 0.05% Tween 20 diluted in PBS, the blocking non-specific sites was made with bovine serum albumin. A second wash was performed followed by incubation with plasma samples. After removing of this material by washing, a detection antibody was added followed by treatment with streptavidin and a binding substrate, according to manufacturer's instructions. The color intensity was measured with a spectrophotometer (URIT-660 Microplate Reader, China) at a wavelength of 450nm. The final concentration was calculated taking into account the dilution factor applied to the samples.

2.2 Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS for Windows version 17.0. Continuous variables are presented as means \pm standard deviation (SD) or median and interquartile range as appropriate. After testing distribution using the Kolmogorov-Smirnov test, Student's *t* test was employed. Categorical data were summarized by counts and percentages, with the statistical significance evaluated by the Chi-square

test or Fisher's exact test. Correlations were performed using Pearson's analysis. The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$.

3. Theory/calculation

The propose of this article was based on a previous studying in our groups in which we analyse 120 cytokine in placenta, maternal plasma e umbilical cord plasma, using a small sample. The statistical analysis showed that the cytokine CCL15 was one of the most important inflammatory cytokine between normotensive controls and preeclampsia. Thus, our group decided to investigate the CCL15 in large amount, only in plasma from women with preeclampsia verus normotenisve controls.

4. Results

4.1 Subjects

The clinical and demographic data of the 60 participants and their infants are presented in Table 1. Blood pressure levels, gestational age and birth weight were statistically different between groups ($P < 0.01$). All patients carried singleton pregnancies, sixteen patients were nulliparous in the NC group (42%) and nine patients in the preeclamptic group (41%).

4.2 Biochemical measurements

For all maternal blood collection none pregnant was classified as diabetic, fasting glucose = 77.4 ± 9.0 mg/dL and 76.5 ± 6.0 mg/dL in NC group and in PE respectively ($P = 0.714$). Uric acid and proteinuria over creatininuria ratio -measured only in PE women- were 4.9 ± 1.1 mg/dL and $0.68 [0.36, 2.87]$ respectively.

4.3 Plasma CCL15 concentrations

The CCL15 concentrations in maternal plasma from NC and women with PE are presented in Figure 1. The Figure shows a higher CCL15 concentration in plasma of women with PE (84.1 ± 28.7 ng/mL) compared to the NC (39.2 ± 14.0 ng/mL; $P < 0.001$).

No correlation was found between CCL15 and BMI adjusted to gestational age and systolic and diastolic arterial pressure. Finally Pearson's correlation between gestational age and CCL15 levels was $r = -0.333$; $p = 0.011$.

5. Discussion

This study demonstrated a significant difference between the CCL15 plasma concentrations of pregnant women with PE, as compared to NC pregnant women, for the first time. This result seems to be previously unreported, although there are many reports of alterations in various Th1 and Th2 cytokines in PE [10, 22] more specifically TNF α , IL-1 β and IL-6, which are elevated in patients with this disease [23, 24], and in animal models [25, 26].

This data is consistent with the hypothesis that PE presents itself as a exacerbated inflammatory response [27]. The role of the transforming growth factor (TGF) β is, however, controversial in PE, as it participates in the process of placentation [22, 28], and may be involved in the pathogenesis of this disease [29, 30]. TGF- β 3, a cytokine that prevents trophoblast invasion by inhibiting the production of some metalloproteinases (MMPs), has also been reported in high concentrations in the placenta of women with PE [31].

MMPs and Cathepsin G are responsible for the activation of CCL15, contributing to the recruitment of monocytes to the inflammatory site [15, 32]. *In vivo* and *in vitro* studies regarding neovascularization with endothelial cells from the umbilical cord have shown that CCL15 stimulates the formation of new vessels. The activity of this chemokine was similar to the potent angiogenic molecule Fibroblast Growth Factor (FGF). Although CCL15 induces endothelial cell migration, its chemotactic activity is increased when cleaved [16]. Together, this data suggests that the outcome of pregnancy results from a complex response mediated by interactions between cytokines and growth factors secreted by the maternal-fetal interface.

It has been suggested that the release of these inflammatory mediators in the maternal circulation is as a result of uteroplacental hypoxia [33] leading to endothelial cell dysfunction, and ultimately hypertension and proteinuria [34]. As previously mentioned, proinflammatory cytokines at abnormal levels can be found in the maternal circulation of women with PE. In addition to the presence of these cytokines, lipid peroxides also circulate in high concentrations, promoting oxidative stress, which is a factor involved in the pathophysiology of PE [35].

Oxidative stress causes endothelial damage by increasing the plasma concentration of free radicals, which precedes the onset of clinical manifestations of this disease and correlates with increased arterial pressure [36, 37]. As such, investigations of the mechanisms involved in the activation of cytokine producing cells should result in studies related to the maintenance of fetal hemodynamic balance in response to placentation. In this regard, the verification of CCL15 concentrations in the maternal circulation provides information about the plasma composition as an indicator of pro-inflammatory cells activity.

It has been found that the risk of preterm labor increases when the maternal serum concentration of CCL15 is less than 27.7 pg/ml [38]. In the results of this study, the mean plasma level of CCL15 in the NC pregnant was 39.2ng/ml, whereas this figure was 84.1ng/ml for the group of women who developed PE. It was observed that the mean gestational age of 35.0 weeks was characteristic of women with PE, suggesting different mechanisms between preterm and PE. In both studies, the method of determination used for the quantification of CCL15 was the same. As our results, no correlation was found between CCL15 and gestational age, indicating that the chemokine might be increased due to the disorder.

Pregnant women with active infections, premature membrane rupture, polyhydramnios and multiple gestation, as well as those with a history of liver disease, kidney disease, diabetes and

endocrinopathies were excluded. These criteria differ from the profile normally found in clinical practice, especially in relation to pregnant women with diabetes and kidney disease who are at greater risk of developing PE. Such exclusions are justified by the aim of investigating the pathophysiology of PE with the smallest possible number of differences between patients, which is a difficult situation to create when non-experimental studies are developed. Moreover, the study was relevant and showed itself to be specific to the pathology under study. The difference in gestational age between the control group and the group of women with PE could be biased, but the correlation linking the two variables does not exist when adjusted for each group.

5.1 Conclusion

In conclusion, our results have shown for the first time that the CCL15 chemokine is raised in the plasma of pregnant women with PE, when compared to NC pregnant women. However, its role as a possible diagnostic biomarker still requires further investigation as PE is a complex and multifactorial disease, which involves a deregulated inflammatory response and consequent immune intolerance.

6. Acknowledgements

We thank all the women who participated in the study and the medical students, nurses and doctors whose support made this study possible. The Nephrology Laboratory is supported by Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

7. References

- [1] L. Duley, The global impact of pre-eclampsia and eclampsia, *Semin Perinatol.* 33 (2009) 130-137.
- [2] U. Hogberg, The World Health Report 2005: "make every mother and child count" including Africans, *Scand J Public Health.* 33 (2005) 409-411.
- [3] K.S. Khan, D. Wojdyla, L. Say, A.M. Gulmezoglu, P.F. Van Look, WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review, *Lancet.* 367 (2006) 1066-1074.
- [4] B.C. Young, R.J. Levine, S.A. Karumanchi, Pathogenesis of preeclampsia, *Annu Rev Pathol.*; 5 (2010) 173-192.
- [5] C.W. Redman, Preeclampsia: a multi-stress disorder, *Rev Med Interne.* 32 (2011) S41-44.
- [6] C.W. Redman, I.L. Sargent, Preeclampsia and the systemic inflammatory response, *Semin Nephrol.* 24 (2004) 565-570.
- [7] J.M. Roberts, C.A. Hubel, The two stage model of preeclampsia: variations on the theme, *Placenta.* 30 (2009) S32-37.
- [8] G.A. Dekker, B.M. Sibai, The immunology of preeclampsia, *Semin Perinatol.* 23 (1999) 24-33.
- [9] J.S. Gilbert, M.J. Ryan, B.B. LaMarca, M. Sedeek, S.R. Murphy, J.P. Granger, Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294 (2008) H541-550.
- [10] S. Saito, M. Sakai, Th1/Th2 balance in preeclampsia, *J Reprod Immunol.* 59 (2003) 161-173.
- [11] Y. Shimizu, K. Dobashi, CC-chemokine CCL15 expression and possible implications for the pathogenesis of IgE-related severe asthma, *Mediators Inflamm.* 2012 (2012) 4752-53.
- [12] J.K. Lee, E.H. Lee, Y.P. Yun, K. Kim, K. Kwack, D.S. Na, B.S. Kwon, C.K. Lee, Truncation of NH2-terminal amino acid residues increases agonistic potency of leukotactin-1 on CC chemokine receptors 1 and 3, *J Biol Chem.* 277 (2002) 14757-14763.
- [13] U. Forssmann, H.J. Magert, K. Adermann, S.E. Escher, W.G. Forssmann, Hemofiltrate CC chemokines with unique biochemical properties: HCC-1/CCL14a and HCC-2/CCL15, *J Leukoc Biol.* 70 (2001) 357-366.
- [14] Y. Li, J. Wu, W. Zhang, N. Zhang, H. Guo, Identification of serum CCL15 in hepatocellular carcinoma, *Br J Cancer.* 2013; 108:99-106.
- [15] R. Richter, R. Bistrrian, S. Escher, W.G. Forssmann, J. Vakili, R. Henschler, N. Spodsberg, A. Frimpong Boateng, U. Forssmann, Quantum proteolytic activation of chemokine CCL15 by neutrophil granulocytes modulates mononuclear cell adhesiveness, *J Immunol.* 175 (2005) 1599-1608.
- [16] J. Hwang, C.W. Kim, K.N. Son, K.Y. Han, K.H. Lee, H.K. Kleinman, J. Ko, D.S. Na, B.S. Kwon, Y.S. Gho et al, Angiogenic activity of human CC chemokine CCL15 in vitro and in vivo, *FEBS Lett.* 570 (2004) 47-51.
- [17] J.S. Lee, I.S. Kim, Leukotactin-1/CCL15 induces cell migration and differentiation of eosinophilic leukemia EoL-1 cells through PKCdelta activation, *Mol Biol Rep.* 37 (2010) 2149-2156.
- [18] M. Loset, S.B. Mundal, M.P. Johnson, M.H. Fenstad, K.A. Freed, I.A. Lian, I.P. Eide, L. Bjorge, J. Blangero, E.K. Moses et al, A transcriptional profile of the decidua in preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol.* 204 (2011) 84e81-27.
- [19] B.E. Pinheiro da Costa, B.B. Lamarca, L. Fournier, F.P. Bisinela, G. Gadonski, C.E. Poli de Figueiredo, J.P. Granger, Maternal plasma and placental cytokine profile in preeclampsia, *J Clin Hypertens (Greenwich).* 8 (2006)
- [20] Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy, *Am J Obstet Gynecol.* 183 (2000) S1-S22.
- [21] E. Atalah, C. Castillo, R. Castro, A. Aldea, Proposal of a new standard for the nutritional assessment of pregnant women, *Rev Med Chil.* 125 (1997) 1429-1436.
- [22] S. Saito, A. Shiozaki, A. Nakashima, M. Sakai, Y. Sasaki, The role of the immune system in preeclampsia, *Mol Aspects Med.* 28 (2007) 192-209.
- [23] D.F. Benyo, A. Smarason, C.W. Redman, C. Sims, K.P. Conrad, Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia, *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2001) 2505-2512.
- [24] K.P. Conrad, T.M. Miles, D.F. Benyo, Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia, *Am J Reprod Immunol.* 40 (1998) 102-111.

- [25] G. Gadonski, B.B. LaMarca, E. Sullivan, W. Bennett, D. Chandler, J.P. Granger, Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6, *Hypertension*. 48 (2006) 711-716.
- [26] B.B. LaMarca, K. Cockrell, E. Sullivan, W. Bennett, J.P. Granger, Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats, *Hypertension*. 46 (2005) 82-86.
- [27] C.W. Redman, G.P. Sacks, I.L. Sargent, Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy, *Am J Obstet Gynecol*. 180 (1999) 499-506.
- [28] O. Nagaeva, L. Jonsson, L. Mincheva-Nilsson, Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential, *Am J Reprod Immunol*. 48 (2002) 9-17.
- [29] M. Muiy-Rivera, S.E. Sanchez, S. Vadachkoria, C. Qiu, V. Bazul, M.A. Williams, Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in plasma is associated with preeclampsia risk in Peruvian women with systemic inflammation, *Am J Hypertens*. 17 (2004) 334-338.
- [30] G.A. Stanczuk, M.J. McCoy, I.V. Hutchinson, E.N. Sibanda, The genetic predisposition to produce high levels of TGF-beta1 impacts on the severity of eclampsia/pre-eclampsia, *Acta Obstet Gynecol Scand*. 86 (2007) 903-908.
- [31] I. Caniggia, S. Grisaru-Gravnosky, M. Kuliszewsky, M. Post, S.J. Lye, Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies, *J Clin Invest*. 103 (1999) 1641-1650.
- [32] A.E. Starr, A. Dufour, J. Maier, C.M. Overall, Biochemical analysis of matrix metalloproteinase activation of chemokines CCL15 and CCL23 and increased glycosaminoglycan binding of CCL16, *J Biol Chem*. 287 (2012) 5848-5860.
- [33] T.M. Mayhew, J. Wijesekara, P.N. Baker, S.S. Ong, Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia, *Placenta*. 25 (2004) 829-833.
- [34] F. Khan, J.J. Belch, M. MacLeod, G. Mires, Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops, *Hypertension*. 46 (2005) 1123-1128.
- [35] J.M. Roberts, C.A. Hubel, Is oxidative stress the link in the two-stage model of preeclampsia?, *Lancet*. 354 (1999) 788-789.
- [36] D. Wickens, M.H. Wilkins, J. Lunec, G. Ball, T.L. Dormandy, Free radical oxidation (peroxidation) products in plasma in normal and abnormal pregnancy, *Ann Clin Biochem*. 18 (1981) 158-162.
- [37] K.J. Erskine, S.A. Iversen, R. Davies, An altered ratio of 18:2 (9,11) to 18:2 (9,12) linoleic acid in plasma phospholipids as a possible predictor of pre-eclampsia, *Lancet*. 1 (1985) 554-555.
- [38] P. Laudanski, G. Raba, P. Kuc, A. Lemancewicz, R. Kisielewski, T. Laudanski, The assessment of the selected biochemical markers in predicting preterm labour, *J Matern Fetal Neonatal Med* (2012).

8. Figure Legends

Figure 1. CCL15 plasmatic concentration from preeclampsia and normotensive control pregnant. Statistical analyses were performed by Student *t* test and presented as mean±SD.

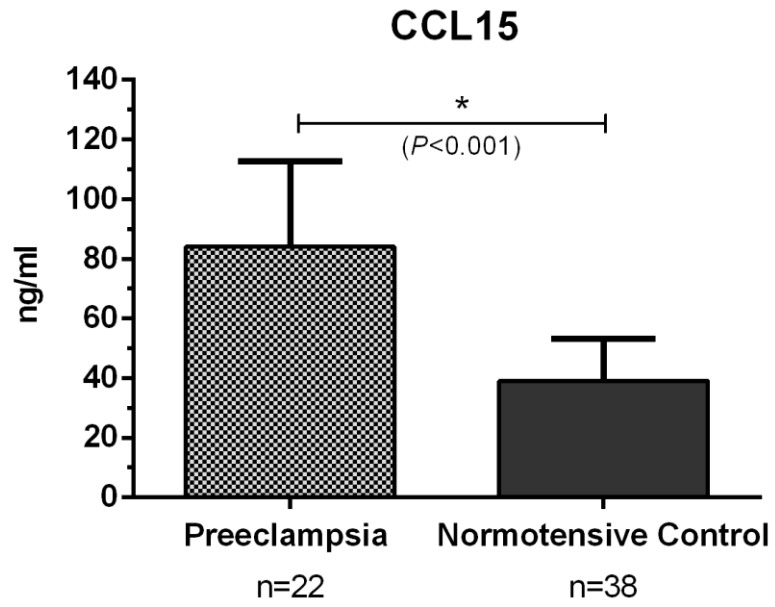


Table 1. Demographic and clinical data.

Variables	Groups		<i>P</i>
	Normotensive (n=38)	Preeclampsia (n=22)	
Maternal Age, y (mean \pm SD)	26.6 \pm 7.4	29.2 \pm 6.8	0.20
Gestational Age, wks (mean \pm SD)	38.5 \pm 2.7*	35.0 \pm 4.6**	<0.01
Primiparity, n (%)	16 (42.1)	9 (40.9)	0.93 [†]
Normal Delivery, n (%)	26 (68.4)	3 (16.7)	<0.01 [†]
Caucasian, n (%)	23 (65.7)	12 (57.1)	0.61 [†]
Systolic Blood Pressure, mmHg (mean \pm SD)	116.5 \pm 10.6	158.1 \pm 21.8	<0.01
Diastolic Blood Pressure, mmHg (mean \pm SD)	76.1 \pm 7.9	101.6 \pm 13.0	<0.01
Maternal Weight, kg (mean \pm SD)	72.2 \pm 11.7	77.0 \pm 13.3	0.16
Body Mass Index (BMI) Category Adjusted to Gestational Age			0.57 [†]
Underweight, n (%)	8 (21.6)	1 (5.0)	
Appropriate weight, n (%)	12 (32.4)	6 (30.0)	
Overweight, n (%)	12 (32.4)	10 (50.0)	
Obese, n (%)	5 (13.5)	3 (15.0)	
Birth Weight, g (mean \pm SD)	3,342.8 \pm 695.9	2,506.9 \pm 1162.2	<0.01
Placental Weight, g (mean \pm SD)	655.8 \pm 179.7	547.9 \pm 267.7	0.07
Apgar Index, 1 st minute (mean \pm SD)	7.6 \pm 2.4	7.6 \pm 2.0	0.89
Apgar Index, 5 st minute (mean \pm SD)	9.2 \pm 1.0	9.1 \pm 0.9	0.59
Birth Weight Percentile Classification			0.04 [†]
Adequate for Gestational Age, n (%)	22 (73.3%)	10 (66.7%)	
Large for Gestational Age, n (%)	8 (26.7%)	2 (13.3%)	
Small for Gestational Age, n (%)	0 (0)	3 (20%)	

Student *t* test; [†]Chi-Square; ^{††}Fisher's exact test.

*six preterm birth; one with IG<34wks; ** ten preterm birth and 7 early onset PE, which means the development of PE early then 34 wks gestation

ARTIGO 7 – Artigo original publicado sob o título: Is there any relationship between ABO/Rh blood group and patients with pre-eclampsia? Autores: **Marta Ribeiro Hentschke**, Fernanda B. Caruso, Letícia G. Paula, Augusto K. Medeiros, Giovani Gadonski, Ivan C. Antonello, Hiten D. Mistry, Carlos E. Poli-de-Figueiredo, Bartira E. Pinheiro da Costa. Dados da Publicação: *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 2014. DOI information: 10.1016/j.preghy.2014.03.003

ARTICLE IN PRESS

Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health xxx (2014) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health

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

Original Article

Is there any relationship between ABO/Rh blood group and patients with pre-eclampsia?

Marta R. Hentschke^{a,*}, Fernanda B. Caruso^a, Letícia G. Paula^a, Augusto K. Medeiros^a, Giovani Gadonski^a, Ivan C. Antonello^a, Hiten D. Mistry^b, Carlos E. Poli-de-Figueiredo^a, Bartira E. Pinheiro da Costa^a

^a Nephrology, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Hospital São Lucas da PUCRS, 2nd Floor, Room 19, Avenida Ipiranga, 6690 – 90610-000 Jardim Botânico, Porto Alegre, Brazil

^b Division of Hypertension, Department of Nephrology, Hypertension, Clinical Pharmacology and clinical Research, University of Bern, Bern, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2014
Received in revised form 1 February 2014
Accepted 10 March 2014
Available online xxx

Keywords:

Hypertension
Pregnancy-induced
ABO blood-group system
Rh blood-group system
Immunological
Prenatal care

ABSTRACT

Objectives: The purpose of the present study was to evaluate the association between pre-eclampsia and blood groups in a group of pregnant women hospitalized in a University Hospital in Porto Alegre, Brazil – Hospital São Lucas (HSL)/PUCRS.

Study design: Our sample consisted of 10,040 pregnant women admitted to the maternity department of HSL between 2005 and 2010. The patients were reviewed retrospectively for inclusion. Medical records of 414 women were diagnosed as preeclampsia/eclampsia and 9611 women were identified to the control group. The patients were divided into two groups: the group with preeclampsia/eclampsia and the control group, and their blood groups were considered. Data were analyzed using SPSS for Windows version 17.0. Categorical data were summarized by counts and percentages, with the statistical significance evaluated by the Chi-square test. The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$.

Main outcome measures: Maternal parameters were compared between control group and pre-eclampsia, respectively. Systolic Blood Pressure (117 ± 19.98 vs. 165 ± 19.99); Diastolic Blood Pressure (73 ± 14.23 vs. 106 ± 14.24) and maternal weight at booking (73 ± 33 vs. 83 ± 33). For all data: mean \pm SD; $p < 0.05$. In relation to blood groups, firstly they were stratified by Rh and ABO phenotypes, separately. After that the groups were put together.

Results: No differences in blood group distribution were observed between controls and pre-eclampsia for any analysis. ($p > 0.05$).

Conclusions: When we adopted stricter criteria for pre-eclampsia and a large sample from the same region we noted that the results did not show any association between blood groups and the development of pre-eclampsia.

© 2014 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Address: Laboratory of Nephrology, Institute for Biomedical Research, Hospital São Lucas da PUCRS, 2nd Floor, Room 19, Avenida Ipiranga, 6690 – 90610-000 Jardim Botânico, Porto Alegre, Brazil. Tel.: +55 (51)33203000x2344.

E-mail addresses: martarh@yahoo.com.br (M.R. Hentschke), fezinhabc@gmail.com (F.B. Caruso), leticiaagpaula@terra.com.br (L.G. Paula), gutokmedeiros@gmail.com (A.K. Medeiros), ggadonski@yahoo.com.br (G. Gadonski), ivan.antonello@pucrs.br (I.C. Antonello), hiten.mistry@kcl.ac.uk (H.D. Mistry), cepolif@pucrs.br (C.E. Poli-de-Figueiredo), bart@pucrs.br (B.E. Pinheiro da Costa).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2014.03.003>

2210-7789/© 2014 International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

The ABO and Rh-blood group systems are genetically determined and remain the most important blood group systems clinically [1,2]. The presence of D antigen confers Rh positive (Rh+), and the absence, Rh negative (Rh-). Furthermore pre-eclampsia is a major contributor to maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide

Please cite this article in press as: Hentschke MR et al. Is there any relationship between ABO/Rh blood group and patients with pre-eclampsia? *Preg Hyper: An Int J Women's Card Health* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2014.03.003>

[3,4]. These conditions are related to a poor extravillous trophoblast invasion and inadequate remodeling of maternal spiral arteries [5]. The disease mechanisms are thought to be multifactorial involving immunological, genetic factors, and may be related to blood clotting cascade [6–9], and associated with thrombosis of the placental vasculature and thrombophilia [10].

Despite several studies have examined the association between ABO/Rh systems and pre-eclampsia no consensus exists in relation to the true association between pre-eclampsia and blood groups or to which specific blood group pre-eclampsia is related to, and what the magnitude of the association is [11]. Dienst et al., was the first to suggest that isoimmunization to the A or B antigen was a cause of pre-eclampsia [12]. This finding was supported by Pike and Dickins who reported a significant excess of group O in pre-eclamptic women [13] which was not found by Clark et al., [14]. Also, the ABO blood group has been associated with several thrombotic disease states; for instance, the blood group non-O increased the risk of venous thrombosis [15,16] and ABO locus O¹ allele reduced the risk of myocardial infarction [17]. Two systematic reviews and meta-analysis of studies analyzing the ABO blood group system in patients with pre-eclampsia were performed in 2008 and 2013. In the first one no significant association was found [11] however in the latter review, the analyses revealed an association between the AB blood group and pre-eclampsia [18], as reported in a large study in 2012 [19]. Also, many authors reported these associations over the last century; eventually they were related only to one allele, or even only to Rhesus group [1,20–24]. Nevertheless, the association is not seen in all studies and there are very few large population-based studies [25,26]. Finally to the best of our knowledge there are no studies presenting how pre-eclampsia and ABO/Rh systems are related in a Brazilian population. Thus the purpose of the present study was to evaluate this association in a group of pregnant women hospitalized University Hospital in Porto Alegre, Brazil – Hospital São Lucas (HSL)/PUCRS.

Methods

Pre-eclampsia was defined as high blood pressure ($\geq 140/90$ mmHg) accompanied by proteinuria ≥ 300 mg/24 h urine, after the twentieth week of pregnancy, and Eclampsia as the presence of seizures, coma or both not related to other changes in the central nervous system during pregnancy or postpartum in women with pre-eclampsia [27]. The maternal blood group was coded as A, B, O, AB and Rh (+/–). Our sample consisted of 10,040 pregnant women admitted to the maternity department of São Lucas Hospital between 2005 and 2010. The patients were reviewed retrospectively for inclusion. Medical records of 414 women were diagnosed as preeclampsia/eclampsia and 9611 women were identified to the control group. The patients were divided into two groups: the group with preeclampsia/eclampsia and the control group and their blood groups were considered. Data were

analyzed using SPSS for Windows version 17.0. Continuous variables are presented as mean \pm standard deviation (SD) and tested by Student's *t*-test. Categorical data were summarized by counts and percentages, with the statistical significance evaluated by the Chi-square test. The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$.

Results

Maternal parameters were compared between control group and pre-eclampsia, respectively, Systolic Blood Pressure (117 ± 19.98 vs. 165 ± 19.99); Diastolic Blood Pressure (73 ± 14.23 vs. 106 ± 14.24); Weight at the end of pregnancy (73.4 ± 33.03 vs. 83.11 ± 33.08). For all data: mean \pm SD; $p < 0.05$. In relation to blood groups, firstly we stratified by Rh (Fig. Aa) and ABO (Fig. Ab) phenotypes. After that we put together both blood systems (Fig. B). No differences in blood group distribution were observed between controls and pre-eclampsia ($p > 0.05$).

Discussion

The current study tried to refute reported correlation between blood groups and pre-eclampsia/eclampsia using a large cohort in a Southern Brazilian population. Previous studies that report a positive relationship between blood groups and pre-eclampsia were conducted in different countries which have different characteristics of the blood phenotypes and used different criteria to characterize pre-eclampsia. Thus this association might be investigated with conflicting results [1,18]. For example, in Iraq, there was a significant decrease in group O type in patients with pre-eclampsia compared to healthy controls [22] and in Colombia patients with Rh(–) were eleven times more likely to develop pre-eclampsia compared with the Rh(+) factor [23]. Spinillo et al., in 1995, in Italy and Hiltunen et al., in 2009, in Finland identified the blood group AB as a risk factor of severe pre-eclampsia [24,28]. Also, Sezik et al., in 2002, in Turkey, showed that almost half of the patients with the blood group O Rh(–) had HELLP syndrome in a severe pre-eclampsia population [1].

In discussing some of the biometric problems involved in establishing associations between blood groups and diseases, Dr J.A. Fraser Roberts, in 1955 stresses the large number of cases required and the importance of adopting rigid and precisely defined criteria [29]. Early studies in the fifties, who tried to demonstrate such a comparison, did not use the criterion of pre-eclampsia but considered pregnancy toxæmic or non-toxæmic, and the diagnosis of toxæmia was made by the presence of the least two of the following after 28th week of pregnancy: blood pressure $\geq 140/90$ mmHg; clinical edema; albuminuria not due to infection.

Then, when we adopt stricter criteria for pre-eclampsia and a large sample from the same region we note that the results showed no relationship between blood groups and the development of pre-eclampsia. Probably the association found in others studies may be related to another risk factor involved in physiopathology of the disease as

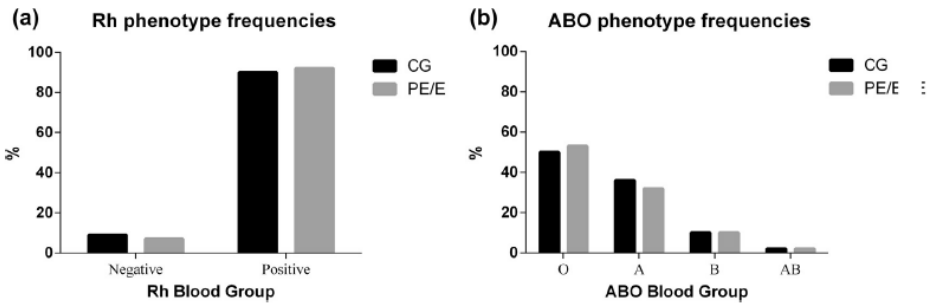


Fig. A. (a) Rh group phenotype frequencies, Chi-Square: 0,169. CG: Control Group, PE/E = Pre-eclampsia/Eclampsia. (b) ABO group phenotype frequencies Pearson Chi-Square: 0,479. CG: Control Group, PE/E = Pre-eclampsia/Eclampsia.

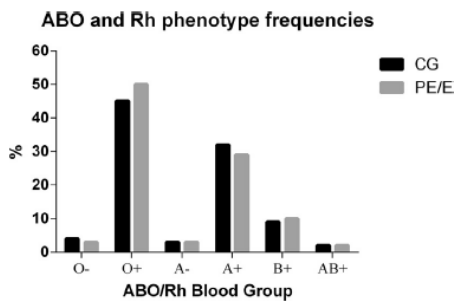


Fig. B. ABO and Rh group frequencies. Pearson Chi-Square: 0,569. CG: Control Group, PE/E = Pre-eclampsia/Eclampsia. Type B Negative (B-) and AB Negative (AB-) have less than 1% of women in each groups. B- (CG: 83; 0,94% vs PE: 2; 0,48%) and AB- (CG: 24; 0,27% and no PE).

obesity, cardiovascular, hypertensive disorders and/or also vascular injuries.

Conflict of Interest statement

All authors disclose no financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence their work.

Ethics Statement

The project was approved by the Hospital São Lucas Ethics committee.

Funding

The authors have no support or funding to report.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

This work received Grants from CNPq, CAPES Brazil. CEPF is grateful to the National Counsel of Technological and Scientific Development of Brazil (CNPq) and MRH is grateful to CAPES.

References

- [1] Sezik M, Toyran H, Yapa EG. Distribution of ABO and Rh blood groups in patients with HELLP syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2002;267:33–6.
- [2] Omatade OO, Adeyemo AA, Kaiode CM, Falade SL, Ikpeke S. Gene frequencies of ABO and Rh (D) blood group alleles in a healthy infant population in Ibadan, Nigeria. *West Afr J Med* 1999;18:294–7.
- [3] Khan KS, Wojdyla D, Say L, Gülmezoglu AM, Van Look PF. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. *Lancet* 2006;367:1066–74.
- [4] Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo Jr JL, et al. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC-7 report. *JAMA* 2003;289:2560–72.
- [5] Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1972;1:177–91.
- [6] de Vries JI, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, van Geijn HP. Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;104:1248–54.
- [7] Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BM, et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1042–8.
- [8] Clark DA. Cytokines and pregnancy. *Curr Opin Immunol* 1989;1:1148–52.
- [9] Kupfermink MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, et al. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med* 1999;340:9–13.
- [10] Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol* 2006;132:171–96.
- [11] Clark P, Wu O. ABO(H) blood groups and pre-eclampsia. A systematic review and meta-analysis. *Thromb Haemostasis* 2008;100:469–74.
- [12] Dienst A. *Zentralbl Gynäkol.* 29 (1905) 353 (as cited by Ottenberg R. The etiology of eclampsia. Historical and critical notes. *JAMA* 1923;81:295–7.
- [13] Pike LA, Dickins AM. ABO blood groups and toxæmia of pregnancy. *Br Med J* 1954;2:321–3.
- [14] Clark P, Walker ID, Govan L, Wu O, Greer IA. The GOAL study: a prospective examination of the impact of factor V Leiden and ABO(H) blood groups on haemorrhagic and thrombotic pregnancy outcomes. *Br J Haematol* 2008;140:236–40.
- [15] Jick H, Slone D, Westerholm B, Inman WH, Vessey MP, Shapiro S, et al. Venous thromboembolic disease and ABO blood type. A cooperative study. *Lancet* 1969;1:539–42.

Please cite this article in press as: Hentschke MR et al. Is there any relationship between ABO/Rh blood group and patients with pre-eclampsia? *Preg Hyper: An Int J Women's Card Health* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2014.03.003>

ARTICLE IN PRESS

4

M.R. Hentschke et al./Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health xxx (2014) xxx–xxx

- [16] Morelli VM, De Visser MC, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. ABO blood group genotypes and the risk of venous thrombosis: effect of factor V Leiden. *J Thromb Haemostasis* 2005;3:183–5.
- [17] von Beckerath N, Koch W, Mehilli J, Gorchakova O, Braun S, Schömig A, et al. ABO locus O1 allele and risk of myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004;15:61–7.
- [18] Alpoim PN, de Barros Pinheiro M, Junqueira DR, Freitas LG, das Gracas Carvalho M, Fernandes AP, et al. Preeclampsia and ABO blood groups: a systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2013;40:2253–61.
- [19] Lee BK, Zhang Z, Wikman A, Lindqvist PG, Reilly M. ABO and RhD blood groups and gestational hypertensive disorders: a population-based cohort study. *BJOG* 2012;119:1232–7.
- [20] May D. Letter: maternal blood group A and pre-eclampsia. *Br Med J* 1973;4:738.
- [21] Hoff C, Bixler C. Maternofetal ABO antigenic dissimilarity and pre-eclampsia. *Lancet* 1984;1:729–30.
- [22] Amin N, Tahir S, Abadi N, Kubba K. Association of blood groups with preeclamptic toxemia. *Med Sci Res* 1989;17:861–2.
- [23] Olaechea A, Julián H. Factor RH(–) en preeclampsia. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 1991;42:51–3.
- [24] Hiltunen LM, Laivuori H, Rautanen A, Kaaja R, Kere J, Krusius T, et al. Blood group AB and factor V Leiden as risk factors for pre-eclampsia: a population-based nested case-control study. *Thromb Res* 2009;124:167–73.
- [25] Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Factor V Leiden, pregnancy complications and adverse outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *QJM* 2006;99:289–98.
- [26] Morrison ER, Miedzybrodzka ZH, Campbell DM, Haites NE, Wilson BJ, Watson MS, et al. Prothrombotic genotypes are not associated with pre-eclampsia and gestational hypertension: results from a large population-based study and systematic review. *Thromb Haemostasis* 2002;87:779–85.
- [27] 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.
- [28] Spinillo A, Capuzzo E, Baltaro F, Piazzi G, Iasci A. Case-control study of maternal blood group and severe pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* 1995;9:623–5.
- [29] Roberts JA. Discussion on the ABO blood group and disease. *Proc R Soc Med* 1955;48:143–4.

Please cite this article in press as: Hentschke MR et al. Is there any relationship between ABO/Rh blood group and patients with pre-eclampsia? *Preg Hyper: An Int J Women's Card Health* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.preghy.2014.03.003>

ARTIGO 8- Artigo em processo de submissão sob o título: Níveis aumentados de Endocan-1 em plasma materno de pacientes com pré-eclâmpsia no terceiro trimestre gestacional: relação com prematuridade e baixo peso ao nascer. Autores: **Marta R. Hentschke**, Luiza S. Lucas, Hiten D. Mistry, Carlos E. Poli de Figueiredo, Bartira E. Pinheiro da Costa. (A submissão será realizada após a avaliação de todos os autores e tradução para a língua inglesa).

Níveis aumentados de Endocan-1 em plasma materno de pacientes com Pré-eclâmpsia no terceiro trimestre gestacional: relação com prematuridade e baixo peso ao nascer

Increased levels of Endocan-1 in maternal plasma of patients with pre-eclampsia in the third trimester of pregnancy: relation to prematurity and low birth weight

Marta Ribeiro Hentschke¹, Luiza Silveira Lucas¹, Hiten D. Mistry², Bartira E. Pinheiro da Costa¹, Carlos E. Poli-de-Figueiredo¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, ² King's College London, London, United Kingdom

Resumo

Introdução: Endocan-1 é uma proteoglicana solúvel expressa especificamente nas células endoteliais, que tem se mostrado como um possível marcador e preditor de diversas patologias associadas ao endotélio vascular. Na pré-eclâmpsia, a remodelação deficiente das artérias espiraladas uterinas ocasiona a redução da perfusão e a alta resistência utero-placentária. Como consequência, há um ambiente de hipóxia, com liberação de mediadores inflamatórios e endoteliais que, ao atingirem a circulação materna, participam ativamente na disfunção generalizada do endotélio vascular materno. Assim, temos como hipótese de que níveis de Endocan-1 poderiam estar aumentados em plasma materno e placenta de pacientes com pré-eclâmpsia.

Objetivo: Analisar os níveis de molécula Endocan-1 no plasma materno, plasma fetal e no tecido placentário de pacientes com e sem pré-eclâmpsia; correlacionar os valores de Endocan-1 com parâmetros clínicos maternos e fetais.

Métodos: Estudo observacional, caso-controle, realizado no Hospital São Lucas/PUCRS, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. A amostra foi composta por 117 sendo 50 gestantes normais e 67 no grupo com pré-eclâmpsia, após consentimento das pacientes. Realizou-se coleta de sangue materno no período pré parto, e, logo após o parto, de sangue do cordão umbilical e tecido placentário, que foram armazenadas a -80°C, até a análise. Após processamento das amostras, os níveis de Endocan-1 foram dosados utilizando o Sistema MagPlexTH-C - ensaio de microesferas, e os dados analisados no programa xPONENT 2.4. Os ensaios foram conduzidos de acordo com o protocolo do fabricante. Os testes estatísticos foram realizados usando o programa SPSS 21.0, para Windows. Os dados relacionados à dosagem do Endocan-1, foram analisados a partir da transformação logarítmica por Análise de Covariância (ANCOVA) ajustado para IMC, IG e idade materna, sendo apresentados como média geométrica. Para estimar a diferença proporcional das citocinas entre os grupos, calculou-se a razão das médias e o intervalo de confiança de 95%. A magnitude da diferença foi estimada pelo tamanho de efeito de Cohen. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

Resultados: Os níveis de Endocan-1 no plasma materno em pacientes com SPE foram 49 % maior em relação às gestantes controles, com magnitude estimada pelo tamanho de efeito de Cohen (d) em 0,84 (magnitude moderada). Foi visto que quanto maiores os níveis de Endocan-1 em plasma materno e fetal na amostra geral, menores os pesos do recém-nascido ($r = -0,42$, $p < 0,001$; $r = -0,281$, $p = 0,004$, respectivamente) e da placenta ($r = -0,34$, $p = 0,001$; $r = -0,289$, $p = 0,003$, respectivamente) e menor a

idade gestacional materna no nascimento ($r=-0,382$, $p<0,001$; $r=-0,260$, $p=0,008$, respectivamente). Já em relação aos níveis pressóricos maternos, observou-se que à medida que os níveis de Endocan-1 aumentam no plasma materno, existe uma tendência ao aumento da pressão arterial sistólica ($r=0,40$, $p<0,001$) e da pressão arterial diastólica ($r=0,462$, $p<0,001$), no final da gestação.

Conclusões: A magnitude moderada observada na diferença entre os grupos demonstrou níveis aumentados de Endocan-1 no plasma materno de gestantes com pré-eclâmpsia, não sendo visto diferença estatística para as demais amostras. Este estudo sugere a Endocan-1 como um concorrente a biomarcador de pré-eclâmpsia juntamente com outras moléculas envolvidas com lesões endoteliais. Ainda, as correlações negativas encontradas entre as concentrações de Endocan-1 e dados clínicos fetais, sugerem essa molécula envolvida com a gravidade da doença.

Palavras chaves: ESM-1, proteoglicana, doença hipertensiva gestacional, endotélio

Introdução

A Síndrome de Pré-Eclâmpsia (SPE) parece ter início na placentação, quando um comprometimento na remodelação vascular das artérias espiraladas uterinas leva a uma redução da perfusão e a uma alta resistência útero-placentária, gerando um ambiente de hipóxia para o tecido placentário e fetal. A condição de hipóxia da placenta resulta na liberação de citocinas que, ao serem expostas à circulação materna, são capazes de alterar a resposta vascular levando a uma disfunção generalizada do endotélio vascular materno (1-4). Acredita-se que citocinas inflamatórias como Interleucina (IL)-6 e TNF α podem ser importantes mediadores entre a isquemia e a disfunção placentária/renal (5, 6), podendo fazer parte da origem das alterações clínicas de pacientes com SPE (7). Sabe-se que alterações vasculares maternas têm uma consequência direta no desenvolvimento e crescimento placentário e fetal, e por isso a importância de se avaliar a resposta hipoxêmica não somente materna, mas também fetal e placentária.

Endocan-1 é uma proteoglicana solúvel expressa especificamente nas células endoteliais descrita inicialmente em tecido vascular pulmonar (8). Essa molécula tem sido estudada tanto em modelos experimentais (9, 10) quanto *in vivo*, e tem se mostrado como um possível marcador e preditor de diversas patologias associadas ao endotélio vascular, por estar associada à sua ativação e ter um papel funcional nas desordens patológicas dependentes do endotélio(11).

Da mesma forma, diversos estudos têm investigado a relação do Endocan-1 com outras citocinas. Um exemplo seria sua possível regulação pelo TNF α e IL-1 β , e o possível efeito inibitório decorrente do IFN γ sobre a expressão gênica de Endocan-1 quando essa induzida por TNF α (8, 11). Sugere-se assim, que o gene de Endocan-1 possa apresentar funções não-usuais durante a reação inflamatória, podendo estar sob o controle de várias citocinas (8).

A sua principal aplicabilidade tem sido vista em estudos relacionados a tumores de diversos tecidos, como câncer de pulmão(12-14), carcinoma hepático (15-20) e câncer colorretal (21-24), entre outros. Outra linha de estudo que investiga a Endocan-1 em condições inflamatórias, demonstrou aumento dos níveis séricos no choque séptico (11) e na sepse (12, 25-28); assim como, em associação com hipertensão arterial sistêmica e obesidade (29, 30). Dessa forma, a Endocan-1 parece ter um papel chave na progressão tumoral assim como na regulação de processo inflamatórios (26).

Em relação à associação de Endocan-1 com a SPE, para o nosso conhecimento, e após revisão em base de dados, não há na literatura artigos completos que tenham relacionado níveis de Endocan-1 com a SPE ou com outra doença hipertensiva da gestação. No entanto, em 2013, dois artigos resumidos foram publicados em anais de congressos apresentando essa possível associação, ambos tendo como hipótese de que essa molécula estaria elevada em pacientes com SPE (31, 32).

Assim, o objetivo deste estudo foi analisar os níveis de molécula Endocan-1 no plasma materno, plasma fetal, e no tecido placentário de pacientes com SPE e comparar com gestantes normotensas (GN), no terceiro trimestre da gestação, e correlacionar os valores de Endocan-1 com parâmetros clínicos maternos e fetais.

Metodologia

Estudo observacional que incluiu gestantes com 20 ou mais semanas de gravidez, de feto único, com ou sem diagnóstico de SPE, que estiveram hospitalizadas no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL/PUCRS), Porto Alegre, Brasil, de 2010 a 2013, em acompanhamento com corpo assistencial obstétrico. Todas as pacientes foram devidamente informadas sobre a pesquisa e consentiram em participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A pesquisa foi aprovada pela Comissão Científica e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, Ofício nº 0527/07-CEP. A SPE foi definida segundo *National High Blood Pressure Education Program* (33) e segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão de 2010 (34), que têm como critério o aumento de níveis tensionais $\geq 140/90$ mmHg, e proteinúria patológica $\geq 300\text{mg}/24\text{h}$ ou relação proteinúria/creatininúria $\geq 0,3$, em gestantes com vinte ou mais semanas de gravidez.

Foram computados os dados de identificação materna, exame físico materno, história médica pregressa, história familiar materna, exames laboratoriais, dados do parto e do recém-nascido. Foram excluídas do estudo gestantes com diagnóstico prévio de nefropatia, hepatopatia, infecções ativas, gestação múltipla e/ou falta de informações no banco de dados, ou ainda, normotensas com $\geq 1+$ de proteinúria no exame qualitativo de urina.

Coleta de Amostras

A coleta sangue materno de pacientes com SPE foi realizada após o diagnóstico e a internação hospitalar, já as pacientes gestantes controles foram coletadas quando acolhidas na sala de admissão e pré-parto do centro obstétrico da HSL/PUCRS. O tempo entre a coleta do sangue materno e o parto sofreu uma média de variação de um dia, sendo que 89 pacientes foram coletadas no mesmo dia do parto. O total de pacientes coletadas foram 117, 50 com SPE e 67 GN, sendo que 74,35% (87 pacientes) foi composta por plasma materno, plasma fetal e placenta das mesmas pacientes.

Antes do parto, foram coletados em média 4 mL de sangue materno em tubo contendo EDTA de cada paciente. Logo após o parto, foi puncionado, em média, 4 mL de sangue da veia do cordão umbilical. As amostras foram processadas no Laboratório de Nefrologia/HSL/PUCRS, sendo centrifugadas a 2.000g por 10 minutos. O plasma foi estocado em microtubo de centrifugação de 0,6 ml primeiramente a -20°C , e após, a -80°C , até o momento da análise. A coleta de placenta foi realizada imediatamente após o parto. Seis cubos de aproximadamente 1 cm^3 do centro de um cotilédone central localizado na metade da distância entre o cordão umbilical e a extremidade do órgão, foram biopsiados. Este material foi armazenado em microtubos de centrifugação nas mesmas condições dos plasmas, até o momento da análise.

A medida da pressão arterial foi realizada conforme as recomendações específicas para gestantes padronizadas no centro obstétrico e alojamento conjunto do HSL/PUCRS, que recomenda a medida sentada e em decúbito lateral esquerdo.

Os exames laboratoriais foram dosados de acordo com os padrões estabelecidos pelo HSL/PUCRS. Exames para diagnóstico de SPE e exames de gravidade foram quantificados apenas nas gestantes com SPE.

Preparação das amostras

As amostras foram preparadas conforme orientações do fornecedor de kit Milliplex para ensaio MagPlexTH-C. As amostras de plasma (materno e fetal) foram descongeladas, passadas em *vórtex*, e centrifugadas. O preparo da placenta foi realizado a partir das amostras de placentas armazenadas a -80°C . Fragmentos congelados de aproximadamente 0,3g de tecido foram pesados em balança semi-analítica com precisão de 0,01g (Mettler Toledo, Suíça). Adicionou-se a cada tubo o coquetel de inibidor de protease (Millipore Corporation, Catalogo #20-201) diluído em RIPA Lysis Buffer 10X, na concentração de 3 ml/g de tecido. Em sequência, foi realizada a maceração mecânica do tecido placentário seguida de sonicação em sonicador de banho (Aquasonic, Cortland, New York, USA) por 10 minutos, em banho gelado. Realizada a centrifugação do material - 10.000 rpm por 10 minutos, a 4°C (Sanyo, London, Grã-Bretanha), 200 μl do sobrenadante foi alíquotado em microtubo de centrifugação de 0,6ml, armazenados a -20°C , até posterior análise. A concentração de proteínas da solução foi mensurada usando Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen Life Technologies) utilizando microtubos específicos de análise (QubitAssay tubes, Eugene, Oregon, USA).

Para o cálculo de concentração de moléculas em estudo, foi utilizado o Sistema MagPlexTH-C - ensaio de microesferas (MAGPIX® System, Luminex, Austin, Texas, USA) e o Software Exponent (xPONENT 4.2), Kitmilliplex HCVD1MAG-67K-02 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados usando o programa *Statistical Package for Social Sciences* versão 19 (SPSS 19.0) para *Windows*. As variáveis quantitativas foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) conforme apropriado, sendo o teste *t* de Student ou U de Mann-Whitney utilizados dependendo da distribuição dos dados. Para as variáveis categóricas, utilizou-se porcentagem e aplicou-se o teste qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. As correlações entre os parâmetros foram testados com coeficiente de correlação de Pearson. Os dados relacionados à dosagem do Endocan-1, foram analisados a partir da transformação logarítmica por Análise de Covariância (ANCOVA) ajustado para IMC, IG e idade materna, sendo apresentados como média geométrica. Para estimar a diferença proporcional das citocinas entre os grupos, calculou-se a razão das médias e o intervalo de confiança de 95%. A magnitude da diferença foi estimada pelo tamanho de efeito de Cohen. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$.

Resultados

Sujeitos do estudo:

As características clínicas, demográficas, dados de exame físico e dados do parto estão apresentadas na Tabela 1. Os dados de exame físico são relativos ao dia da admissão no pré-parto da paciente no HSL/PUCRS.

Tabela 1: Dados de anamnese e exame físico materno e fetal, exames laboratoriais de gestantes normais e com síndrome de pré-eclâmpsia.

Parâmetros	GN (67)	SPE (50)	P
Idade materna, anos	26 \pm 5	26 \pm 6,8	0,10
Raça branca, n(%)	34 (52)	31 (65)	0,25
Primíparas, n (%)	28 (42)	25 (51)	0,35
Hipertensão crônica, n (%)	0 (0)	12 (24,5)	-
SPE prévia, n (%)	1 (1,5)	12 (24,0)	-
IMC, kg/m ² (peso final da gestação)	30,4 \pm 5,8	32,3 \pm 5,4	0,081
PAS, mmHg	118,7 \pm 10,2	156,7 \pm 17,3	<0,001*
PAD, mmHg	74,7 \pm 7,8	100,8 \pm 13,6	<0,001*
IG no parto, semanas	39,6 \pm 1,4	36,7 \pm 3,7	<0,001*
Parto cesáreo	22 (32,8)	38 (76,0)	<0,001*
Índice de Apgar primeiro minuto, n	8,6 \pm 0,8	7,54 \pm 1,81	<0,001*
Índice de Apgar quinto minuto, n	9,4 \pm 0,6	8,72 \pm 1,21	<0,001*
Peso Fetal, Kg	3393 \pm 458	2789 \pm 904	<0,001*
Peso Placenta, Kg	649 \pm 142	590 \pm 179	0,063
Hematócrito,%	35,2 \pm 2,5	36,22 \pm 3,51	0,14
Hemoglobina, g/dL	11,6 \pm 0,9	12,31 \pm 1,28	0,004*
Plaquetas, mm ³ (mil)		211,00 \pm 59,05	-
Creatinina, mg/dL		0,81 \pm 0,21	-
Acido úrico, mg/dL		5,12 \pm 1,5	-
Proteinúria, razão P/C		0,67 [0,42;2,2]	-
Glicemia de jejum, mg/dL	75,2 \pm 9,3	78,9 \pm 13,7	0,26

HAS: Hipertensão arterial sistêmica. SPE: Síndrome de Pré-eclâmpsia. IG: Idade gestacional. GN: Gestante normal. IMC: Índice de Massa Corporal. PAS: Pressão arterial sistólica. PAD: Pressão

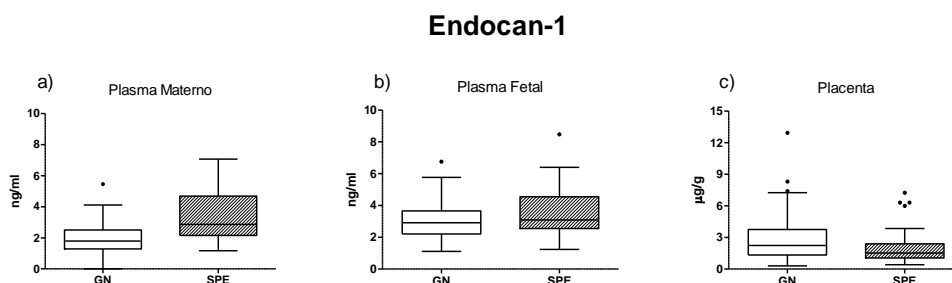
arterial diastólica. Os dados estão apresentados em média±DP (teste *t* de student), ou números absolutos e porcentagem (teste exato de Fisher), como apropriado.* $P < 0,05$ entre GN e SPE.

Análises da molécula em Estudo

Os níveis de Endocan-1 no plasma materno em pacientes com SPE foram 49 % maior em relação às gestantes controles, com magnitude estimada pelo tamanho de efeito de Cohen (d), aplicado nas medidas em log obtidos no modelo de ANCOVA, em 0,84 (magnitude moderada). Não foi observada diferença estatística no plasma fetal nem na placenta. Foi visto que quanto maiores os níveis de Endocan-1 em plasma materno e fetal na amostra geral, menores os pesos do recém-nascido ($r = -0,42$, $p < 0,001$; $r = -0,281$, $p = 0,004$, respectivamente) e da placenta ($r = -0,34$, $p = 0,001$; $r = -0,289$, $p = 0,003$, respectivamente), e menor a idade gestacional materna no nascimento ($r = -0,382$, $p < 0,001$; $r = -0,260$, $p = 0,008$, respectivamente). Já em relação aos níveis pressóricos maternos, observou-se que à medida que os níveis de Endocan-1 aumentam no plasma materno, existe uma tendência ao aumento da pressão arterial sistólica ($r = 0,40$, $p < 0,001$) e da pressão arterial diastólica ($r = 0,462$, $p < 0,001$) no final da gestação. As associações em plasma materno também foram vistas quando se analisou em separado o grupo SPE, como IG no parto ($r = -0,411$, $p = 0,004$); peso do RN ($r = -0,376$, $p = 0,009$), e peso da placenta ($r = -0,333$, $p = 0,026$). Optou-se ainda por correlacionar o Endocan-1 entre as amostras: Plasma materno vs. plasma fetal ($r = 0,258$, $p = 0,015$)

A Figura 1 apresenta o gráfico *boxplot* dos valores encontrados em cada tecido, sem a transformação logarítmica, para visualização dos valores encontrados no ensaio em ng/ml e µg/g. Não foi aplicado teste estatístico nesse momento, visto as variáveis serem assimétricas e termos optado pela transformação logarítmica para trabalhar com testes simétricos.

Figura 1 – Gráficos de *boxplot* representando, em escala linear, os valores de Endocan-1 nas gestantes normotensas *versus* gestantes com síndrome de pré-eclâmpsia, no plasma materno (a), no plasma fetal (b) e na placenta (c).



Endocan-1: Molécula Endotelial específica de célula GN: Gestante normal. SPE: Síndrome de pré-eclâmpsia.

Após a análise de pacientes com SPE em relação ao controle, optou-se por refazer a análise excluindo o grupo pacientes com hipertensão crônica prévia e síndrome HELLP, novamente, os valores de Endocan-1 apresentaram-se aumentados em pacientes com PE, com magnitude nesse caso de 0,94, também moderada. Optou-se ainda por subdividir o grupo SPE em relação à IG (34 semanas e 37 semanas), níveis de pressão arterial sistólica (ponto de corte em 160 mmHg) e de proteinúria (ponto de corte em 0,5 e em 2,0) e os comparar com gestantes controles. Encontramos aumento significativo de Endocan-1 em plasma materno para todas as estratificações ($p < 0,001$).

Discussão

Nossa amostra apresentou-se de acordo com a literatura, com aumento significativo dos níveis pressóricos e parto cesáreo, associada à diminuição da IG, do Índice de Apgar e do peso do recém-nascido nas pacientes com PE. Obtivemos 51% de primigestas em SPE, e 41,7% com graus variados de obesidade, não havendo diferença entre os grupos.

Ao comparar o Endocan-1 entre pacientes com SPE e GN nos três conjuntos celulares, observou-se no plasma materno e no plasma fetal uma tendência a níveis aumentados de Endocan-1 em pacientes com SPE, o que não foi observado na placenta. Lesões celulares que ocorrem desde o início da gestação em na matriz extracelular e na parede dos vasos da decídua materna a fim de criar um ambiente propício para a implantação do conceito. O aumento significativo do Endocan-1 no plasma materno pode ser devido a uma resposta exacerbada a esse processo fisiológico do desenvolvimento, em conjunto com o aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias já observadas em estudos prévios. Ainda, lesões isquêmicas placentárias decorrentes de uma má remodelação dos vasos deciduais, liberam na circulação materna mediadores moleculares, gerando um desequilíbrio em vasoconstritores e vasodilatadores, culminando na síndrome da pré-eclâmpsia, com resposta sistêmica.

Ainda, as correlações negativas encontradas entre as concentrações de Endocan-1 e dados clínicos fetais, sugerem essa molécula envolvida com a gravidade da doença.

Estudos têm mostrado que os componentes da cascata inflamatória parecem estar relacionados à SPE. Se sabe que o sinciciotrofoblasto se auto renova deixando detritos apoptóticos na circulação materna o que leva uma reação inflamatória normal durante o crescimento placentário. As diferenças de resposta inflamatória entre uma gestação normal e uma com SPE estão associadas, portanto, à intensidade e não a qualidade.

Para o nosso conhecimento, não há na literatura artigos completos que tenham relacionado níveis de Endocan com a SPE. No entanto, em 2013, dois artigos resumidos foram publicados em anais de congressos apresentando a possível associação de níveis protéicos e expressão de RNAm de Endocan com gestantes com PE, ambos tendo como hipótese de que essa molécula estaria elevada na pré-eclâmpsia (31, 32). Joost e colaboradores apresentaram dados da Endocan-1 como um marcador de prognóstico para o desenvolvimento de PE grave precoce (31). Nesse estudo, a amostra foi composta de 41 gestantes, sendo 23 saudáveis, 11 com PE grave de início precoce e 7 com PE grave de início tardio. O plasma das gestantes foi coletado em intervalos regulares entre a 12^a semana gestacional e o parto, sendo o Endocan-1 mensurado através da técnica de ELISA. Os resultados demonstraram que entre a 12^a e a 16^a semanas de gestação a concentração de Endocan-1 foi reduzida em pacientes que mais tarde desenvolveriam PE grave precoce. Por outro lado, no período entre a 24^a semana gestacional e o parto, as concentrações de Endocan-1 aumentaram significativamente tanto nas pacientes com PE grave precoce e quanto na PE grave tardia em relação às gestantes saudáveis. Com base nesses achados, os autores sugeriram que o Endocan-1 seria um marcador de prognóstico para o desenvolvimento de PE grave precoce tão cedo quanto 12 a 16 semanas de gestação.

Seguindo a mesma linha, Cross e colaboradores deram ao Endocan-1 um enfoque de lesão endotelial, em pacientes com PE, associando ainda com CIUR. Esse estudo contemplou 211 mulheres, subdivididas em seis grupos de acordo com gravidade e precocidade da PE. Endocan-1 e o fator de crescimento hepático (HGF) foram mensurados por ELISA e validados por *Western blotting*. A expressão e localização de RNAm de Endocan-1 na placenta foram estudadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real e imuno-histoquímica. Como resultado, foi visto que os níveis de Endocan-1 no soro materno eram regulados pela idade gestacional, com um decréscimo à medida que se se aproximava do termo. Verificou-se aumento de concentrações séricas de Endocan-1 em SPE grave precoce que variaram independente dos níveis circulatórios maternos de HGF, o que os autores sugeriram refletir um grau avançado de ativação endotelial e injúria em idade gestacional precoce. O RNAm do Endocan-1 foi detectado nas vilosidades trofoblásticas e teve intensa imunomarcagem em células endoteliais, citotrofoblasto e células deciduais. Houve um aumento da expressão do Endocan-1 em áreas peri-infarto das placentas com CIUR idiopático (independente de PE), o que sugere que o Endocan possa ter um papel na fisiopatologia da injúria trofoblástica no CIUR (32).

Dessa forma, o nosso estudo contribuiu com os achados anteriores ao demonstrar aumento de Endocan-1 no terceiro trimestre de gestação, em gestantes com graus variadas de SPE e ainda mostrou sua relação com prematuridade e baixo peso ao nascer.

Conclusão

Este estudo avaliou a presença da molécula de Endocan-1 em plasma materno, plasma fetal e tecido placentário. Ainda, comparou os níveis dessa citocina entre pacientes com SPE e GN, como proposto. Estratificações foram feitas no grupo de SPE para melhor compreensão das possíveis influências que variáveis como IG, níveis pressóricos e proteinúria poderiam ter nas comparações e correlações entre os grupos e as citocinas. O fato de a Endocan-1 ter se mostrado significativamente aumentada em plasma materno para todas as estratificações do grupo SPE, com uma magnitude considerável, faz dela um grande concorrente a biomarcador para pré-eclâmpsia devendo receber enfoque em futuros estudos.

Agradecimento

Estudo realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

1. LaMarca BD, Gilbert J, Granger JP. Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Hypertension*. 2008 Apr;51(4):982-8.
2. Lamarca B. The role of immune activation in contributing to vascular dysfunction and the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Minerva Ginecol*. 2010 Apr;62(2):105-20.
3. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Feb;294(2):H541-50.
4. Laresgoiti-Servitje E. A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia. *J Leukoc Biol*. 2013 Apr 30.
5. Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, Berg G, Nieminen K, Sharma S, et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol*. 2006 Jun;70(1-2):83-91.
6. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995 Jan;102(1):20-5.
7. Freitas F. *Rotinas em Obstetrícia*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
8. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem*. 1996 Aug 23;271(34):20458-64.
9. Depontieu F, de Freitas Caires N, Gourcerol D, Giordano J, Grigoriu B, Delehedde M, et al. Development of monoclonal antibodies and ELISA specific for the mouse vascular endocan. *J Immunol Methods*. 2012 Apr 30;378(1-2):88-94.
10. Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, Senechal S, Janin A, Tscopoulos A, et al. Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):6084-9.
11. Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, Oudin S, Kervoaze G, Bertheau P, et al. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res*. 2000 Sep-Oct;37(5):417-25.
12. De Freitas Caires N, Legendre B, Parmentier E, Scherpereel A, Tscopoulos A, Mathieu D, et al. Identification of a 14 kDa endocan fragment generated by cathepsin G, a novel circulating biomarker in patients with sepsis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. [Research Support, Non-U.S. Gov't/Validation Studies]. 2013 May 5;78-79:45-51.
13. Grigoriu BD, Depontieu F, Scherpereel A, Gourcerol D, Devos P, Ouatas T, et al. Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Aug 1;12(15):4575-82.
14. Perey L, Benhattar J, Peters R, Jaunin P, Leyvraz S. High tumour contamination of leukaphereses in patients with small cell carcinoma of the lung: a comparison of immunocytochemistry and RT-PCR. *Br J Cancer*. 2001 Nov 30;85(11):1713-21.
15. Ziol M, Sutton A, Calderaro J, Barget N, Aout M, Leroy V, et al. ESM-1 expression in stromal cells is predictive of recurrence after radiofrequency ablation in early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2013 Dec;59(6):1264-70.
16. Nault JC, Guyot E, Laguillier C, Chevret S, Ganne-Carrie N, N'Kontchou G, et al. Serum proteoglycans as prognostic biomarkers of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013 Aug;22(8):1343-52.
17. Kang YH, Ji NY, Lee CI, Lee HG, Kim JW, Yeom YI, et al. ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. *Amino Acids*. 2011 Mar;40(3):1003-13.
18. Chen LY, Liu X, Wang SL, Qin CY. Over-expression of the Endocan gene in endothelial cells from hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumour invasion. *J Int Med Res*. 2010 Mar-Apr;38(2):498-510.
19. Xiang X, Zhao WB, Wang X. [Expression of ESM-1 in hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumor invasion]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2009 Sep;17(9):661-4.
20. Huang GW, Tao YM, Ding X. Endocan expression correlated with poor survival in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2009 Feb;54(2):389-94.

21. Kim JH, Park MY, Kim CN, Kim KH, Kang HB, Kim KD, et al. Expression of endothelial cell-specific molecule-1 regulated by hypoxia inducible factor-1alpha in human colon carcinoma: impact of ESM-1 on prognosis and its correlation with clinicopathological features. *Oncol Rep.* 2012 Nov;28(5):1701-8.
22. Kang YH, Ji NY, Han SR, Lee CI, Kim JW, Yeom YI, et al. ESM-1 regulates cell growth and metastatic process through activation of NF-kappaB in colorectal cancer. *Cell Signal.* 2012 Oct;24(10):1940-9.
23. Ji NY, Kim YH, Jang YJ, Kang YH, Lee CI, Kim JW, et al. Identification of endothelial cell-specific molecule-1 as a potential serum marker for colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2010 Oct;101(10):2248-53.
24. Zuo L, Zhang SM, Hu RL, Zhu HQ, Zhou Q, Gui SY, et al. Correlation between expression and differentiation of endocan in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul 28;14(28):4562-8.
25. Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers.* 2011 Jul;16 Suppl 1:S11-21.
26. Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, Cavestri B, Tsicopoulos A, Gentina T, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med.* 2006 Feb;34(2):532-7.
27. Filep JG. Endocan or endothelial cell-specific molecule-1: a novel prognostic marker of sepsis? *Crit Care Med.* 2006 Feb;34(2):574-5.
28. Palmiere C, Augsburg M. Endocan measurement for the postmortem diagnosis of sepsis. *Leg Med (Tokyo).* 2013 Oct 8.
29. Tadzic R, Mihalj M, Vcev A, Ennen J, Tadzic A, Drenjancevic I. The effects of arterial blood pressure reduction on endocan and soluble endothelial cell adhesion molecules (CAMs) and CAMs ligands expression in hypertensive patients on Ca-channel blocker therapy. *Kidney & blood pressure research.* 2013;37(2-3):103-15.
30. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Feldpausch M, Heintze U, Bohnke J, et al. Adipose tissue and circulating endothelial cell specific molecule-1 in human obesity. *Horm Metab Res.* 2006 Jan;38(1):28-33.
31. Joost S. JW, Gerarda W., Sicco S., Marielle V.P., Marijke F. New prognostic marker for the risk to develop early-onset preeclampsia *Pregnancy Hypertension [Poster].* 2013;3(2):94-5.
32. Cross S. BI, Duzyj C., Shook L., McCarthy M., Hardy J., Zhao G., Buhimschi C. Endocan (ESM-1): A novel soluble endothelial cell injury marker in preeclampsia (PE) and intrauterine growth restriction (IUGR). *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2013;208(1 SUPPL.1 (S276)).
33. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Jul;183(1):S1-S22.
34. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol.* 2010 Jul;95(1 Suppl):1-51.

ARTIGO 9 - Artigo submetido para a revista *Scientia Médica*, sob o título: Arterite de Takayasu diagnosticada durante o puerpério de gestante com diagnóstico de doença hipertensiva gestacional: Relato de caso. Autores: **Marta R. Hentschke**, Samanta Shneider, Fernando Sontag, Vicente B. Brentano, Jeziel Basso, Bartira E. Pinheiro da Costa, Carlos E. Poli-de-Figueiredo e Giovani Gadonski.

Arterite de Takayasu diagnosticada durante o puerpério de gestante com diagnóstico de doença hipertensiva gestacional: Relato de caso

RESUMO

Objetivos: Descrever caso de diagnóstico de Arterite de Takayasu durante o puerpério precoce e demonstrar a importância da aferição adequada da pressão arterial para o diagnóstico da doença hipertensiva gestacional e suas implicações.

Descrição do caso: Paciente feminina, 40 anos, em sua quarta gestação, com idade gestacional de 36 semanas e três dias, foi hospitalizada por gestação de alto risco devido à hipertensão arterial sistêmica crônica. Durante a internação observou-se diferença nos níveis tensionais e assimetria de pulsos entre os membros superiores. No pós-parto, foi submetida à ecografia de carótidas com Doppler, que demonstrou oclusão de artéria carótida comum esquerda e de artéria subclávia esquerda, levando ao diagnóstico de Arterite de Takayasu.

Conclusões: O diagnóstico precoce da Arterite de Takayasu é reservado, pois as manifestações iniciais são inespecíficas e os sintomas discretos. Entretanto, um exame físico cuidadoso pode evidenciar sinais que suscitem suspeitas e justifiquem investigação adicional e, até mesmo, previnam um desfecho negativo para a paciente, especialmente no período gestacional.

Descritores: Arterite de Takayasu; Hipertensão; Cuidado Pré-natal; Exame Físico

Takayasu Arteritis diagnosed during puerperium in women with pregnancy-induced hypertension:
Case report

ABSTRACT

Aims: To describe a case report of Takayasu Arteritis during early puerperium and demonstrate the importance of proper arterial blood pressure measurement for the diagnosis of hypertension in pregnancy and its implications.

Case description: A 40 years old woman in her fourth pregnancy, thirty six weeks and three days gestational age, was hospitalized as a high risk pregnancy due to chronic hypertension. During hospitalization it was noticed different tensional levels and pulse asymmetry when comparing both left and right arms. After delivery, a carotid artery Doppler ultrasound demonstrated an occlusion of left common carotid artery and subclavian artery, leading to the diagnosis of Takayasu Arteritis.

Conclusion: The early diagnose of Takayasu Arteritis is reserved due to the nonspecific initial manifestations and the discrete symptoms of the disease. However, a careful physical examination might show signs which could evoke suspicion and justify further investigation, particularly during pregnancy.

Key Words: Takayasu Arteritis; Hypertension; Prenatal Care; Physical Examination

Introdução A hipertensão arterial sistêmica é definida por valores pressóricos sistólicos maiores ou iguais a 140 mmHg e/ou pressóricos diastólicos maiores ou iguais a 90 mmHg em indivíduos adultos.¹ O exame físico é muito importante no diagnóstico da hipertensão arterial sistêmica, visto que são necessárias duas aferições da pressão arterial em pelo menos duas consultas médicas para se confirmar o diagnóstico de hipertensão, conforme o consenso da sociedade brasileira de hipertensão.^{1,2} Ainda, uma adequada avaliação clínica pode estimar o risco cardiovascular e diagnosticar causas de hipertensão secundária nesses pacientes, como doença de parênquima renal, estenose de artéria renal, aldosteronismo primário, feocromocitoma e Síndrome de Cushing. Apesar de acometer de 3 a 5% dos casos, o seu diagnóstico é extremamente importante, visto que muitas dessas causas são reversíveis.¹

A Arterite de Takayasu é uma vasculite crônica de etiologia desconhecida que acomete preferencialmente a aorta e seus ramos primários. A fisiopatologia é decorrente de uma inflamação que leva ao afilamento dos vasos, podendo assim, levar a estenoses, oclusões e formação de aneurismas. Dessa forma, esta patologia pode ser considerada uma importante causa de hipertensão secundária. A suspeita clínica ocorre quando se observam diferenças nas aferições da pressão arterial entre os membros superiores por vezes associado à assimetria de pulsos. Segundo as diretrizes da *European Society of Hypertension (ESH)/European Society of Cardiology (ESC)*,¹ recomenda-se um exame físico minucioso da pressão arterial, fazendo-se a aferição comparativa de pressão arterial entre os membros superiores em pelo menos uma ocasião. Deve-se ainda, investigar possíveis anormalidades vasculares quando pressões arteriais sistólicas apresentarem diferenças maiores que 20 mmHg e/ou diastólicas maiores que 10 mmHg.¹

Em gestantes, a doença hipertensiva é uma das principais causas de morbimortalidade materna e fetal no mundo.^{2,3} Até o momento, não há causa ou tratamento definitivo para esta desordem gestacional. No entanto, existem fatores de risco associados à doença hipertensiva gestacional, que podem se agravar durante a gestação, como o caso da hipertensão arterial crônica. Sabe-se que pacientes com distúrbios hipertensivos devem ser acompanhadas em pré-natal de alto risco, com cuidado especial para os níveis pressóricos.

Dessa forma, patologias associadas à hipertensão secundária merecem uma atenção redobrada em mulheres que desejam gestar para se obter um desfecho favorável para o binômio mãe-filho, durante e após a gestação. Assim, esse relato de caso visa a apresentar uma situação clínica em que a Arterite de Takayasu foi diagnosticada no puerpério precoce, suas implicações clínicas e, ainda, enfatizar a necessidade de um minucioso exame físico, principalmente em gestantes de alto risco.

Relato do caso:

Paciente feminina, 40 anos, casada, diarista, natural de Lages, procedente de Viamão, em sua quarta gestação, foi encaminhada do posto de saúde para acompanhamento no pré-natal de alto risco no Hospital São Lucas da PUCRS devido à hipertensão arterial crônica, diagnosticada aos 32 anos. Em agosto de 2007, com idade gestacional de trinta e seis semanas e três dias, em uma consulta de pré-natal, a pressão arterial aferida foi de 190 x 120 mmHg, em uso de metildopa 500 mg de 12 em 12 horas. Mesmo após repouso, a pressão permaneceu a mesma. Mediante o aumento dos níveis tensionais, a paciente foi encaminhada para a emergência obstétrica e posteriormente internada no Hospital São Lucas da PUCRS, no dia 21 de agosto de 2007. Durante a internação, foram realizados exames de gravidade, sendo diagnosticado pré-eclâmpsia com proteinúria de 24 horas de 358 mg/24h. Foi observada diferença nos níveis pressóricos entre os membros superiores (membro superior esquerdo: 110 x 60 mmHg e membro superior direito: 170 x 90 mmHg). Interessante mencionar que a paciente já sabia da diferença de pressão arterial entre os membros e informava que a pressão arterial no membro superior esquerdo era difícil de medir. Aparentemente, esse relato e dado do exame físico nunca haviam sido adequadamente investigados. Após os quatro dias de internação, visto a gravidade do caso, e após novo pico hipertensivo a equipe obstétrica optou pela indução do parto, inicialmente com misoprostol 25 µg, via vaginal. Em decorrência de colo desfavorável e dos níveis hipertensivos, foi indicado parto cirúrgico (cesariana). O Recém-nascido nasceu com 2640 g, masculino, índice de Apgar de 7 no primeiro minuto e de 8 no quinto minuto, com percentil fetal abaixo de 10, considerado pequeno para a idade gestacional. Após o parto, durante a internação no alojamento conjunto obstétrico, evidenciaram-se novamente diferença nos níveis pressóricos entre os membros superiores

(membro superior esquerdo: 110 x 82 mmHg e membro superior direito: 150 x 88 mmHg) e assimetria de pulsos radiais, sendo solicitada uma ecografia com Doppler de artérias subclávias, carótidas e vertebrais. O exame demonstrou oclusão da artéria carótida comum esquerda e da artéria subclávia esquerda, levando ao diagnóstico de Arterite de Takayasu. Nesse mesmo período, foi também realizada angiorressonância de aorta e artérias renais que não demonstrou alteração nesses segmentos vasculares. A paciente recebeu alta hospitalar com plano de tratamento ambulatorial com a nefrologia, no ambulatório de hipertensão gestacional, já em uso de captopril 50 mg de 12 em 12 horas. Na primeira consulta, no dia 13 de setembro de 2007, a paciente relatava parestesias em membro superior esquerdo, palpitações, cefaléia e eventual dispnéia. Ao exame físico, apresentava pressão arterial em membro superior direito de 148 x 110 mmHg e no esquerdo não foi possível a aferição. O pulso carotídeo esquerdo estava diminuído e o pulso radial ipsilateral não era palpável. Iniciado acompanhamento, apresentou melhora dos sintomas e controle de pressão arterial com esquema anti-hipertensivo com anlodipina 5 mg uma vez por dia, enalapril 20 mg de 12 em 12 horas e hidroclorotiazida 25 mg uma vez por dia. Com este esquema terapêutico, a paciente apresentou os níveis pressóricos em membro superior direito de 137 x 80 mmHg e no membro superior esquerdo de 119 x 82 mmHg. Em março de 2010, a paciente evoluiu com piora da atividade da doença, apresentando dor precordial, alterações visuais, cefaleia, parestesias e elevação de marcadores inflamatórios (velocidade de sedimentação globular: 78 mm/h e proteína C-reativa 1,8 mg/dl). Nesse período, precisou ser internada para avaliação, sendo realizada nova ecografia com Doppler e arteriografia de membros superiores que demonstraram as mesmas alterações prévias. No entanto, devido ao fato de a arteriografia evidenciar boa circulação colateral, não foi necessário realizar intervenção cirúrgica. Exames de ecocardiografia e cintilografia miocárdica com dipiridamol foram considerados normais. A paciente recebeu alta hospitalar e após dezenove dias de internação, iniciou prednisona 10 mg ao dia, metotrexato 2,5 mg 8 comprimidos por semana e cilostazol 100 mg de 12 em 12 horas. Foi ajustado o esquema anti-hipertensivo prévio com hidroclorotiazida 25 mg uma vez ao dia, enalapril 10 mg de 12 em 12 horas e anlodipina 10 mg dois comprimidos ao dia; associado ao ácido acetil salicílico 100 mg uma vez ao dia. Com o tratamento, a paciente ficou assintomática e manteve acompanhamento ambulatorial.

Discussão:

A Arterite de Takayasu é uma vasculite crônica de etiologia desconhecida, sendo a grande maioria dos casos detectados em mulheres. A doença envolve artérias de grande e médio calibres, apresenta predileção pela aorta e seus ramos principais. O acometimento nos vasos é de inflamação transmural, podendo levar a estenose, oclusão e aneurismas. O diagnóstico precoce da doença é difícil, pois as manifestações iniciais são inespecíficas e os sintomas decorrentes do comprometimento vascular não são tão exuberantes nesse estágio da doença. Entretanto, um exame físico cuidadoso pode evidenciar redução na amplitude de um ou mais pulsos, diferenças na pressão arterial entre os membros ou sopros na região cervical, área supraclavicular, axilar ou abdominal. É importante salientar que, através de um pré-natal criterioso, é possível fazer o diagnóstico de patologias possivelmente associadas à hipertensão arterial que, se adequadamente diagnosticadas e tratadas, poderiam evitar desfechos desfavoráveis para o binômio mãe-filho. Para o diagnóstico de Arterite de Takayasu, o *American College of Rheumatology* utiliza os seguintes critérios: idade inferior a 40 anos, claudicação de extremidades, diminuição de pulsos braquiais, diferença sistólica entre membros superiores acima de 10 mmHg, sopro sobre artérias subclávias ou aorta e alterações arteriográficas, sendo necessária a presença de, pelo menos, três critérios.⁴ O tratamento tem como base o uso de corticosteróides, os quais têm uma resposta clínica estimada em torno de 50%. Outros imunossuppressores, tais como metotrexato podem ser utilizados. O controle da pressão arterial é extremamente importante para o manejo clínico. Deve-se ainda recomendar atenção para os riscos de trombozes nesses pacientes.⁵ A paciente do caso relatado sabia-se hipertensa desde os seus 32 anos de idade. Durante, aproximadamente, oito anos nenhum médico ou outro profissional da saúde que a examinou valorizou a diferença de pulso e de pressão arterial entre os membros superiores, o que justificaria investigação complementar e, possivelmente, poderia minimizar desfechos materno-fetais desfavoráveis durante a gestação, já que o tratamento com corticóides é capaz de impedir a progressão da doença em um grande número de pacientes.

Estudos prévios analisaram Arterite de Takayasu na gestação,⁶⁻⁸ assim como, um relato de casos durante o pré-natal já foi publicado.⁹ Os estudos deixam bem clara a importância de um acompanhamento multidisciplinar (equipes de obstetras, reumatologistas e cardiologistas) para estas pacientes tanto no período pré-natal quanto a longo prazo.⁶ Sabe-se que um pré-natal bem realizado promove um melhor desfecho perinatal nessas pacientes, as quais são mais propícias a desenvolver hipertensão, pré-eclâmpsia e crescimento intra-uterino restrito,⁶ como visto no nosso estudo.

Referências

1. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; ESH Scientific Council, Redon J, Dominiczak A, Narkiewicz K, Nilsson PM, Burnier M, Viigimaa M, Ambrosioni E, Caulfield M, Coca A, Olsen MH, Schmieder RE, Tsioufis C, van de Borne P; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S; Document Reviewers, Clement DL, Coca A, Gillebert TC, Tendera M, Rosei EA, Ambrosioni E, Anker SD, Bauersachs J, Hitij JB, Caulfield M, De Buyzere M, De Geest S, Derumeaux GA, Erdine S, Farsang C, Funck-Brentano C, Gerc V, Germano G, Gielen S, Haller H, Hoes AW, Jordan J, Kahan T, Komajda M, Lovic D, Mahrholdt H, Olsen MH, Ostergren J, Parati G, Perk J, Polonia J, Popescu BA, Reiner Z, Rydén L, Sirenko Y, Stanton A, Struijker-Boudier H, Tsioufis C, van de Borne P, Vlachopoulos C, Volpe M, Wood DA. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2013;34(28):2159-219.
2. VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol*. 2010;95(1 Suppl):1-51.
3. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2010; 21;376(9741):631-44.
4. Fauci AS, Leavitt RY, Lie JT, Lightfoot Jr RW, Masi AT, McShane DJ, Mills JA, Stevens MB, Wallace SL, Zvaifler NJ. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33(8):1129-34.
5. Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, Leavitt RY, Fauci AS, Rottem M, Hoffman GS. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med*. 1994;1,120(11):919-29.
6. de Jesus GR, d'Oliveira IC, dos Santos FC, Rodrigues G, Klumb EM, de Jesus NR, Levy RA. Pregnancy may aggravate arterial hypertension in women with Takayasu arteritis. *Isr Med Assoc J*. 2012;14(12):724-8.
7. Li LT, Gilani R, Tsai PI, Wall MJ, Jr. Takayasu arteritis complicating pregnancy in adolescence. *Ann Vasc Surg*. 2012;26(6):858 e 7-10.
8. Shafi NA, Malik A, Silverman DI. Management of Takayasu arteritis during pregnancy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2009;11(7):383-5.
9. Papantoniou N, Katsoulis I, Papageorgiou I, Antsaklis A. Takayasu arteritis in pregnancy: safe management options in antenatal care. Case report. *Fetal Diagn Ther*. 2007;22(6):449-51.

ARTIGO 1 – Artigo publicado sob o título: Flow-mediated dilatation of brachial artery as marker of preeclampsia morbidity. Autores: Vieira MC, da Cunha Filho EV, Paula LG, Hentschke MR, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE. Dados da publicação: Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):4424-5.

ARTICLE IN PRESS

IJCA-16340; No of Pages 3

International Journal of Cardiology xxx (2013) xxx-xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Cardiology

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

Letter to the Editor

Flow-mediated dilatation of brachial artery as marker of preeclampsia morbidity

Matias Costa Vieira¹, Edson Vieira da Cunha Filho¹, Letícia Germany Paula¹, Marta Ribeiro Hentschke¹, Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo¹, Bartira Ercília Pinheiro da Costa^{*,1}

Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2013

Accepted 4 May 2013

Available online xxx

Keywords:

Hypertension, pregnancy induced

Ultrasound Imaging, Doppler

Toxemia, pregnancy

Risk factor

Outcomes, pregnancy

Dear Sir,

Despite the efforts that have been made, it is still difficult to predict preeclampsia and its morbidity [1]. Flow-mediated dilatation (FMD) is a technique that has been employed to investigate the role of vascular alterations in preeclampsia [2]. Our hypothesis is that FMD may be useful as a clinical test prognostic marker, specially associated with routine laboratorial exams. We therefore studied the association of endothelial dysfunction, assessed by FMD, with preeclampsia morbidity.

The study was approved by the Research Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Protocol 368/11), and written consent was obtained from all participants before inclusion. This is a cohort study that enrolled women with preeclampsia at the diagnostic moment, accompanied until delivery. Women were grouped according to preeclampsia outcomes dividing into women with or without complications. Complicated preeclampsia was considered when any of the following occurred: HELLP syndrome (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets), eclampsia, abruptio placentae, mother's Intensive Care Unit admission, maternal death, early prematurity (delivery before 34 weeks gestation), severe growth restriction (percentile < 5), newborn lighter than 2 kg, APGAR Score < 7 in the fifth minute, need of Neonatal Intensive Care Unit admission or stillbirth. Twin pregnancy, women who were in labor on preeclampsia diagnosis and patients who withdraw consent were excluded.

* Corresponding author at: Av. Ipiranga, 6690, Hospital São Lucas da PUCRS, 2^o Andar Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Porto Alegre, ZIP code: 90610-000 RS, Brazil. Tel.: +55 51 3367700; fax: +55 51 33367700.

E-mail address: bart@pucrs.br (B.E. Pinheiro da Costa).

¹ This author takes responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

Endothelial function was evaluated by brachial artery FMD, using the protocol adapted from Celermajer DS, et al. [3]. FMD was measured in the first day of diagnosis and all patients rested for 10 min before baseline evaluation. None smoked cigarettes or drank coffee for at least 8 h before the ultrasound exam. This protocol has previously been used in our hospital [4]. Ultrasounds were performed by two observers. Intraobserver variability was 6.2% and 6.8%. Intra-class coefficient was 0.91 between observers.

Sample size was calculated to detect a difference of one standard deviation in the FMD (90% power and alfa 0.05), estimating at least 22 subjects by group.

The study included 66 women with preeclampsia and two were excluded, one twin pregnancy and one that delivered in another city. The remaining 64 subjects were analyzed, 26 developed complicated preeclampsia and 38 had preeclampsia without associated morbidities. Clinical characteristics, laboratory and Doppler ultrasound values are summarized in Table 1.

FMD in complicated preeclampsia group was 7.44% (IQR 2.20–13.34%) while in preeclampsia group was 11.80% (IQR 5.36–16.66%) ($P = 0.03$) as shows Fig. 1a. To better evaluate FMD association with morbidity, a composite of major outcomes (HELLP syndrome, eclampsia or stillbirth) was selected from the complicated preeclampsia group and 13 women fit these criteria. FMD was 2.84% (IQR 0.00–7.22%) in this sub-group compared to 11.90% (IQR 5.56–16.62%) of all other women ($P < 0.001$) (Fig. 1b). At last, a cutoff value of FMD < 4.5% was used for risk estimation [5]. It was associated with an Odds Ratio (OR) of 3.79 (IC 95% 1.23–11.70) for complicated preeclampsia and an OR of 15.55 (IC 95% 3.55–68.16) for predicting the composite major outcomes.

Endothelial dysfunction evaluated through FMD is known to be present in preeclampsia patients [2,4,6,7], but the association with severity of the disease has been poorly investigated. The present study demonstrates that decreased FMD may be linked directly to morbidity of preeclampsia. These results are in agreement with a study that evaluated preeclampsia and severe preeclampsia, showing worst endothelial function on the severe group, even though the authors haven't made a statistical comparison [2].

Endothelial dysfunction is thought to be one of the mechanisms involving preeclampsia manifestations (hypertension and proteinuria). While in normal pregnancy FMD increases throughout pregnancy [8], in women with preeclampsia it is reduced [6]. Also, FMD was altered even before the onset of the disease [2,7]. We tested its association with disease severity, supported by the theory of impaired nitric oxide bioavailability in preeclampsia [9,10]. Our results have shown that FMD is impaired in complicated preeclampsia and

Table 1
Clinical characteristics, laboratory and Doppler exams.

	PE (n = 38)	Complicated PE (n = 26)	P
Age (years) ^a	27.5 ± 6.4	26.2 ± 7.1	0.41
Chronic hypertension n (%) ^b	10 (26.3)	10 (38.5)	0.29
Cigarette smoke n (%) ^b	4 (10.5)	6 (23.1)	0.49
Nulliparity n (%) ^b	16 (42.1)	13 (50.0)	0.61
SBP (mmHg) ^a	156 ± 17	167 ± 18	0.012
DBP (mmHg) ^a	98 ± 12	104 ± 13	0.045
GA diagnosis (weeks) ^a	35.6 ± 1.9	29.4 ± 4.4	<0.001
GA at term (weeks) ^a	37.5 ± 1.5	31.0 ± 4.4	<0.001
Birth weight (g) ^a	3.037 ± 546	1.482 ± 870	<0.001
P/C Ratio ^c	0.49 (0.27–0.71)	0.67 (0.36–4.67)	0.038
Proteinuria 24 h (mg) ^c	365 (295–474)	673 (471–2.614)	0.001
Uric Acid (mg/dL) ^a	4.5 ± 1.2	5.3 ± 1.4	0.013
AST (units/L) ^c	21 (17–26)	40 (24–109)	<0.001
ALT (units/L) ^c	19 (14–24)	36 (23–101)	<0.001
LDH (units/L) ^c	467 (405–558)	718 (546–1.190)	<0.001
Creatinine (mg/dL) ^a	0.71 ± 0.15	0.89 ± 0.28	0.02
Platelets (>1000/mcL) ^a	219 ± 65	169 ± 68	0.005
Uterine artery RI ^a	0.50 ± 0.10	0.68 ± 0.18	<0.001
Umbilical artery RI ^a	0.57 ± 0.08	0.70 ± 0.12	<0.001
Median cerebral artery RI ^a	0.81 ± 0.08	0.79 ± 0.07	0.47
FMD (%) ^c	11.80 (5.36–16.66)	7.44 (2.20–13.34)	0.034

GA-gestational age; AST-aspartate aminotransferase; ALT-alanine aminotransferase; LDH-lactate dehydrogenase; RI-resistance index; FMD-flow mediated dilatation; P/C ratio-proteinuria/creatininuria ratio; SBP-systolic blood pressure; DBP-diastolic blood pressure.

^a Mean ± standard deviation and Student t test.

^b Percentual and Qui-square test.

^c Median (IQR 25–75) and Mann Whitney test.

It was reassured by the fact that in women with the worst outcomes it was remarkably lower. Furthermore, FMD of equal or less than 4.5% seems to be a reliable cutoff point associated with a four-fold increment of complications and a 15 fold increased risk of major outcomes. It is interesting to remember that low cutoff point should only be used in a set of patients with known impaired endothelial function [5], data is lacking to determine cutoff point for low risk population. Despite the fact that our study was not meant to determine prediction power, a preliminary analysis of the ROC curve suggests that FMD might be a weak prognostic marker for preeclampsia complications (AUC = 0.66; IC 95% 0.52–0.79). When used to predict major outcomes AUC increases markedly (AUC = 0.84; IC 95% 0.73–0.96).

Preeclampsia has many clinical presentations, it is a multisystemic disease that affects organs in different proportion, as illustrated by cases of preeclampsia without proteinuria or hypertension. FMD of brachial artery evaluates only one site, brachial artery endothelium, and sometimes it might not reflect the severity of whole disease. The variety of damage that can be caused by preeclampsia may be a limitation for this method to predict the disease and complications.

FMD of brachial artery is decreased in complicated preeclampsia in comparison with preeclampsia without complications. Severe endothelial dysfunction, measured by FMD test, is associated with higher risk of poor outcomes and may predict complications of the disease. Preeclampsia etiology and pathophysiology are not fully understood and probably this is the reason a specific predictor and prognostic marker haven't been found. Our findings support the evidence of endothelial dysfunction as a key mechanism for preeclampsia complications and also that FMD may be a prognostic marker.

Acknowledgments

Matias CostaVieira, Marta Ribeiro Hentschke had support from CAPES (CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Poli-de-Figueiredo is a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) researcher.

References

- 1] Ganzevoort W, Rep A, de Vries JI, Bonsel GJ, Wolf H. Prediction of maternal complications and adverse infant outcome at admission for temporizing management of early-onset severe hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(2):495–503.
- 2] Noori M, Donald AE, Angelakopoulou A, Hingorani AD, Williams DJ. Prospective study of placental angiogenic factors and maternal vascular function before and after preeclampsia and gestational hypertension. *Circulation* 2010;122(5):478–87.
- 3] Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340(8828):1111–5.
- 4] Filho EV, Mohr C, Filho BJ, et al. Flow-mediated dilatation in the differential diagnosis of preeclampsia syndrome. *Arq Bras Cardiol* 2010;94(2):182–6 [95–200, 185–9].
- 5] Yinon Y, Kingdom JC, Odutayo A, et al. Vascular dysfunction in women with a history of preeclampsia and intrauterine growth restriction: insights into future vascular risk. *Circulation* 2010;122(18):1846–53.
- 6] Adali E, Kurdoglu M, Adali F, Cim N, Yildizhan R, Kulusari A. The relationship between brachial artery flow-mediated dilatation, high sensitivity C-reactive protein, and uterine artery Doppler velocimetry in women with pre-eclampsia. *J Clin Ultrasound* 2011;39(4):191–7.

Flow-Mediated Dilatation

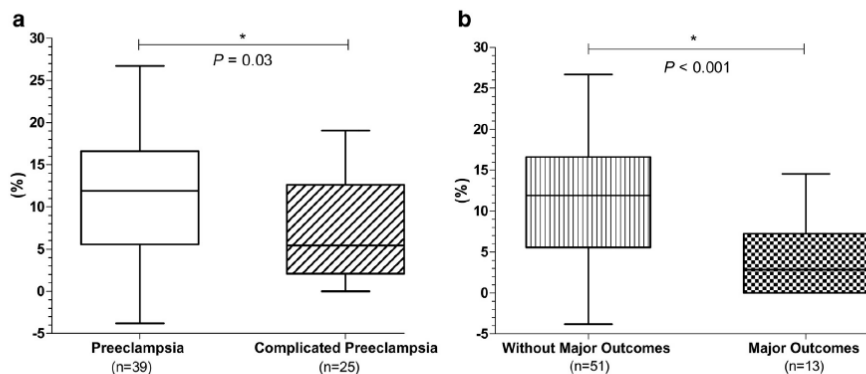


Fig. 1. Comparison of FMD between groups.

Please cite this article as: Vieira MC, et al. Flow-mediated dilatation of brachial artery as marker of preeclampsia morbidity. *Int J Cardiol* (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.05.014>

- 7] Kamat R, Jain V, Bahl A. Serial estimation of flow mediated dilatation in women at risk of hypertensive disorders of pregnancy. *Int J Cardiol* 2011;149(1):17–22.
- 8] Savvidou MD, Kametas NA, Donald AE, Nicolaides KH. Non-invasive assessment of endothelial function in normal pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;15(6):502–7.

- 9] Matsubara K, Matsubara Y, Hyodo S, Katayama T, Ito M. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the pathogenesis of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36(2):239–47.
- 10] Pinheiro da Costa BE, Scocco C, Poli de Figueiredo CE, Guimaraes JA. Increased serum phosphodiesterase activity in women with pre-eclampsia. *BJOG* 2006;113(5):577–9.

ARTIGO 2 – Artigo original submetido para a revista *Journal of Hypertension* sob o título: CCL5 levels in placenta tissue, maternal and umbilical cord plasma are different in pregnant women with and without preeclampsia. Autores: Ison D da Silveira; Bruna Krauspenhar; **Marta R. Hentschke**, Ivan Carlos Antonello, Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Bartira Ercilia Pinheiro da Costa.



Journal of Hypertension

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Editorial Manager

Role: [] Username: Bartira

Author's Decision

Thank you for approving "CCL5 levels in placenta tissue, maternal and umbilical cord plasmas are different in pregnant women with and without preeclampsia".

Title: CCL5 levels in placenta tissue, maternal and umbilical cord plasmas are different in pregnant women with and without preeclampsia.

Abstract

OBJECTIVES: The present study estimated CCL5 levels in placenta, maternal and umbilical cord plasmas in preeclampsia and normotensive pregnant women.

METHODS: A cross-sectional study was conducted at São Lucas Hospital – Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Following ethical approval and informed written consent, samples were taken at delivery from 33 preeclamptics compared to 36 controls, and stored at -80°C until assay. It was collected placenta biopsies, maternal and umbilical cord blood plasmas to measure CCL5 levels using a human ELISA kit.

RESULTS: In preeclampsia CCL5 levels were increased in placenta (210.0 ± 85.8 ng/g protein vs 14.2 ± 4.2 ng/g protein) and maternal plasma (96.7 ± 25.1 ng/dL vs 42.8 ± 17.8 ng/dL), and reduced in umbilical cord plasma (23.3 ± 13.9 ng/dL vs 198.8 ± 24.2 ng/dL) ($P < 0.001$). A negative correlation between CCL5 in placental tissue and umbilical cord plasma was found ($r = -0.391$; $P = 0.027$) in preeclampsia group.

CONCLUSIONS: Distinct inflammatory profile between mother, placenta and fetus was detected in preeclampsia versus normal pregnancy regarding CCL5 concentrations. It was detected elevated in placenta and maternal plasma from women with preeclampsia and reduced in fetal plasma.

Keywords: Cytokines; Hypertension, Pregnancy Induced; Blood, Fetal; inflammation; Chemokines.

ARTIGO 3 – Artigo Original submetido para a revista *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, sob o título: Preeclampsia alters leptin levels in placenta tissue and maternal plasma. Autores: Adriana B. Comparsi, **Marta R. Hentschke**, Bartira E. Pinheiro da Costa, Carlos Eduardo Poli-de-Figueiredo.

26 **Abstract**

27 Context: Preeclampsia is a pregnancy hypertensive syndrome. Leptin
28 participates in gestational metabolism.

29 Objective: To evaluate the association of leptin levels in the maternal plasma,
30 umbilical cord plasma and placental tissue of normotensive and preeclamptic
31 (PE) pregnant women.

32 Design: Observational case-control study.

33 Setting: Pregnants were selected at the Obstetrics Outpatient Clinic and
34 Obstetrics Center of the Hospital São Lucas, Pontifical Catholic University of Rio
35 Grande do Sul (HSL/PUCRS), Brazil.

36 Patients: 67 normal pregnant and 50 preeclamptic women.

37 Main outcome measures: Leptin levels were analysed in the maternal plasma,
38 umbilical cord plasma and placental tissue of 50 women with preeclampsia and
39 67 normotensive pregnant women. Plasma and placental leptin were measured
40 using the MagPlexTH-C microspheres system.

41 Results: Leptin levels were 40 times higher in the maternal plasma and 82 times
42 higher in the placental tissue of patients with preeclampsia in comparison to the
43 controls. The geometric means found were 19.59 ng/mL and 163.31 mg/g in the
44 PE group, and 13.96 ng/mL and 89.95 mg/g in the normotensive group,
45 respectively. Analysis of the umbilical cord plasma showed no significant
46 difference between the groups. The mean ratios found after adjustment for
47 maternal age, BMI and gestational age were: maternal plasma (MR=1.40; 95% CI:
48 1.00 - 1.97, p=0.049), fetal plasma (MR=1.33; 95% CI: 0.85- 2.09, p=0.216) and
49 placenta (MR=1.82; 95% CI: 1.11 - 2.98, p=0.019).

50 Conclusions: Leptin values found in patients with preeclampsia are significantly
51 increased in maternal plasma and placental tissue in comparison to the control.
52 The extremely high levels in the placenta are believed to have resulted from
53 studies that specifically aimed to evaluate biomarkers.

Keywords: pregnancy induced hypertension; cytokines; placenta; pregnancy.

Anexos

ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO CIENTÍFICA DO HSL/PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Of. 008/11-PG

Porto Alegre, 10 de janeiro de 2011.


A Pós-Graduanda
Marta Ribeiro Hentschke
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta de tese intitulada "**PRÉ-ECLÂMPSIA E HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS**" foi **aprovada** pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do setor de **Pesquisas e Estágios**, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Após aprovação do CEP entregar cópia na secretaria do Programa. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,


Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – P. 60 – 3º andar – CEP 90610-000
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3318 – Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/famed/pos

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA DA PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-671/11

Porto Alegre, 19 de abril de 2011.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05352 intitulado **"Pré-eclâmpsia e hipertensão na gestação: avaliação de aspectos fisiopatológicos e clínicos"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo
HSL
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C – BULA DO INIBIDOR DE PROTEASE UTILIZADO NO ENSAIO MULTIPLEX.



upstate | CHEMICON | *Linco*

THE EXPERTISE OF UPSTATE®, CHEMICON® AND LINCO® IS NOW A PART OF MILLIPORE

Certificate of Analysis

Protease Inhibitor Cocktail I
(lyophilized powder)
Catalog # 20-201
Lot # 2064540

Formulation: AEBSF (2mM), EDTA (1mM), Bestatin (130µM), E-64 (14µM), Leupeptin (1µM), Aprotinin (0.3µM) when reconstituted in 100ml of buffer. Supplied as lyophilized powder.

Reconstitution Instructions: Dissolve powder in 10ml of RIPA Lysis Buffer, 10X (Catalog # 20-188) and transfer to a larger container to prepare 100ml final volume. The powder may be prepared and stored as a more concentrated stock for further dilution.

Storage and Stability: Stable for 5 years when stored unopened at -20°C from date of shipment. Once reconstituted, this cocktail solution is stable for up to 1 week at 4°C.

Applications: Use generally to inhibit serine, cysteine, aspartic, and metalloproteases.

One ml of the cocktail will inhibit proteolytic activity equivalent to 1mg of USP pancreatin. One bottle is sufficient to inhibit proteases present in 20g of cellular extract. Note that some organisms contain higher levels of proteases and may require a higher concentration of protease cocktail to inhibit the intrinsic proteolytic activity.

FOR RESEARCH USE ONLY; NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES. NOT FOR HUMAN OR ANIMAL CONSUMPTION

Inhibitor	Target
AEBSF	Serine proteases, such as trypsin chymotrypsin.
EDTA	Metalloproteases.
Bestatin	Aminopeptidases, such as leucine aminopeptidase and alanyl aminopeptidase.
E-64	Cysteine and thiol proteases, such as calpain, papain, cathepsin B, and cathepsin L.
Leupeptin	Serine and thiol proteases, such as calpain, trypsin, papain, and cathepsin B.
Aprotinin	Serine proteases such as trypsin, chymotrypsin, plasmin, trypsinogen, urokinase, and kallikrein. Inhibits leukocyte elastase but not pancreatic elastase.

Unless otherwise stated in our catalog or other company documentation accompanying the product(s), our products are intended for research use only and are not to be used for any other purpose, which includes but is not limited to, unauthorized commercial uses, in vitro diagnostic uses, ex vivo or in vivo therapeutic uses or any type of consumption or application to humans or animals.
©2001 - 2011: Millipore Corporation. All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

20-201/04-MAR-11/trd-formatting

28820 Single Oak Drive • Temecula, CA 92590
 Technical Support: T: 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476) • F: 1-800-437-7502
www.millipore.com

**ANEXO D – RELATÓRIOS DO DOUTORADO SANDUÍCHE PELOS
ORIENTADORES PROF. DR. CARLOS EDUARDO POLI DE FIGUEIREDO E
PROF. LUCILLA POSTON.**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Processo 4608-11-9

Doutorado Sanduiche CAPES

Parecer Orientador Brasileiro

Aluna bolsista: **Marta Ribeiro Hentschke (processo: 4608-11-9)**

Orientador: **Carlos Eduardo Poli de Figueiredo**

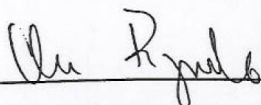
A Doutoranda Marta Ribeiro Hentschke concluiu seu período de estágio "sanduíche" no King's College London e retornou as suas atividades de doutorado MD/PhD na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. O seu desempenho foi excelente. A Marta dedicou-se as atividades de pesquisa no Departamento de Saúde da Mulher do KCL, sob a Orientação da Professora Lucilla Poston e do pesquisador Hiten Mistry. Ela aprendeu diversas técnicas laboratoriais, e executou diversos estudos no período. Estabeleceu forte ligação com o grupo e tornou-se respeitada pela equipe. Tive oportunidade de visita-la durante o seu estágio em Londres quando fomos com o Reitor da PUCRS estabelecer termo de cooperação entre as Universidades. O papel da Marta foi importante, consolidando a nossa cooperação internacional.

Ela conseguiu com sucesso concluir diversas etapas dos estudos, sendo que um trabalho já foi encaminhado para publicação, e seguiremos com a cooperação estabelecida no estudo de proteômica, que é um projeto de longo prazo.

A sua dedicação e competência foram reconhecidas pelos pares internacionais pelos relatos que recebi dos nossos colaboradores. A sua capacidade de liderança e de agregação, já demonstradas aqui na PUCRS foram também observadas em Londres.

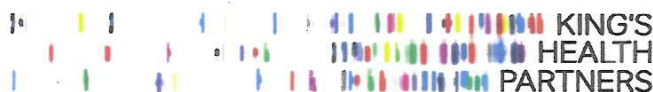
O retorno dela para o nosso grupo representa um salto de qualidade. Considero que a Marta atendeu todas as metas propostas e que o apoio da CAPES foi essencial para esta etapa na formação. Tenho certeza que a Marta irá contribuir muito para o progresso da ciência e da medicina no Brasil.

Porto Alegre, 14 de Janeiro de 2013



(Carlos Eduardo Poli de Figueiredo – Orientador)

Carlos Eduardo Poli de Figueiredo
NEFROLOGIA
CREMERS 13.112



An Academic Health Sciences Centre for London

Pioneering better health for all

Women's Health Academic Centre

Division of Women's Health
King's College London
Women's Health Academic Centre KHP
St Thomas Hospital
10th Floor, North Wing
Westminster Bridge Road
London SE1 7EH
Tel: 020 7188 3639
Fax: 020 7620 1227
www.kcl.ac.uk

5th December 2012

To whom it may concern,

Re: PhD Student Marta Ribeiro Hentschke – CAPES: 4608-11-9

I am very pleased to provide a report on Dr Marta Ribeiro Hentschke's stay in our department (Division of Women's Health, Women's Health Academic Centre, King's College London). Marta has made important contributions to our team during her visit from December 2011 to November 2012 under the supervision of Dr. Hiten Mistry. This was funded by a generous scholarship from CAPES.

During her time here, Marta became an integral part of the Division and was able to participate and learn about many of the different research projects being conducted across the Division. Marta also took the opportunity of observing obstetric clinics within St. Thomas' Hospital, which provided an insight into the medical arena in the UK.

During her time at King's, Marta completed several projects, all related to pre-eclampsia. Firstly, she investigated placental lipoprotein receptor expression (LDL-R; LRP-1; SRBI; PON-1; ABCA1; MTTP; PDIA2) as well as maternal and fetal serum lipoprotein concentrations from women with pre-eclampsia and normotensive control women. This project enabled Marta to develop and learn several new molecular techniques including, RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR. The data from this project was selected for an oral presentation, which Marta presented at the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy World Congress in Geneva, July 2012. A manuscript of this work has been submitted to Placenta entitled: 'Maternal and fetal lipoprotein concentrations and expression of placental lipoprotein transporters in pre-eclampsia and normotensive controls, and the association with small-for-gestational-age infants'.

A second project Marta was involved with investigated the mRNA and protein placental expression of the Caveolae system (cavin-2, cavin-3, cavin-4, caveolin-2, caveolin-3 and iNOS) in two different groups of pregnant women (Normotensive Controls and Preeclampsia). Marta is currently comparing these data with maternal and fetal lipoprotein concentrations and the placental lipoprotein results to establish any correlations. This project further enhanced her molecular biology skills, but also expanded on her techniques, such as Western Blots and immunohistochemistry. Data analysis is still underway, with a plan to submit a paper early next year.

The final project that Marta was involved in was investigating potential biomarkers in urine for the diagnosis and/or prediction of pre-eclampsia and other hypertensive and renal complications

in pregnancy. This work led Marta to work within the King's Centre of Excellence for Mass Spectrometry at our Denmark Hill campus. Here, she was able to learn many new methods involved in the preparation of urine for analysis including acetone precipitation, immunodepletion, running SDS-PAGE gels, in-gel trypsin digests. In addition, Marta gained experience in setting up and running these samples through several different mass spectrometry platforms, as well as analysing the vast amount of data resulting from this. As this project is still on-going, Marta's significant contributions in this work will be acknowledged in any manuscripts that will result from this work.

Marta also gave several presentations within the Division to a range of multidisciplinary scientists and clinicians, which were all well received. Marta was also involved in a BBSRC Young Entrepreneurs Scheme (YES) with other PhD students within the Division, adopting the role as Managing Director, which has enhanced her presentation and team working skills as well as exposure to commercialising research. Marta's presence in our Division over the year has been a great pleasure and the whole group has much appreciated her stay with us. This scholarship has been very productive and a further incentive for continued bilateral collaboration.

Yours faithfully,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lucilla Poston', written in a cursive style.

Professor Lucilla Poston

Head of Division of Women's Health
King's College London