

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Genética

Flávia Ivair Santiago de Oliveira

**EXPRESSÃO PLASMÁTICA E PLACENTÁRIA DA PENTRAXINA 3 E DO FATOR
DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO 2 NA PRÉ-ECLÂMPسيا**

Belo Horizonte

2020

Flávia Ivair Santiago De Oliveira

Expressão plasmática e placentária da Pentraxina 3 e do Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 na Pré-eclâmpsia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dra Adriana Abalen Martins Dias

Belo Horizonte

2020

043

Oliveira, Flávia Ivair Santiago de.

Expressão plasmática e placentária da Pentraxina 3 e do Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 na Pré-eclâmpsia [manuscrito] / Flávia Ivair Santiago de Oliveira. - 2020.

88 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa Dra Adriana Abalen Martins Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Pré-Eclâmpsia. 3. Neovascularização. 4. Proteínas da Fase Aguda. 5. Fator 2 de Crescimento de Fibroblastos. I. Dias, Adriana Abalen Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

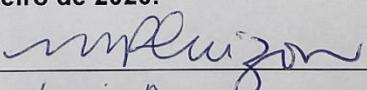
Flávia Ivair Santiago de Oliveira

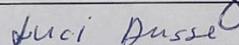
296/2020
entrada
1º/2018
CPF:
102.662.686-25

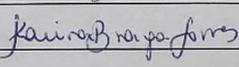
Às quatorze horas do dia **20 de fevereiro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Expressão plasmática e placentária da Pentraxina 3 e do Fator de Crescimento do Fibroblasto 2 na Pré-eclâmpsia**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Dr. Marcelo Rizzatti Luizon (Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética em substituição à Dra. Adriana Abalen Martins Dias – Orientadora da discente, que se encontra em licença-saúde), após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Marcelo Rizzatti Luizon	UFMG	27730818892	APROVADA
Luci Maria Sant'Ana Dusse	UFMG	32713487668	APROVADA
Karina Braga Gomes Borges	UFMG	031.328.986.28	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.
Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020.

Marcelo Rizzatti Luizon 

Luci Maria Sant'Ana Dusse 

Karina Braga Gomes Borges 

*À minha mãe, alicerce para toda e qualquer
conquista da minha vida*

AGRADECIMENTOS

Tão importante quanto todo o trabalho realizado e toda conquista alcançada é o reconhecimento e gratidão pelas pessoas que caminharam de mãos dadas comigo em toda a minha trajetória.

Primeiramente, agradeço à minha mãe, que desde sempre me incentivou a estudar e me deu todo suporte para que eu trilhasse o caminho do conhecimento. Obrigada por me apoiar e por não medir esforços para me oferecer a melhor das oportunidades dentro do que estava ao seu alcance. Todas as conquistas da minha vida serão tão minhas quanto suas.

Agradeço também àquelas que desde sempre foram meus maiores exemplos e inspiração: Patrícia e Renata. Faltam-me palavras para expressar tamanha gratidão que eu sinto por vocês! Obrigada por estarem comigo em todos os momentos, por me incentivarem da maneira que fazem e por expressarem um orgulho que às vezes eu nem sei se mereço tanto! Vocês são minha inspiração como profissionais e como pessoas.

À toda minha família maravilhosa, agradeço o suporte, amor, carinho e compreensão. Agradeço em especial ao meu irmão Fred, meus tios Edison e Bebeth e meus amores Tatá, Lili e Belis. Vocês são fundamentais e me dão forças para seguir em frente.

Ao meu amor, companheiro e melhor amigo, Junior, eu agradeço o amor, amizade, apoio, carinho e por ser meu refúgio. Obrigada por me ajudar em tudo que estive ao seu alcance e por estar comigo em todos os momentos. Meu mais profundo agradecimento por tudo.

Dentro da academia eu descobri pessoas que se tornaram também uma inspiração e um exemplo a ser seguido e tive a sorte de encontrar estas virtudes em minha orientadora, Adriana Abalen. Agradeço por ser exemplo de conduta, por cumprir para além o seu papel de me orientar, pelo conhecimento compartilhado, confiança, por torcer tanto por mim e me ajudar em tudo que estive ao seu alcance. Tenho um carinho enorme por você e muita gratidão por toda a sua contribuição para minha formação. O seu incentivo me fez acreditar que eu posso sempre ir mais longe e não duvidar do meu potencial e suas críticas construtivas me ensinaram a reconhecer minhas limitações e me ajudaram (e ainda ajudam) a melhorar sempre. Obrigada por tanto!

Aos meus colegas do LINC, Ana Carolina, Ana Flávia, Evelyn e Guilherme, eu agradeço pela companhia, pela troca de conhecimento e experiências, pelas contribuições, pelo carinho e todos os momentos compartilhados. Em especial, agradeço à Ana Flávia e Evelyn, por me permitirem auxiliá-las durante a iniciação científica e por toda ajuda.

Aos colegas da pós-graduação, agradeço imensamente pela oportunidade de conhecê-los! Nossas rodas de conversa ajudaram muito nesta reta final. Agradeço, em especial, aos

colegas que compõem o Trem Bão é Ciência. Fico muito feliz e muito esperançosa ao ver essa geração de cientistas empenhados que vocês são.

Agradeço às meninas da coleta no Hospital das Clínicas, Fernandinha, Dani, Ju, Lídia e Ana Cristina. Além das companhias sempre agradáveis, as experiências que compartilhamos foram importantes para o meu trabalho, bem como as discussões engrandecedoras sobre a Pré-eclâmpsia.

Às minhas amigas e companheiras da vida Bruna, Núbia, Raíssa, Marina e Thaís. Vocês são leveza e alegria na minha caminhada.

À minha amiga e companheira de profissão Gabriela Ramos, por me ouvir com paciência, me entender e me ajudar.

Pela ajuda na execução de alguns experimentos e disponibilidade de uso de equipamentos e infraestrutura, agradeço aos professores e alunos do Laboratório de Genética de Populações, Laboratório de Diversidade Genética Humana, Laboratório de Genética Celular e Molecular, Laboratório de Genética de Microrganismos, Laboratório de Genética Humana e Médica e ao Laboratório de Tecnologia Genética do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução; do Laboratório de Micologia, Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Laboratório de Apoio Multi-usuário da Microbiologia, Laboratório de Biologia Celular e Molecular e ao Laboratório de Vírus.

Agradeço à professora Karina Braga Gomes Borges por nos apresentar o projeto da pré-eclâmpsia e nos auxiliar e incentivar a abrir essa linha de pesquisa no laboratório.

Agradeço à equipe do Laboratório de Imunobiologia da Inflamação, da Universidade Federal de Ouro Preto, por me receberem tão bem. Em especial, agradeço à Luíza Perucci e ao Guilherme de Paula Costa, pela ajuda nos experimentos de ELISA e à Luíza por me disponibilizar as amostras e dados que utilizei neste trabalho.

Ao Anderson Santos da Rocha pela gentileza de me ajudar na leitura das placas de ELISA.

Ao Dr. Alex Fiorini, pela ajuda com a maceração dos tecidos para extração de RNA.

Às professoras Dra. Luci Dusse e Dra. Patrícia Alpoim, por disponibilizarem as amostras e por toda a ajuda durante o mestrado.

Ao professor Dr. Giovanni Cassali, pelas lâminas histológicas e experimentos de imuno-histoquímica.

À professora Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite agradeço por nos ceder as amostras de placenta e à sua aluna de doutorado Simone Fátima Gomes de Oliveira por coletá-las e pela solicitude em ajudar.

Aos professores Dra. Karina Braga Gomes Borges, Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse, Dr. Marcelo Rizzatti Luizon e Dra. Patrícia Nessralla Alpoim pela gentileza de aceitar nosso convite para compor a banca avaliadora e pelas contribuições.

Aos mestres que passaram pela minha trajetória e contribuíram enormemente para o meu crescimento e conhecimento.

À UFMG, instituição de excelência e motivo de muito orgulho para mim.

Ao ICB e à Pós-graduação em Genética pela oportunidade.

A todos os funcionários do ICB pela ajuda e manutenção. Em especial, agradeço à Dona Selminha, pelas risadas, descontrações e carinho.

À coordenação da Pós-graduação em Genética e secretárias, pelos serviços prestados e pela disponibilidade em ajudar.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

Às agências de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e Adriana Abalen, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

A Deus, por me guiar e proteger e por me dar forças para seguir.

Gratidão por todos que de alguma forma me ajudaram a trilhar este caminho, contribuíram para o meu crescimento e me deram voto de confiança. Dizer obrigada com amor é pouco para uma emoção que, com palavras, dificilmente seria traduzida!

*"Estou entre aqueles que pensam que a ciência tem uma grande beleza.
Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele é como uma
criança confrontando fenômenos naturais que o impressionam tanto
quanto os contos de fadas."*

Marie Curie

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma doença multifatorial sistêmica que ocorre a partir da vigésima semana de gestação em mulheres previamente normotensas. É caracterizada por hipertensão arterial acompanhada de uma ou mais das seguintes condições: proteinúria, trombocitopenia, insuficiência renal, função hepática prejudicada, edema pulmonar e sintomas cerebrais. O desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos tem sido considerado fundamental para o desenvolvimento da PE. Dentre as moléculas responsáveis por regular o processo angiogênico em condições fisiológicas e patológicas, está o Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (FGF2), que é expresso pelas vilosidades do trofoblasto. A ação pró-angiogênica de FGF2 pode ser inibida pela proteína de fase aguda Pentraxina 3 (PTX3). A ligação altamente específica de PTX3 ao FGF2 impede o engajamento deste fator aos seus receptores específicos e impede a sinalização a partir desta via, inibindo as atividades biológicas mediadas por FGF2, dentre elas a angiogênese. Na PE, tanto a concentração plasmática de PTX3 como de FGF2 já foram descritas como aumentadas, entretanto não está claro o envolvimento destas moléculas e os impactos de sua interação no estado antiangiogênico característico da doença. Considerando que os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento da PE ainda são obscuros, a importância da angiogênese na progressão da doença, a ação pró-angiogênica de FGF2 e sua inibição por PTX3, torna-se relevante estudar a correlação de PTX3 e FGF2 no contexto da PE. O objetivo deste trabalho foi avaliar a concentração plasmática e placentária de PTX3 e FGF2 em gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia e correlacionar estes níveis de entre si e com os aspectos clínicos da doença. Trata-se de um estudo do tipo caso-controle que utilizou 19 amostras de mulheres não gestantes, 42 de gestantes normotensas e 43 de gestantes com PE. Detectamos por ELISA sanduíche que as concentrações de PTX3 e de FGF2 encontradas no plasma de gestantes com PE no último trimestre da gestação são significativamente maiores ($p < 0,05$) do que as presentes no plasma das gestantes normotensas. Os níveis elevados de PTX3 no plasma de gestantes com PE não apresentam diferença significativa que permita a discriminação entre os quadros de PE precoce e tardia. FGF2, por sua vez, é um fator cuja concentração no plasma das gestantes que desenvolveram PE precoce foi, em média, 2 vezes maior (37,45 pg/mL) daqueles observados no plasma tanto das gestantes normotensas (15,77 pg/mL, $p = 0,004$) quanto com PE tardia (13,08 pg/mL). PTX3 e FGF2 se comportam de forma independente e não foi encontrada correlação entre a concentração plasmática desses fatores entre si e nem com outros fatores de risco para PE analisados, tais como primigestação e ganho de peso durante a gravidez. No entanto, a concentração da PTX3 apresentou correlação positiva com ANX1A, uma importante molécula pró-resolutiva da inflamação. Nossos achados corroboram, em mulheres brasileiras, com os dados de outros autores que apontam para o aumento da concentração de PTX3 e FGF2 na PE. Nossos dados mostram, de maneira inédita, o aumento dos níveis plasmáticos de FGF2 na PE precoce e a correlação entre a concentração de PTX3 e ANX1A no plasma de gestantes com PE. Os resultados aqui apresentados servem como base para a realização de outros estudos buscando avaliar o potencial preditivo de FGF2 e PTX3 e elucidar o papel biológico dessas moléculas na PE.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a systemic multifactorial disease that occurs from the twentieth week of gestation in previously normotensive women. It is characterized by arterial hypertension accompanied by one or more of the following conditions: proteinuria, thrombocytopenia, renal failure, impaired liver function, pulmonary edema and neurological symptoms. The imbalance between pro and antiangiogenic factors has been considered fundamental for the development of PE. Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) is one of the molecules expressed by the villi of the trophoblast and responsible for regulating the angiogenic process in physiological and pathological conditions. The highly specific interaction of FGF2 with the acute phase protein Pentraxin 3 (PTX3) prevents the engagement of FGF2 to its specific receptors and impair the biological activities FGF2-dependent, including angiogenesis. Some studies report the increased levels of PTX3 and FGF2 in plasma and sera of pregnant women that developed PE. However, it is not clear the involvement of these molecules and the impact of their interaction on the characteristic antiangiogenic state of the disease. Considering that the pathophysiological mechanisms that lead to the development of PE are still unclear, the importance of angiogenesis in the progression of PE, the pro-angiogenic action of FGF2 and its inhibition by PTX3, it is relevant to study the correlation between PTX3 and FGF2 in the context of PE. The aim of this study was to evaluate the plasma and placental concentration of PTX3 and FGF2 in normotensive and pre-eclamptic pregnant women, to correlate these levels with each other and with the clinical aspects of the disease. This is a case-control study that used 19 samples from non-pregnant women, 42 from normotensive pregnant women and 43 from pregnant women with PE. We detected by sandwich ELISA that the concentrations of PTX3 and FGF2 in the plasma of pregnant women with PE at the final third trimester of pregnancy are significantly higher ($p < 0.05$) than those present in the plasma of normotensive pregnant women in the same period of gestation. The higher levels of PTX3 in the plasma of pregnant women with PE do not allow the discrimination between early and late PE. On the other hand, the concentration of FGF2 in the plasma of pregnant women who developed early PE was on average 2 times higher (37.45 pg / mL) than those observed in both the plasma of normotensive (15.77 pg / mL, $p=0.002$) and pregnant women with late PE (13.08 pg / mL, $p=0.004$). PTX3 and FGF2 behave independently and no correlation was found between the plasma concentration of these factors and neither with other risk factors for PE analyzed, such as primigestation and weight gain during pregnancy. However, the concentration of PTX3 has shown a positive correlation with that of ANX1A, an important pro-resolving molecule of inflammation. Our findings together corroborate, in Brazilian women, data from other authors that point out the increased concentration of PTX3 and FGF2 in PE. Our data show, in an unprecedented way, the plasma levels increase of FGF2 in early PE and the correlation between the concentration of PTX3 and ANX1A in the plasma of pregnant women with PE. The results presented here serve as a basis for carrying out other studies seeking to evaluate the predictive potential of FGF2 and PTX3 and to elucidate the biological role of these molecules in PE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da placenta.....	24
Figura 2 - Remodelamento anormal da artéria espiralada característico da Pré-eclâmpsia.	26
Figura 3 - Esquema integrado da fisiopatologia da pré-eclâmpsia.....	30
Figura 4 - Sinalização mediada pelo sistema FGF/FGFR	31
Figura 5 - Mecanismo de ação da Pentraxina 3 e da Proteína C-reativa.....	34
Figura 6 - Interação PTX3/FGF2 e FGF2/ TNFAIP6 na modulação da angiogênese	35
Figura 7 - Concentração plasmática de FGF2 e PTX3 durante a gestação normal e em pré-eclâmpsia	51
Figura 8 – Impacto do tratamento com glicocorticoide sobre as concentrações de PTX3 no plasma de gestantes	52
Figura 9 - Concentração de FGF2 e PTX3 no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia precoce e tardia	53
Figura 10 - Correlação entre níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2	54
Figura 11 - Comparação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 em mulheres com fatores de risco para pré-eclâmpsia	55
Figura 12 - Avaliação dos níveis de FGF2 e PTX3 no plasma de gestantes normotensas e com PE em diferentes períodos da gestação.....	58
Figura 13 - Níveis plasmáticos de FGF2 e PTX3 em cada uma das gestantes normotensas acompanhadas em Estudo Longitudinal	59
Figura 14 - Níveis plasmáticos de FGF2 e PTX3 em cada uma das gestantes com PE acompanhadas em Estudo Longitudinal	60
Figura 15 - Histologia da placenta de normotensa e PE.....	61
Figura 16 – Análise da Integridade do RNA total extraído das amostras de placenta de gestantes normotensas e com PE provenientes do Estudo Transversal 2.....	63
Figura 17 - Análise eletroforética do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das amostras de placenta	63
Figura 18 - Expressão gênica de PTX3, FGF2, IL1B, TNFA, KDR, FLT-1, VEGFA e FGFBP em placentas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de amostras em cada período de gestação do Estudo Longitudinal	42
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na análise de expressão gênica por RT-qPCR	46
Tabela 3 - Dados clínicos das mulheres do Estudo Transversal 1.....	48
Tabela 4 - Dados clínicos das mulheres do Estudo Transversal 2.....	49
Tabela 5 - Dados clínicos das mulheres do Estudo Longitudinal.....	49
Tabela 6 - Correlação entre os níveis de PTX3 e FGF2 e de outros marcadores em amostras de plasma de mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia	56
Tabela 7 - Quantificação e estimativa da contaminação por proteínas e sais nos RNAs totais extraídos de fragmentos de placenta.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	microlitro
AAS	Ácido Acetilsalicílico
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ADAM-12	<i>Disintegrin and metalloproteinase-12</i>
ANOVA	Análise de variância
ANXA1	Anexina A1
AT1-AA	Receptor da angiotensina II tipo 1
BAD	<i>BCL-2 antagonist of cell death</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEC	Células endoteliais circulantes
CRP	Proteína C-reativa
CXCL4	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 4</i>
DE	Disfunção endotelial
dL	Decilitro
dNK	<i>Natural Killers</i> deciduais
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing fator</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ET-1	Endotelina 1
Febrago	Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FGFBP	Proteína de Ligação a Fator de Crescimento do Fibroblasto
FGFR	Receptor de Fator do Crescimento do Fibroblasto
FHEMIG	Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FLT1	<i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
FOXO	<i>Forkhead Box Class O</i>
FRS2A	<i>FGFR substrate 2 alpha</i>
Fw	Iniciador <i>Forward</i>
GAB1	<i>GRB2-associated binding protein 1</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GCs	Glicocorticoides
GPG	Ganho de peso na gestação
GRB2	Fator de Crescimento Ligado ao Receptor
h	Horas
HE	Hematoxilina-Eosina
HELLP	Hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa de plaquetas
HIF1A	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 subunit alpha</i>
HIF2A	<i>Hypoxia Inducible Factor 2 subunit alpha</i>

HLA-C	antígeno leucocitário humano
HRP	<i>Horsedish peroxidase</i>
HSPG	Proteoglicano heparan sulfatados
IG	Idade Gestacional
IL17	Interleucina 17
IL1B	Interleucina 1 beta
IL2	Interleucina 2
IL6	Interleucina 6
INGF	<i>Interferon gamma</i>
ISSHP	<i>International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy</i>
IV	Intravenosa
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LXA4	Lipoxina A4
mg	Miligramas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
mm3	Milímetros cúbicos
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanogramas
NG	Não gestante
NK	<i>Natural Killers</i>
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
NT	Normotensa
N-terminal	Extremidade amino-terminal de uma proteína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAPP-A	<i>Pregnancy-associated plasma protein A</i>
PAS	Pressão Arterial Sistólica
Pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Pré-eclâmpsia
PF4	<i>Platelet Factor 4</i>
pg	Picogramas
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina 2
pH	Potencial Hidrogeniônico

PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PP-13	<i>Placental protein-13</i>
PRM	Padrões moleculares
PTX3	Pentraxina 3
RAS	<i>Rat Sarcoma Virus GTPase</i>
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT	Transcrição Reversa
RT-PCR	Reverse transcription PCR
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
Rv	Iniciador <i>Reverse</i>
SAP	Componente Amiloide P do Soro
sENG	Endoglina solúvel
sFLT1	<i>Soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
sVCAM-1	<i>Circulating vascular cell adhesion molecule-1</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGFB	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFAIP6	Proteína 6 induzida por TNF
TSG-6	Proteína 6 induzida por TNF
TXA2	Tromboxano A2
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Pré-eclâmpsia.....	20
1.1.1 Envolvimento da placenta na patogênese da pré-eclâmpsia.....	23
1.1.3 Efeitos maternos e mecanismos sistêmicos	28
1.1 Fator de crescimento de fibroblasto 2.....	29
1.2 Pentraxina 3 (PTX3)	33
1.3 PTX3 e Pré-eclâmpsia.....	36
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	38
3. HIPÓTESE	38
4. OBJETIVO GERAL.....	38
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6. METODOLOGIA.....	39
6.1 Fluxograma de trabalho	39
6.2 Amostras de plasma de gestantes com PE – Casuística.....	40

6.3	ELISA para quantificação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2	42
6.4	Coleta de placenta	44
6.5	Análise histológica das placentas	45
6.6	Análise do perfil de expressão gênica de PTX3 e FGF2 na placenta	45
6.6.1	Extração de RNA.....	45
6.6.2	Síntese de cDNA	45
6.6.3	PCR em tempo real.....	46
6.7	Análises estatísticas	47
7.	RESULTADOS	48
7.1	Dados Clínicos	48
7.2	ELISA para quantificação de PTX3 e FGF2	50
7.2.1	Avaliação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 na PE	50
7.2.2	Avaliação da concentração plasmática de PTX3 em gestantes com PE que faziam uso de GCs durante a gestação	51
7.2.3	Avaliação dos níveis de PTX3 e FGF2 no plasma de gestantes com PE precoce e PE tardia.....	52
7.2.4	Correlação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2	54
7.2.5	Correlação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 e fatores de risco para PE	54
7.2.6	Correlação entre níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 e outros marcadores plasmáticos	56
7.2.7	Avaliação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 nas amostras do Estudo Longitudinal.....	56
7.3	Análise histológica da placenta.....	60

7.4	Análise do perfil de expressão gênica.....	62
7.4.1	Extração de RNA.....	62
1.1.1	Transcrição reversa.....	62
1.1.2	Expressão gênica relativa	64
2.	DISCUSSÃO	65
3.	RESUMO DOS RESULTADOS.....	76
4.	CONCLUSÃO.....	77
5.	PERSPECTIVAS.....	77
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma complicação multissistêmica exclusiva da gestação. Afeta de 4 a 5% de gestantes no mundo e é a principal causa de morbidade e mortalidade materna e perinatal ¹. Cerca de 76.000 mulheres e 500.000 neonatos morrem por ano em decorrência da PE e a mortalidade é maior em países subdesenvolvidos ². De acordo com a *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* (ISSHP), a PE é definida como hipertensão (pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg) a partir da vigésima semana de gestação, em mulheres previamente normotensas, acompanhada de, pelo menos, um dos seguintes sintomas: proteinúria (≥ 300 mg/24h), evidências de disfunção em órgãos maternos (insuficiência renal aguda – creatinina ≥ 90 $\mu\text{mol/L}$ ou 1 mg/dL; dano hepático – elevação de transaminases), complicações hematológicas (trombocitopenia, hemólise), complicações neurológicas (estado mental alterado, cegueira, acidente vascular encefálico, dor de cabeça severa e escotoma visual persistente) ou disfunção uteroplacentária (como crescimento fetal restrito, Doppler da artéria umbilical anormal ou natimorto) ².

Já é bem estabelecido na literatura o envolvimento de alguns fatores de risco maternos epidemiológicos e clínicos com o desenvolvimento da PE, como histórico familiar (mãe ou irmã), predisposição genética, pouco contato da mulher com o fluido seminal e/ou esperma do parceiro, primigestação, primipaternidade, idade materna avançada (acima de 35 anos), etnia afrodescendente ou sul-asiática, gravidez múltipla, longo intervalo entre gestações, fertilização *in vitro*, PE em gestação prévia, gravidez molar e outras comorbidades maternas (*diabetes mellitus*, hipertensão crônica, obesidade, doença renal crônica, histórico de lesão renal aguda ou lúpus eritematoso sistêmico) ^{1,2}.

A gravidade da PE está relacionada com a idade gestacional em que as primeiras manifestações clínicas são detectadas, o que subdivide a classificação da doença em dois subgrupos: PE precoce, com sintomas surgindo antes da 34^a semana e PE tardia, com início após a 34^a semana de gestação ³. Alguns estudos relatam que a PE precoce e tardia são entidades diferentes da doença, com mecanismos fisiopatológicos divergentes, sendo a PE precoce menos frequente e muito associada à forma clinicamente mais grave, com maior risco de recorrência em gestações subsequentes e mau prognóstico para a gestante e o feto ⁴. O

desenvolvimento da PE precoce é caracterizado por uma invasão trofoblástica superficial, placentação anormal e remodelamento inadequado das artérias espiraladas, que compreende o primeiro estágio da doença, com aumento dos níveis de marcadores de disfunção endotelial (DE) e desequilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos. Na PE precoce observa-se, em muitos casos, a hipóxia tecidual na placenta e no feto, crescimento intrauterino restrito, tamanho placentário reduzido e maior incidência de parto prematuro ⁵.

A PE tardia ocorre em 75-80% de todos os casos de PE e está frequentemente associada às morbidades maternas (diabetes, obesidade, hipertensão crônica, etc). Na PE tardia a placentação é normal, mas as demandas do feto e da placenta são maiores do que a oferta, resultando em uma resposta placentária que desencadeia as características clínicas da doença. Geralmente o recém-nascido tem peso regular e o volume da placenta é normal ⁵. O mau prognóstico da doença está associado à pressão arterial maior que 160/110 mm Hg e proteinúria maior ou igual a 2 g/24h, sendo esses sinais clínicos um alerta para maior risco do desenvolvimento de condições mais graves como a eclâmpsia, falha renal e hepática e a síndrome HELLP (hemólise, enzimas hepáticas elevadas e baixa de plaqueta) ⁶.

Apesar de alguns marcadores serem amplamente estudados como preditores da PE, eles ainda não são incorporados de forma rotineira na prática clínica, tendo em vista as limitações decorrentes dos custos e da sensibilidade destes. Dentre os marcadores mais bem caracterizados para utilização no primeiro ou segundo trimestres de gestação, inclui-se: PAPP-A (*Pregnancy-Associated Plasma Protein A*), ADAM-12 (*Disintegrin and Metalloproteinase-12*), sFLT1 (*soluble Fms-Like Tyrosine kinase-1*), PlGF (*Placental Growth Factor*) e PP-13 (*Placental Protein-13*). De acordo com o ACOG (*American College of Obstetricians and Gynecologists*) e a Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda-se que a predição da PE seja baseada na história clínica da paciente ^{7,8}.

É fundamental que a PE seja diagnosticada o quanto antes pela equipe médica e, sendo assim, ressalta-se a importância do acompanhamento durante o pré-natal. Alguns sinais podem servir como um alerta para o risco de desenvolver PE, como por exemplo o ganho de peso na gestação acontecendo de maneira rápida, edema de mãos e face, sinais e sintomas de comprometimento dos órgãos-alvo e níveis pressóricos alterados ⁹.

O grau de risco da paciente para o desenvolvimento da PE é avaliado através de triagem da história clínica e determinado pela presença de pelo menos um dos fatores de risco para a PE

já citados anteriormente. A intervenção recomendada que pode reduzir o risco de desenvolver PE pré-termo em aproximadamente 70% é o uso de ácido acetilsalicílico (AAS), quando administrado antes da 16ª semana de gestação, em doses iguais ou superiores 100 mg por dia ¹⁰.

Uma vez diagnosticada, o manejo da PE é dependente dos sinais e sintomas. O ACOG recomenda diretrizes clínicas padronizadas e baseadas em evidências, a fim de prevenir a morbimortalidade materna e perinatal ¹¹. Dentre as recomendações da ACOG, estão a utilização de medicamentos para tratamento de hipertensão sistólica e/ou diastólica grave ($\geq 160/110$ mmHg) nos períodos pré e pós-parto, a monitorização materna e fetal por equipe médica e o acompanhamento mesmo após a estabilização da pressão arterial, através de exames laboratoriais, principalmente aqueles relacionados a síndrome HELLP. No Brasil, de acordo com a Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (Febrasgo), recomenda-se o uso de medicamentos para o tratamento de hipertensão grave ($\geq 160/110$ mmHg), associado a um acompanhamento em centros de referência, para evitar as complicações ⁹. O uso de medicamento para controle dos níveis pressóricos na PE deve ser feito com cautela, uma vez que a redução excessiva e/ou brusca da PA melhora as condições circulatórias sistêmicas, mas prejudica a circulação uteroplacentária. Assim, a perfusão da placenta dificultada devido a PA mais baixa pode contribuir negativamente para o fornecimento de nutrientes e oxigênio para o feto, comprometendo seu crescimento ⁹. Além disso, deve-se considerar o nível de segurança dos medicamentos anti-hipertensivos, uma vez que todos os existentes atualmente atravessam a barreira placentária e alguns são fetotóxicos. Uma vez que o controle da PA é imprescindível, recomenda-se que a introdução dos medicamentos anti-hipertensivos ocorra sempre que a PA atingir níveis pontuais de ≥ 150 e/ou 100 mmHg, a persistência de níveis ≥ 140 e/ou 90 mmHg ou ainda se houver manifestações dos sintomas na gestante ¹². A ISSHP preconiza que o tratamento tem como objetivo manter a PA diastólica em torno de 85 mmHg.

Qualquer que seja o anti-hipertensivo escolhido deve-se monitorar a PA para evitar quedas bruscas, hipotensão e redução demasiada da perfusão uteroplacentária. Os medicamentos de primeira escolha recomendados pela ACOG são Labetalol e Hidralazina por via intravenosa (IV) e Nifedipina oral de liberação imediata quando o acesso IV não for possível. No entanto, no Brasil, o Labetalol não está disponível e o Ministério da Saúde recomenda, além da Nifedipina e Hidralazina, o Nitroprussiato de Sódio, caso Nifedipina ou Hidralazina não forem eficazes ¹².

O Sulfato de Magnésio também é utilizado no manejo da PE, pois previne de maneira mais segura e eficaz as convulsões, que são sinais de evolução para o quadro grave de eclâmpsia¹³⁻¹⁶. A administração de sulfato de magnésio é preconizada sempre que houver a iminência de eclâmpsia e em pacientes com PE com sinais de gravidade, como a PA de difícil controle e síndrome HELLP⁹.

O Ministério da Saúde recomenda que o parto vaginal seja preferível à cesárea para gestantes com PE, de maneira que o estresse causado pela cirurgia seja evitado em uma situação de alterações fisiológicas provocadas pela doença. Além disso, para gestações longe do termo nas quais o parto é indicado (< 34 semanas), o uso de medicamentos glicocorticoides (GCs) é recomendado para acelerar a maturação pulmonar do feto¹². A cura da PE se dá com o parto e remoção completa da placenta, ressaltando a importância desta na etiologia da doença.

1.1.1 Envolvimento da placenta na patogênese da pré-eclâmpsia

A placenta é um órgão maternofetal responsável pela troca de nutrientes e oxigênio entre a mãe e o feto, que possui um aporte sanguíneo volumoso para suprir estas necessidades. O sangue da mãe e do feto geralmente não se misturam e a nutrição fetal é feita através do cordão umbilical, que conecta as circulações placentária e fetal (figura 1). A placenta possui uma face materna, derivada do endométrio, e uma face fetal, que é caracterizada pelo desenvolvimento do saco coriônico, membrana fetal mais externa. A placenta e as membranas fetais têm como função nutrir, proteger, excretar, produzir hormônio e respirar.

O desenvolvimento inicial da placenta é caracterizado por uma rápida proliferação de trofoblastos e invasão da decídua (endométrio do útero de uma mulher grávida). Ao final da quarta semana de gestação, uma rede complexa de vasos é estabelecida e o crescimento no tamanho e na espessura da placenta segue até aproximadamente a 18ª semana de gestação. Quando as vilosidades coriônicas avançam pela decídua basal, o tecido é degradado para progressão do espaço intervilosos. Com isso, formam-se os septos placentários, que darão origem aos cotilédones e em cada cotilédone, são formadas as vilosidades-tronco e suas ramificações, estruturas placentárias que possibilitam as trocas realizadas entre o sangue materno e o fetal. O sangue materno perfunde a placenta através das artérias espiraladas, que estão distribuídas na decídua basal (figura 1, A e B) e descarregam o sangue no espaço intervilosos¹⁷.

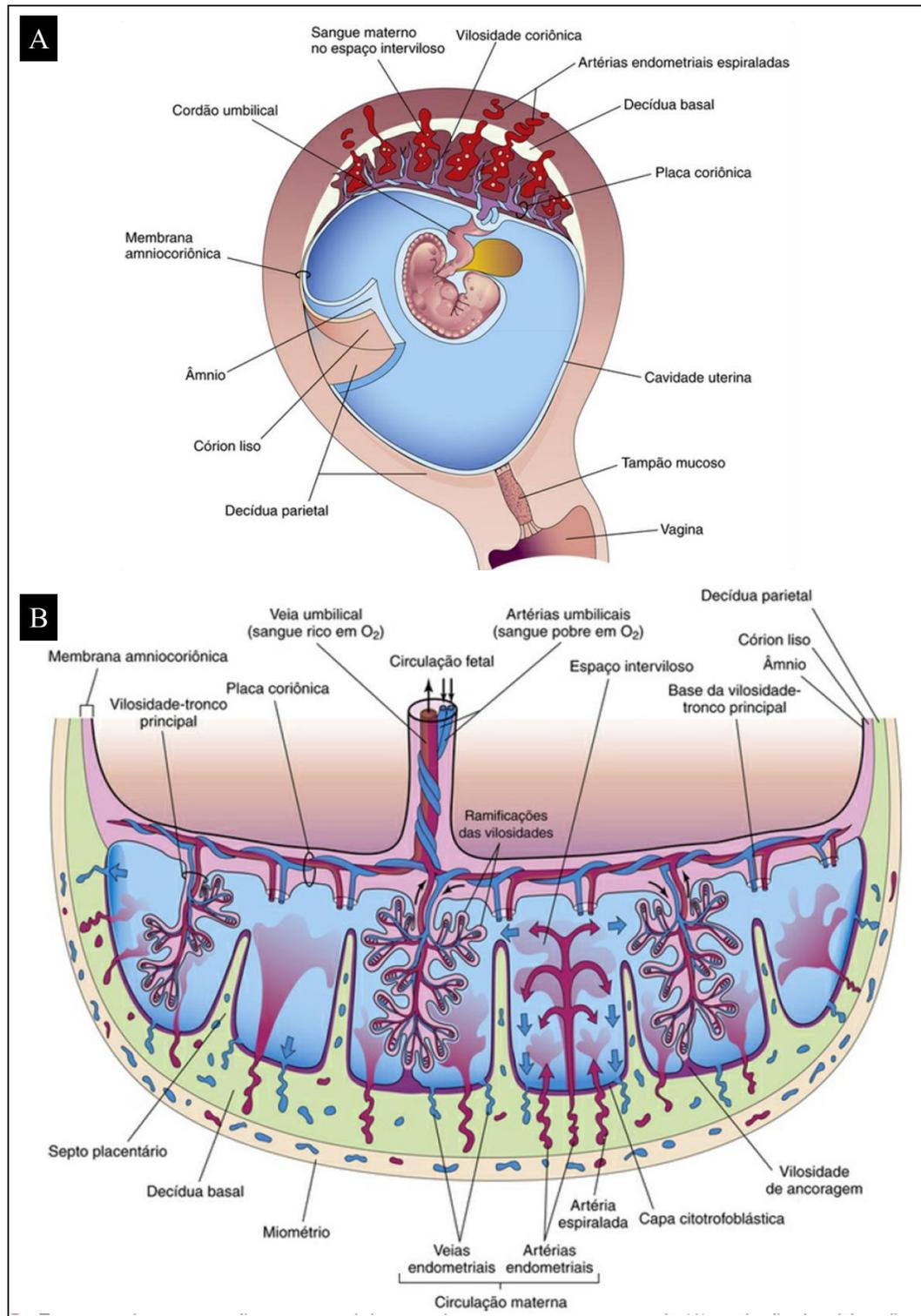


Figura 1 - Estrutura da placenta

Esquema de secção sagital do útero na 4ª semana de gestação mostrando a placenta fixa na decídua e as membranas fetais. B. Secção transversal da placenta a termo mostrando a o córion viloso (parte fetal da placenta) e a decídua basal (parte materna da placenta). Também está representado na figura a circulação placentária fetal e materna. As artérias umbilicais transportam sangue fetal pouco oxigenado (azul) para a placenta e veias umbilicais levam o sangue oxigenado (vermelho) para o feto. (Fonte da figura: Embriologia clínica / Keith L. Moore, T.V.N (Vid) Persaud, Mark G. Torchia; tradução Adriana de Siqueira et al. - 10. ed. - Rio de Janeiro: Elsevier, 2016)

Embora os mecanismos precisos que levam ao desenvolvimento da PE ainda não estejam completamente elucidados, sabe-se que a placenta possui um papel central na patogênese da doença. A hipótese principal é a de que a PE resulte de uma isquemia placentária, que faz com que haja liberação de sinalizadores capazes de induzir as manifestações clínicas. Esse conceito surge do fato de que infartos placentários sejam comumente observados em placentas de pacientes com PE ¹⁸.

Durante a gestação normal, o fluxo sanguíneo uterino aumenta, de modo que a perfusão dos espaços intervilosos da placenta possibilite o suprimento do crescimento fetal, fornecendo os nutrientes maternos necessários advindos do sangue ¹⁹. O aumento do fluxo sanguíneo só é possível devido ao fenômeno fisiológico de transformação das artérias espirais do útero, um processo caracterizado pela invasão dos trofoblastos na parede arterial. Esta invasão destrói a camada média e transforma as artérias espirais de vasos de diâmetro estreito, de baixo fluxo e alta resistência para vasos de grande diâmetro, alto fluxo e baixa resistência, permitindo assim a perfusão adequada da placenta (figura 2) ²⁰. Na PE, a inserção no miométrio da artéria espiralada não ocorre de maneira eficiente durante o primeiro trimestre, o que gera um quadro isquêmico na placenta devido ao aporte sanguíneo reduzido ²¹. Além disso, artérias espirais que não foram transformadas são mais propensas ao espessamento da camada média, caracterizada por necrose fibrinóide da parede arterial, infiltrado perivascular mononuclear e presença de macrófagos carregados de lipídios no lúmen ¹⁸. Mecanismos moleculares que medeiam a remodelação da artéria espiralada ainda estão em debate. Alguns estudos sugerem que durante a placentação normal, os citotrofoblastos diferenciam-se de um fenótipo epitelial para um fenótipo endotelial e este processo é chamado de “pseudovasculogênese” ou “mimetismo vascular”, que vem sendo demonstrado como uma transformação que não ocorre na PE ^{22,23}. Os citotrofoblastos não invasivos falham em expressar marcadores de adesão endotelial, como a VE-caderina e as integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha V\beta 3$, que são expressas nos citotrofoblastos de característica invasiva. Essas anormalidades descritas na PE sugerem que os mecanismos que desencadeiam a isquemia placentária são acionados muito cedo na gravidez e, portanto, a placentação defeituosa e a transformação das artérias espirais estão fortemente relacionadas com a patogênese da PE ¹.

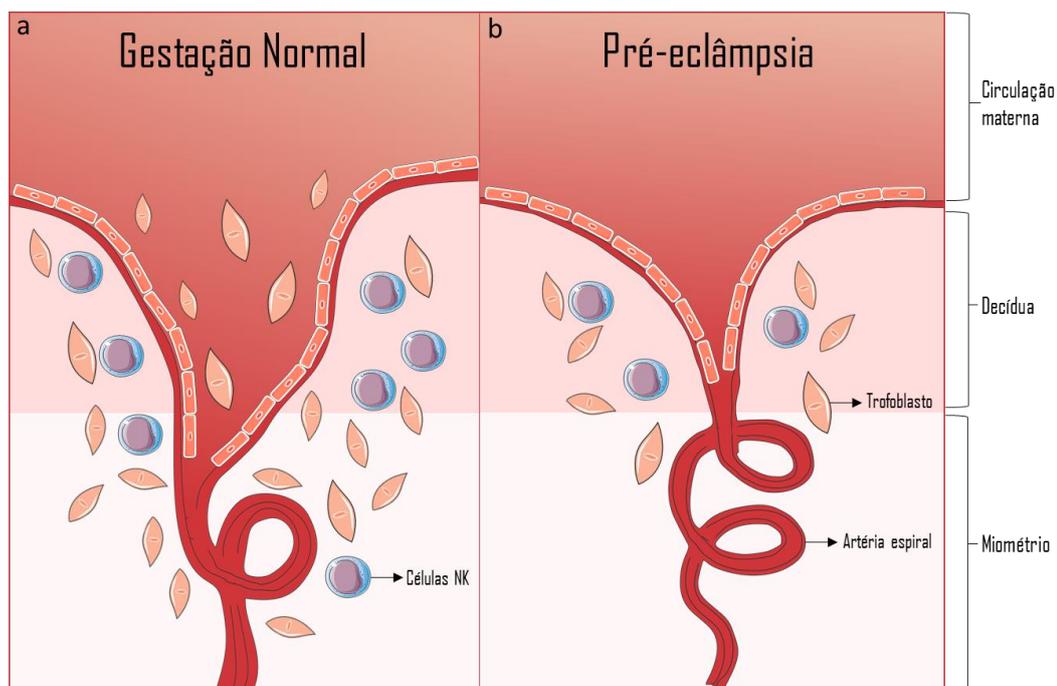


Figura 2 - Remodelamento anormal da artéria espiralada característico da Pré-eclâmpsia.

a. Na gestação normal, a transformação fisiológica da artéria espiral e a invasão do miométrio é observada. As células trofoblásticas se estendem tanto ao segmento inserido na decídua quanto ao segmento miometrial, no qual a inserção é de pelo menos um terço. Tanto a parte interna da artéria quanto o endotélio são invadidos e destruídos pelos trofoblastos, o que faz com que aumente o calibre dos vasos e conseqüentemente o aporte sanguíneo na placenta em formação. **b.** Na pré-eclâmpsia, uma característica fundamental é a falta de invasão dos trofoblastos no segmento miometrial da artéria espiralada. Esta falha resulta em artérias estreitas, perturbação do fluxo sanguíneo placentário e perfusão sanguínea insuficiente.

Nos estágios iniciais da implantação, quando a nutrição do blastocisto é feita através de glândulas endometriais (nutrição histotrófica), o saco gestacional está em um ambiente com baixa tensão de oxigênio, o que favorece a proliferação dos trofoblastos^{18,24}. Um estudo utilizando explantes de vilosidades da placenta humana de 5 a 8 semanas de gestação identificou uma baixa tensão de oxigênio nesta etapa do desenvolvimento gestacional e um conseqüente aumento do fator HIF1A (*Hypoxia Inducible Factor 1 subunit alpha*), que é um regulador da homeostase de oxigênio²⁵. Os níveis de HIF1A se mantêm elevados até a 9ª semana de gestação, que é quando a circulação e a oxigenação começam a aumentar. Níveis persistentemente elevados de HIF1A após a 9ª semana podem indicar estresse placentário e podem ser preditivos para o desenvolvimento da PE²⁶. Rajakumar e colaboradores, em 2003, demonstraram que placentas de mulheres que tiveram PE superexpressam HIF1A e HIF2A e a expressão aumentada persiste após a oxigenação²⁷. Além disso, em estudos feitos em fêmeas grávidas de camundongos que superexpressavam HIF1A, demonstrou-se que várias características da PE eram observadas, como a PA elevada, proteinúria, restrição de crescimento fetal, endoteliose glomerular, síndrome HELLP e níveis elevados de fatores

antiangiogênicos, como sFLT1 e endogлина solúvel (sENG) ²⁸. Com os estudos feitos até hoje, pode-se concluir que o HIF1A parece ser um mediador da PE, embora as causas de sua expressão persistente na placenta ainda não estejam completamente elucidadas ¹.

Além da isquemia e da hipóxia, o estresse oxidativo também ocorre na interface materno-fetal e o seu papel importante e fundamental no desenvolvimento placentário, tanto o normal quanto o defeituoso vem sendo demonstrado. No início de uma gestação normal, no ponto do desenvolvimento feto-placentário onde o fluxo sanguíneo da placenta começa (~ 9 semanas), ocorre uma regressão normal das vilosidades periféricas que envolve mecanismos de estresse oxidativo e apoptose ²⁹. Na PE, parece haver um desequilíbrio entre mecanismos anti e pró-oxidantes e esse desequilíbrio tem sido associado ao remodelamento anormal da artéria espiralada característica da PE, que por sua vez, está relacionado com lesões causadas por repetidos episódios de isquemia-reperusão da placenta ³⁰.

A tolerância imunológica necessária na interface mãe-placenta é também importante para o entendimento da patogênese da PE. As células *natural killers* decíduais (dNK) têm um papel crucial no remodelamento da artéria espiralada ³¹. As dNK são células com características distintas e únicas que as diferenciam das NK do sangue periférico. As células dNK estão em contato direto com células trofoblásticas e acredita-se que elas regulam a sua invasão, além de secretarem fatores promotores de angiogênese e migração trofoblástica ³². Estudos *in vivo* mostraram que a injeção de células dNK em camundongos imunocomprometidos reduziu a resistência da artéria uterina, sugerindo uma melhor placentação, uma vez que a ativação apropriada das células dNK é essencial para a placentação normal ³². Outro aspecto da imunidade envolvido na PE é o complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células trofoblásticas fetais expressam o antígeno leucocitário humano (HLA-C), que interage com receptores KIRs (*Killer-cell immunoglobulin-like receptor*) das células NK (*Natural Killer*) ³³. O HLA-C é herdado da mãe e do pai e estudos sugerem que a placentação normal requer um reconhecimento total dos HLA-C paternos pelos KIRs maternos. Desta forma, alteração de paternidade, períodos curtos de coabitação sexual e uso de contracepção de barreira estão relacionados à menor exposição ao antígeno paterno e consequentemente ao aumento da incidência de PE na primeira gestação ³³⁻³⁵. Finalmente, a ativação do complemento sucede o desbalanço angiogênico e tem sido relacionada à restrição do crescimento fetal intra-uterino decorrente da PE e a desfechos graves da PE, como a síndrome HELLP ^{36,37}.

1.1.3 Efeitos maternos e mecanismos sistêmicos

Conforme citado anteriormente, a PE é uma doença multissistêmica, ou seja, não se limita à placenta, se estende para efeitos generalizados observados na mãe que podem progredir para severos danos a órgãos como fígado, rim e cérebro ¹. Dentre os efeitos sistêmicos observados na mãe, podemos ressaltar a hipertensão, DE e desbalanço angiogênico.

A hipertensão que ocorre na PE é mediada por fatores antiangiogênicos e auto anticorpos para o receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1-AA) ^{38,39}. Os níveis de AT1-AA não regridem totalmente após o parto e podem contribuir para o aumento do risco cardiovascular observado em mulheres com histórico de PE ⁴⁰. Além disso, os níveis de endotelina 1 (ET-1), um potente vasoconstrictor, são encontrados elevados na PE ⁴¹ e a hipertensão e a lesão renal foram demonstradas como mediadas pela ativação do sistema endotelina ⁴².

É característico de uma gestação normal o aumento da função endotelial, que é importante para um desenvolvimento gestacional saudável ⁴³. Em contraste, na PE observa-se uma disfunção das células endoteliais de maneira sistêmica, hipertensão, endoteliose glomerular (que causa lesão renal e proteinúria) e endoteliose cerebral (que pode levar a quadros convulsivos e edema) ^{43,44}. Células endoteliais circulantes (CEC) e fatores produzidos por essas células são frequentemente usados como marcadores de lesão endotelial. Estudos demonstram que as CEC estão aumentadas na PE, além de outros marcadores de DE, como a sVCAM-1 (*Circulating vascular cell adhesion molecule-1*) e a E-selectina. As células endoteliais liberam vários fatores que promovem relaxamento vascular, como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e EDHF (*Endothelium-derived hyperpolarizing fator*), bem como fatores que causam contração vascular, como ET-1 e tromboxano A₂ (TXA₂) ⁴⁵⁻⁴⁸. Um equilíbrio entre os fatores relaxantes e contráteis é ideal para manter o tônus vascular e um desbalanço entre esses fatores, caracterizado por uma diminuição de fatores relaxantes e um aumento de fatores contráteis, acarreta na DE na PE ⁴⁹.

Outro efeito sistêmico materno importante é o desequilíbrio angiogênico. A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e é um processo essencial para o desenvolvimento embrionário ¹. Diversos estudos correlacionam a PE com um estado anti-angiogênico, sendo os principais e mais bem caracterizados fatores anti-angiogênico na PE o sFLT1 e o sENG, que funcionam em sinergismo e cujos níveis aumentados são correlacionados ao mau prognóstico da doença ^{50,51}. A ação antiangiogênica

promovida por sENG, que tem sua produção induzida pela hipóxia, tem relação com a inibição da ligação de TGFB (*Transforming Growth Factor beta*) com os receptores das células endoteliais, o que compromete a produção de NO ⁵². Os níveis excessivos de sFLT1 produzidos na placenta e liberados na circulação materna induzem a DE, levando aos sinais e sintomas da PE ¹. sFLT1 é um variante solúvel do receptor VEGFR1 (*Vascular endothelial growth factor receptor*) que se liga às proteínas pró-angiogênicas VEGF e ao PlGF e impede a ligação destes aos seus receptores endógenos ⁵³. Além disso, os níveis de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) e PlGF são relatados como diminuídos na PE, o que contribui ainda mais para o estado antiangiogênico da doença e para as manifestações clínicas mais graves ¹. VEGF é uma citocina pró-angiogênica produzida por macrófagos, linfócitos T, células tumorais e pelo citotrofoblasto, que tem um papel importante na angiogênese e vasculogênese e na regulação da síntese do NO ⁵⁴. PlGF é um fator angiogênico pertencente à família VEGF e possui importantes funções no desenvolvimento embrionário, principalmente na vasculogênese ⁵⁵. A razão sFLT1/PlGF é descrita como um potente preditivo de gravidade da doença e risco elevado de desenvolver PE, indicando que o desequilíbrio angiogênico causado por esses dois fatores é importante para o manejo da doença ⁵⁶. Na figura 3 está representado um resumo esquemático da fisiopatologia da PE.

1.1 Fator de crescimento de fibroblasto 2

A angiogênese é um processo importante, de várias etapas, que é essencial para muitos contextos tanto fisiológicos quanto patológicos tais como o desenvolvimento embrionário, cicatrização, inflamação e câncer ⁵⁷. Durante a angiogênese, as células endoteliais ativadas destroem a membrana basal, migram e se proliferam, de maneira que pequenos brotamentos de células endoteliais começam a surgir e posteriormente dão origem às alças vasculares ^{58,59}. A ativação das células endoteliais se deve a um fino equilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos liberados por diferentes tipos de células perivasculares ⁵⁹.

Vários fatores produzidos pelas células estão envolvidos no processo da angiogênese, sendo os principais o VEGF e membros da família FGF. O Fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) é o membro da família FGF com maior ação pró-angiogênica e o mais bem caracterizado ⁶⁰.

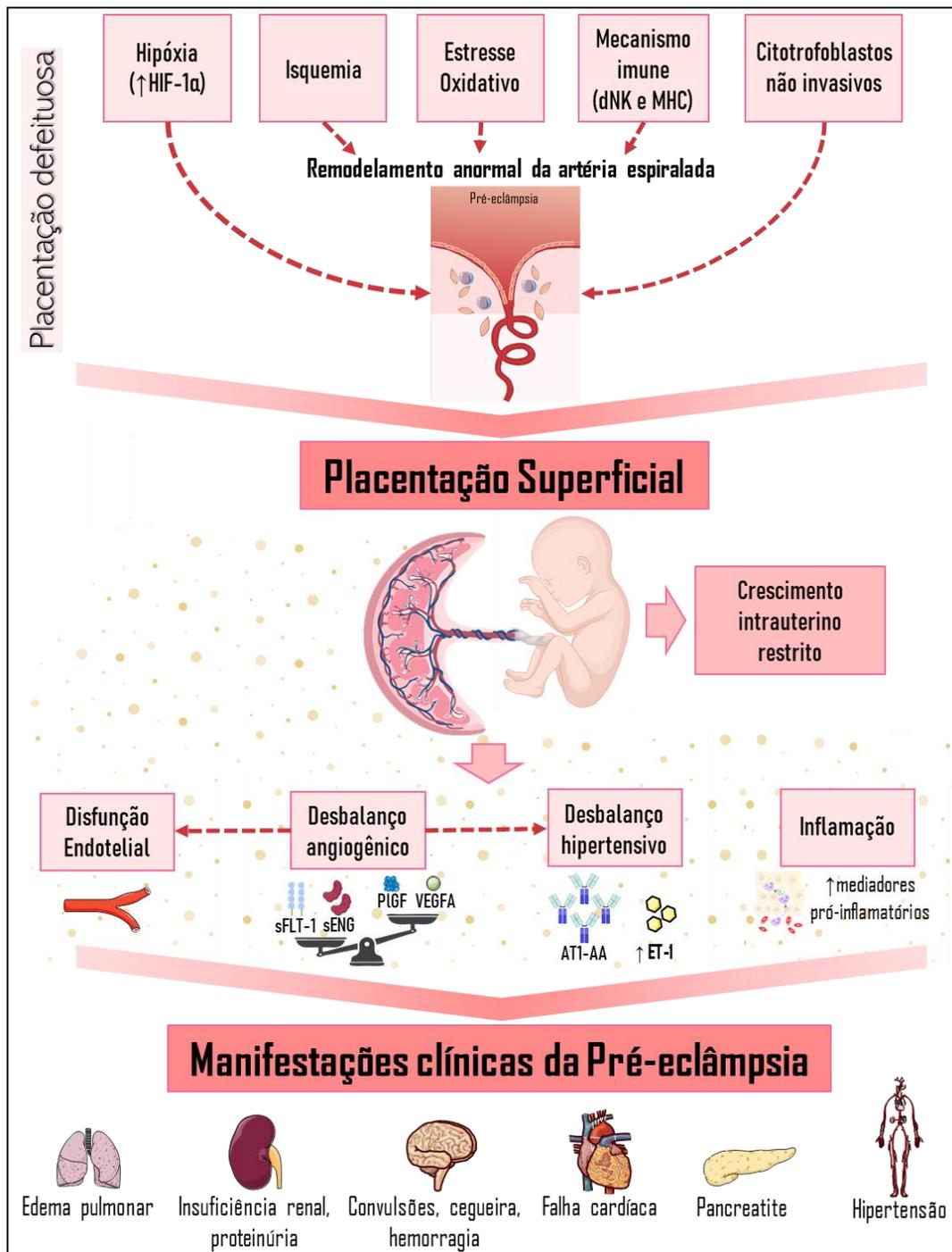


Figura 3 - Esquema integrado da fisiopatologia da pré-eclâmpsia

Fatores genéticos e ambientais desencadeiam uma série de processos pós-concepção e desenvolvimento feto-placentário, tais como hipóxia, isquemia, estresse oxidativo, mecanismos imunes e invasão dos citotrofoblastos insuficiente que têm relação com o remodelamento anormal da artéria espiralada e, por sua vez, desencadeiam uma placentação superficial. O grau de isquemia uterina é determinado pela gravidade da placentação defeituosa e pela demanda do feto por aporte sanguíneo. A pré-eclâmpsia ocorre como resultado de respostas adaptativas que envolvem a liberação de mediadores pró-inflamatórios, auto anticorpos anti-AT1, fatores anti-angiogênicos (como sFLT1 e sENG), mediadores da DE e hipertensão. Em conjunto, esses fatores induzem todas as manifestações clínicas da pré-eclâmpsia, que podem resultar em lesões e danos aos órgãos vitais.

FGF2 foi identificado pela primeira vez na década de 1980 como um fator de crescimento de ligação à heparina^{61,62}. O FGF2 exerce atividades pleiotrópicas nas células alvo, incluindo células endoteliais, interagindo com proteoglicanos heparanossulfatados de superfície celular (HSPGs) e com receptores de tirosina-quinase de alta afinidade (FGFRs)⁶³. O engajamento de FGF2 aos seus receptores específicos promove a dimerização destes e a autofosforilação de seu domínio tirosina-quinase intracelular, ativando assim as vias complexas de transdução de sinal (figura 4)⁶⁴. A perda da sinalização de FGF nas células endoteliais resulta em uma permeabilidade celular aumentada e compromete a integridade dos vasos sanguíneos⁵⁷.

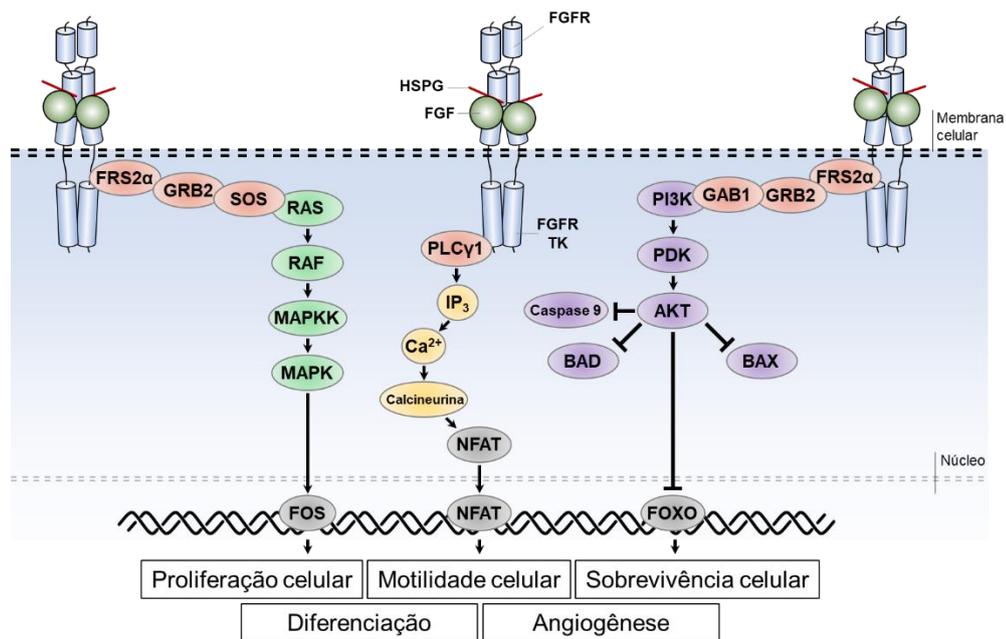


Figura 4 - Sinalização mediada pelo sistema FGF/FGFR

A ligação de FGF ao seu receptor (FGFR) induz a formação de um dímero de FGFRs, promovendo uma transfosforilação de seus domínios quinase. O FGFR ativado torna-se capaz de ativar outros substratos intracelulares por fosforilação, desencadeando diferentes vias de sinalização e gerando diversas respostas celulares. Os principais substratos de FGFR são FRS2A (FGFR *substrate 2 α*) e a PLCY1 (*phospholipase Cγ-1*). FRS2A, quando ativo, se liga à proteína adaptadora Fator de Crescimento Ligado ao Receptor (GRB2), que recruta SOS ou GAB1 (GRB2-associated binding protein 1). Por sua vez, SOS ativa RAS (GTPase), que inicia ativação da cascata da MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*). MAPK ativada se transloca do citoplasma para o núcleo, onde fosforila fatores de transcrição, para promover a transcrição de genes específicos. O resultado dessa via é principalmente a proliferação celular, mas também estimulação da diferenciação e migração celular. GAB1 ativa a quinase AKT (*protein Kinase B*) que, por sua vez, inativa efetores pró-apoptóticos, como BAD (BCL-2 antagonist of cell death) e os fatores de transcrição FOXO (*forkhead box class O*), promovendo sobrevivência celular. O recrutamento e fosforilação de PLCY1 estimulam vias de sinalizações que participam na migração e diferenciação celular, podendo ter influência nas vias MAPK e AKT. A via por PLCY1 ativa NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*) que promove a expressão de genes relacionados à motilidade celular. (Fonte da figura: Nunes, 2018⁶⁵)

Na gestação, o crescimento dos vasos sanguíneos placentários começa aproximadamente 21 dias após a concepção ^{66,67}. A placenta humana é rica em fatores envolvidos no processo angiogênico, que desempenham um importante papel na regulação da formação de vasos placentários e também na adaptação vascular materna à gravidez ⁶⁸. FGF2 é expresso nas vilosidades do trofoblasto ⁶⁹ e, na pré-eclâmpsia, os níveis séricos de FGF2 foram descritos como elevados por Kurz em 2001 e por Hohlagschwandtner e colaboradores em 2002. No entanto, os estudos correlacionando FGF2 e pré-eclâmpsia ainda são escassos ^{70,71}.

Evidências têm apontado um papel inflamatório na angiogênese, sugerindo uma dependência destes dois processos em condições fisiológicas e patológicas devido aos mediadores e vias de sinalização comuns ^{72,73}. Durante uma resposta inflamatória, citocinas que promovem a inflamação podem apresentar propriedades angiogênicas que, juntamente com os fatores de crescimento e proteases, contribuem para a formação de novos vasos ^{74,75}. Os vasos recém-formados, por outro lado, ajudam a sustentar a inflamação, pois facilitam o recrutamento das células inflamatórias para o local ⁷⁶⁻⁷⁸. Em doenças que possuem como característica uma resposta inflamatória e angiogênese como, por exemplo, o câncer, níveis elevados de FGF2 são encontrados ⁷⁹.

Vários tipos celulares que são importantes para a resposta inflamatória, também têm sido considerados essenciais na angiogênese ⁸⁰⁻⁸³: monócitos ⁸⁴, linfócitos T ⁸¹, macrófagos ⁸⁵, células dendríticas e mastócitos ⁸⁶ expressam FGF2 e a presença destas células no local da inflamação pode implicar em uma resposta angiogênica associada à inflamação ⁸⁷. Além disso, os grânulos alfa-plaquetários liberam vários fatores angiogênicos, inclusive FGF2, que são liberados durante condições fisiológicas e patológicas ⁸⁸.

A produção e liberação de FGF2 a partir das células endoteliais pode ser desencadeada por mediadores inflamatórios, como a Interleucina 1 beta (IL1B), NO, prostaglandina E2 (PGE2) ⁸⁹ e Interleucina 2 (IL2) ⁹⁰. Um estudo de transcriptoma em células endoteliais microvasculares murinas demonstrou que a angiogênese induzida por FGF2 promove uma assinatura pró-inflamatória complexa no endotélio, com regulação positiva precoce de genes envolvidos na inflamação ⁷². Vários estudos sugerem que FGF2 pode ter atividade anti ou pró-inflamatória, a depender do contexto ⁵⁷. Por outro lado, a inflamação também pode interferir na ação angiogênica de FGF2 através da produção de moléculas que o sequestram e impedem sua ação. A CXCL4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4) também conhecida como PF4 (*Platelet Factor 4*), é uma quimiocina liberada pelos grânulos de plaquetas ativadas

capaz de se ligar a FGF2, inibindo sua ligação aos seus receptores e inibindo, portanto, as vias de sinalização desencadeadas por este fator e, conseqüentemente suas funções biológicas⁹¹. Outro exemplo de inativação das vias de FGF2 por interação proteína-proteína é a promovida pela Pentraxina 3 (PTX3), uma proteína com funções na resposta inflamatória e na imunidade inata, que também se liga com alta especificidade a FGF2 e impede sua ação⁵⁷.

1.2 Pentraxina 3 (PTX3)

A PTX3 é uma proteína de fase aguda, evolutivamente conservada, pertencente à família das pentraxinas. As pentraxinas compartilham uma porção C-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos, conhecida como o domínio pentraxina. Dentro dessa região, encontra-se uma sequência amplamente conservada de 8 aminoácidos (HxCxS/TWxS, em que x é um aminoácido qualquer) que é chamada de assinatura das pentraxinas⁹².

De acordo com o tamanho da sequência de aminoácidos na porção N-terminal, a superfamília das pentraxinas é subdividida em dois grupos: pentraxinas curtas e pentraxinas longas. A PTX3 é o protótipo das pentraxinas longas⁹³ com um domínio N-terminal inédito⁹⁴. Proteína C-reativa (CRP) e o componente Soro-amilóide P (SAP) são as pentraxinas curtas mais bem caracterizadas e constituem as principais proteínas de fase aguda em humanos e camundongos, respectivamente, sendo sintetizadas primariamente no fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, principalmente a Interleucina 6 (IL6)^{95,96}.

A PTX3 foi identificada no início da década de 1990^{93,97} como uma molécula cuja produção é estimulada pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFA) e pela Interleucina 1 beta (IL1B)⁹⁷ em fibroblastos e monócitos humanos, respectivamente. Diferentemente das pentraxinas curtas CRP e SAP, PTX3 não tem sua produção estimulada pela IL6. Além disso, PTX3 não é produzida no fígado como as pentraxinas curtas CRP e SAP, mas sim diretamente nos sítios de inflamação⁹⁸ por uma variedade de tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais, células da musculatura lisa, células epiteliais renais, alveolares, adipócitos, condrócitos, sinoviócitos, fagócitos mononucleares, cardiomiócitos, células da granulosa e do *cumulus* ovariano e, principalmente, por células dendríticas mieloides (Figura 5)^{93,98-104}.

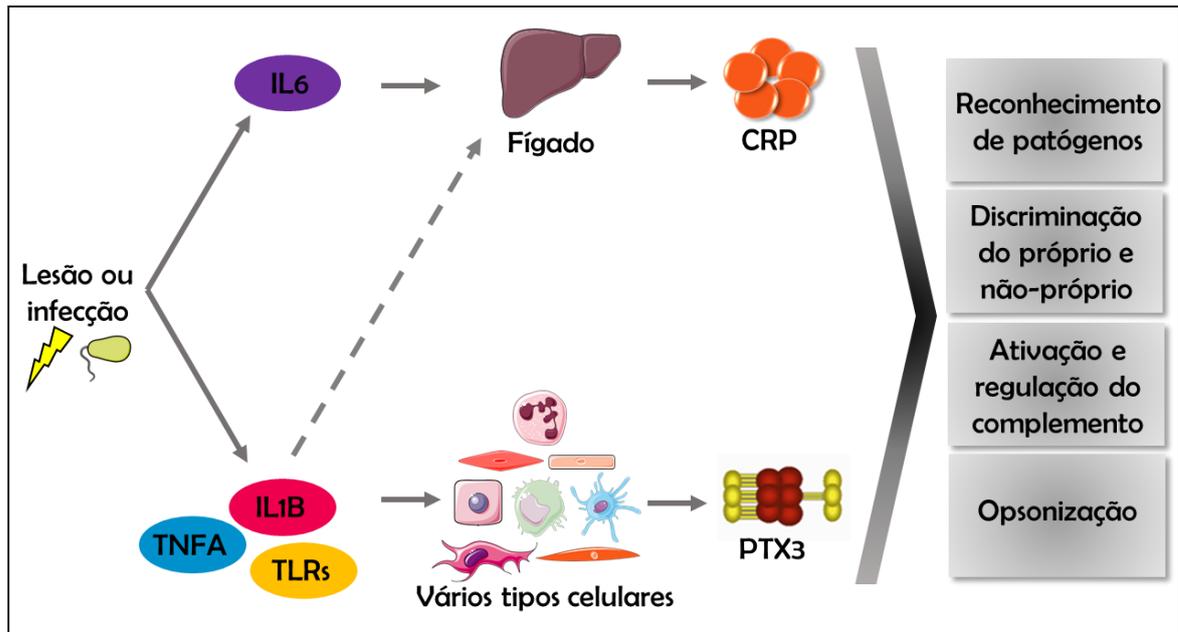


Figura 5 - Mecanismo de ação da Pentraxina 3 e da Proteína C-reativa

Em resposta a uma infecção ou lesão tecidual, são liberadas algumas citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IL6, IL1B e TNFA. Essas citocinas, por sua vez, estimulam a produção de outras proteínas. IL6 é a principal citocina promotora da produção da Proteína C-reativa (CRP) pelo fígado, enquanto TNFA, IL1B e agonistas dos receptores do tipo toll (TLRs) estimulam a produção de PTX3 diretamente no sítio da infecção ou inflamação. TNFA e IL1B também podem induzir a transcrição de CRP, embora de maneira menos acentuada que IL6. Uma vez produzidas, CRP e PTX3 participam de muitas funções biológicas na resposta imune inata e inflamatória, como reconhecimento de patógenos, discriminação do próprio e não-próprio, ativação e regulação do complemento e de processos de opsonização.

O gene da PTX3 em humanos está localizado no cromossomo 3q25 e é organizado em 3 éxons, sendo que os dois primeiros codificam para o peptídeo sinal e a porção N-terminal da proteína e o último éxon para a porção C-terminal ¹⁰⁵. A PTX3 é uma glicoproteína de 381 aminoácidos que se organiza estruturalmente como um octâmero assimétrico de 340 kDa, organizados em dois tetrâmeros compostos por oito protômeros idênticos e ligados por pontes dissulfeto intra e intercadeias ^{96,106}.

PTX3 é uma proteína com funções imunorreguladoras e inflamatórias. Conforme já citado anteriormente, ela se liga à FGF2 através de seu domínio N-terminal único, na proporção estequiométrica de uma molécula de PTX3 para duas de FGF2 (Figura 5). O octâmero de PTX3 contém dois sítios de interação com FGF2 e, quando ligados, impede a formação do complexo FGF2/FGFR, inibindo, portanto, a ativação das células endoteliais e a angiogênese promovidas por FGF2 ^{107,108}. Estudos demonstram que a porção mínima de PTX3 necessária pela ligação com FGF2 é uma sequência de 5 aminoácidos (pentapeptídeo acetilado ARPCA) que corresponde as posições de 100 a 104 da proteína PTX3 ^{109,110}. Um importante inibidor

desta interação PTX3/FGF2 é a proteína 6 induzida por TNF (TNFAIP6 ou TSG-6), expressa em resposta a estímulos pró-inflamatórios e em processos de neovascularização por linfócitos, células da musculatura lisa e células endoteliais ¹¹¹. TNFAIP6 se liga também à porção N-terminal de PTX3 e inibe a ligação de FGF2, revertendo o poder inibitório da angiogênese exercida por PTX3 via FGF2 ⁵⁷ (Figura 6).

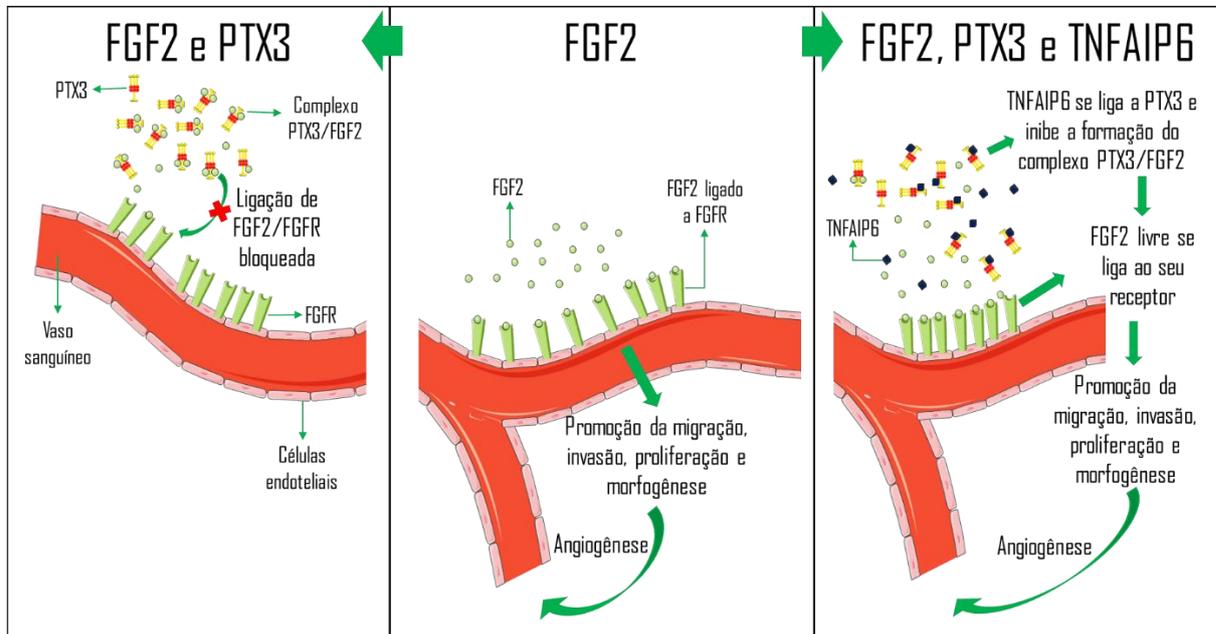


Figura 6 - Interação PTX3/FGF2 e FGF2/ TNFAIP6 na modulação da angiogênese

FGF2 se liga aos seus receptores transmembranares em células endoteliais e promove a migração, invasão, proliferação e morfogênese, culminando em um processo conhecido como angiogênese. Quando na presença de PTX3, esta molécula sequestra duas moléculas de FGF2 e impede sua ligação aos seus receptores, inibindo assim a angiogênese promovida por FGF2. Por outro lado, TNFAIP6 compete com FGF2 pela ligação aos mesmos sítios na molécula de PTX3, bloqueando o efeito inibitório de PTX3 sobre as ações biológicas de FGF2.

Na imunidade, PTX3 desempenha uma função não redundante como um receptor de reconhecimento de padrões moleculares (PRM) na detecção de patógenos, como bactérias, fungos e alguns vírus ¹¹². Além disso, PTX3 interage com moléculas chave para ativação e/ou inativação do complemento, sendo capaz de modular as três vias (clássica, alternativa e via da lectina) ^{113–116}.

PTX3 também possui importantes funções na inflamação, na cicatrização e na fertilidade feminina. Na inflamação, observa-se um papel dual. Em um dos estudos do nosso grupo utilizando camundongos transgênicos que carregam cópias aumentadas do gene PTX3, foi verificado que esta proteína confere maior resistência à toxicidade do LPS e à infecção causada pela técnica de perfuração e ligadura do ceco, em comparação aos camundongos do

tipo selvagem ¹¹⁷. Entretanto, em alguns casos, a produção aumentada de PTX3 pode levar a efeitos danosos, como mostramos no modelo de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior, onde foi detectada maior lesão tecidual e aumento de mortalidade nos animais transgênicos para PTX3 ¹¹⁸. Essa dualidade de papéis de PTX3, a depender do contexto e da natureza da lesão, ficou bem evidente no estudo *in vivo* empregando camundongos transgênicos com maior expressão de Ptx3 em modelo de infecção experimental por *Klebsiella pneumoniae*. Nos animais infectados com dose baixa da bactéria, a produção elevada de Ptx3 promove um efeito protetor, resultando em uma maior sobrevivência desses animais. No entanto, quando os mesmos camundongos foram desafiados com grande inóculo da bactéria, foi observada uma resposta inflamatória exacerbada, associada a maior injúria tecidual e maior taxa de mortalidade ¹¹⁹. Com relação ao papel de PTX3 na cicatrização, estudos descrevem funções desta proteína na regeneração de feridas na pele, lesão pulmonar e hepática e trombose ¹²⁰.

Na fertilidade feminina, PTX3 interage com proteínas da matriz extracelular, tais como o inibidor inter- α -tripsina e a proteína TNFAIP6. Esta ligação é importante para a organização da matriz viscoelástica rica em ácido hialurônico do *cumulus oophorus*, que é produzida por células do *cumulus* e depositada em torno do oócito no folículo pré-ovulatório, sendo esta matriz essencial para uma fertilização bem sucedida ^{105,113,121,122}. Camundongos nocautes para Ptx3 apresentam subfertilidade nas fêmeas devido à instabilidade da matriz do *cumulus* ^{121,122}.

Em condições normais, os níveis plasmáticos da proteína PTX3 em humanos são baixos (~2 ng/mL), mas aumentam rapidamente em condições patológicas, como infecções e inflamações (até 800 ng/mL em condições de sepse). Os níveis de PTX3 aumentam ligeiramente na gestação normal a partir do primeiro trimestre, possivelmente devido ao estado inflamatório sistêmico associado à gravidez ¹²³. Níveis plasmáticos maternos aumentados de PTX3 na PE já foram reportados, provavelmente devido à DE e à inflamação exacerbada típicas da PE ¹²⁴.

1.3 PTX3 e Pré-eclâmpsia

A PTX3 é produzida por células potencialmente envolvidas em doenças cardiovasculares, em particular as células endoteliais, células da musculatura lisa e macrófagos e está envolvida na disfunção endotelial (DE) e inflamação vascular ¹²⁵. PTX3 diminui a produção de NO pela via MMP-1, que desencadeia a DE e potencializa a vasoconstrição da musculatura lisa, sendo essas duas características tipicamente envolvidas no aumento da resistência vascular observada na hipertensão ^{126,127}. Na PE, PTX3 vem sendo associada à DE e à inflamação

exacerbada características da doença. Cetin e colaboradores reportaram em 2006 que os níveis de PTX3 estão elevados em soro de mulheres com PE, sugerindo um papel causal ou consequential nas complicações hipertensivas da gravidez ¹²⁸. Em outro estudo prospectivo caso-controle realizado com 90 mulheres entre a 11^a e a 14^a semana de gestação, foi analisado o plasma das pacientes e observado o desfecho da gravidez. Níveis plasmáticos de PTX3 mais elevados foram encontrados nas 16 mulheres que vieram a desenvolver PE, sugerindo que PTX3 pode ser um importante preditivo de PE e um biomarcador em potencial para condutas de prevenção dos sintomas mais graves da doença ¹²⁹. Confirmando a hipótese deste estudo de níveis plasmáticos no primeiro trimestre de gestação, um trabalho posterior do tipo longitudinal também reportou níveis séricos aumentados de PTX3 já no primeiro trimestre de gestação em mulheres que posteriormente desenvolveram PE (16 gestantes) e a concentração de PTX3 no soro destas mulheres se manteve constante durante a gestação, sem variações durante os períodos avaliados (1^o, 2^o e 3^o trimestres de gestação), mas sempre maior quando comparados com o encontrado em gestantes normotensas ¹³⁰. Os resultados destes estudos sugerem que a DE e a resposta inflamatória exacerbada, mecanismos nos quais PTX3 está intimamente envolvida, precedem o início clínico da PE e reiteram o potencial de PTX3 como biomarcador preditivo da ocorrência da doença ¹³⁰.

Estudos demonstram que PTX3 pode ter uma relação também com a gravidade da PE, uma vez que foram encontrados níveis de PTX3 mais altos no plasma de mulheres que desenvolveram PE precoce quando comparados com os níveis plasmáticos de PTX3 nas mulheres com PE tardia, sugerindo uma resposta inflamatória mais intensa na forma mais grave da doença. Além disso, neste mesmo estudo, avaliando as gestantes durante a gestação e após 3-6 meses do parto, através da mensuração dos níveis plasmáticos de PTX3 e por medição da dilatação mediada por fluxo da artéria branquial, foi encontrada uma associação significativa entre os níveis elevados de PTX3 e a DE característica da PE ¹³¹.

PTX3 também já foi investigada em placentas de gestantes que desenvolveram PE. Na placenta, não foram encontradas diferenças entre a expressão de *PTX3* na PE quando comparadas com normais. Diferentemente de PIGF, VEGF-1 e sFLT1, que foram propostos como marcadores de função placentária ¹²⁹, PTX3 é considerada como um marcador das desordens maternas, tais como a inflamação e a DE ¹³¹. PTX3 foi localizada, através de imuno-histoquímica, predominantemente nas vilosidades de ancoragem, mas também em vilosidades tronco e na matriz de algumas vilosidades terminais e em macrófagos placentários

De modo geral, PTX3 é reportada como tendo uma função importante na PE, associada à DE e à inflamação exacerbada. Mais estudos são necessários para a elucidação dos mecanismos em que PTX3 está envolvida e com grupos amostrais maiores, além de abranger os diferentes grupos étnicos, a fim de melhor caracterizar o papel desta proteína na fisiopatologia da PE.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

PTX3 é uma proteína pró-inflamatória e alguns estudos relatam o aumento de sua expressão tanto no plasma quanto no soro de gestantes com PE, além de ser cogitada como um potencial biomarcador de gravidade da doença. PTX3 se liga com alta especificidade ao FGF2 e inibe a angiogênese mediada por este fator ^{107,132}. A angiogênese é um processo fundamental para o desenvolvimento embrionário e para a gestação normal e na PE ocorre uma deficiência na angiogênese que resulta na DE e, conseqüentemente, nas manifestações clínicas da doença. O envolvimento de PTX3 no desequilíbrio do processo angiogênico característico da PE, promovido por sua interação com FGF2, ainda não foi estudado. Tendo em vista que os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento da PE ainda são obscuros e a importância da angiogênese e da inflamação na progressão da doença, torna-se relevante este estudo que correlaciona a expressão de PTX3 e de FGF2 no contexto da PE buscando contribuir para a elucidação das bases moleculares da doença e na identificação de moléculas com potencial uso prognóstico.

3. HIPÓTESE

PTX3 contribui para o desenvolvimento da PE por aumentar a inflamação e inibir a angiogênese FGF2-dependente, podendo existir uma relação entre a concentração destes dois fatores e a fisiopatologia da doença.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de PTX3 e FGF2 no plasma e na placenta de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia e correlacionar os níveis plasmáticos destas proteínas com aspectos clínicos da pré-eclâmpsia.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

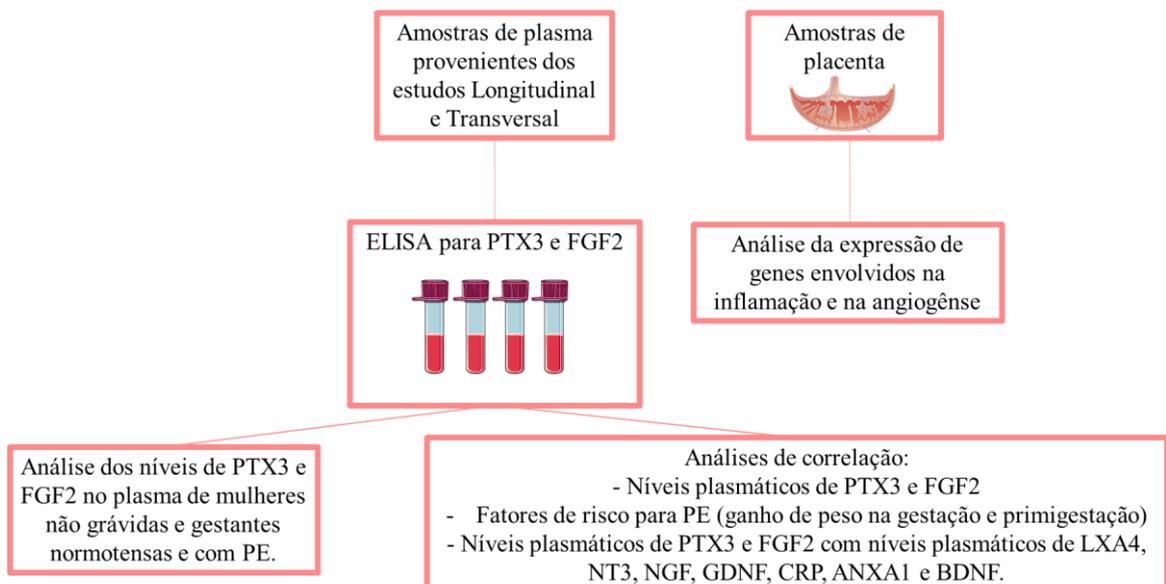
5.1 Fazer levantamento e tabelar os dados clínicos do grupo amostral;

5.2 Avaliar, por ELISA, os níveis de PTX3 e de FGF2 em amostras de plasma coletadas de mulheres não grávidas, gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia;

- 5.3 Correlacionar os níveis plasmáticos de PTX3 com os níveis de FGF2 nas gestantes com PE, normotensas e não gestantes;
- 5.4 Comparar as concentrações plasmáticas de PTX3 e FGF2 das gestantes com PE com os encontrados no plasma das gestantes normotensas e das mulheres não grávidas;
- 5.5 Analisar a interferência do tratamento com GCs sobre os níveis de PTX3 no plasma das gestantes com PE;
- 5.6 Comparar os níveis plasmáticos de PTX3 com os de FGF2 e correlacionar com outros marcadores inflamatórios e com os parâmetros clínicos de gestantes com PE e gestantes normotensas buscando estabelecer uma relação destes níveis com a PE precoce e PE tardia, ganho de peso na gestação e primigestação;
- 5.7 Analisar a histologia placentária de fragmentos provenientes de gestantes com PE e normotensas;
- 5.8 Avaliar, por RT-qPCR, a expressão gênica de PTX3 e de FGF2 nas amostras de placenta coletadas de gestantes normotensas e com PE;
- 5.9 Correlacionar os níveis de expressão gênica de PTX3 com os níveis de FGF2 nas placentas de gestantes com PE e compará-los com os encontrados na placenta das gestantes normotensas;
- 5.10 Comparar a expressão gênica placentária de gestantes com PE e normotensas de PTX3, FGF2 e outros genes inflamatórios.

6. METODOLOGIA

6.1 Fluxograma de trabalho



6.2 Amostras de plasma de gestantes com PE – Casuística

As amostras de plasma utilizadas neste trabalho foram provenientes de dois estudos doravante identificados como **Estudo Transversal 1**, **Estudo Transversal 2** e **Estudo Longitudinal**.

O Estudo Transversal 1 é um estudo do tipo caso-controle intitulado “Pré-eclâmpsia: inter-relação dos sistemas hemostático e inflamatório” coordenado pela Profa Luci Maria Sant’Ana Dusse e aprovado no comitê de ética da UFMG sob número de protocolo ETIC 0618.0.203.000-10. As amostras deste estudo foram coletadas nos hospitais Maternidade Odete Valadares (rede FHEMIG), Hospital Municipal Odilon Behrens, Hospital Público Regional de Betim e Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara em Betim. As amostras de plasma/EDTA foram coletadas pela então doutoranda Luíza de Oliveira Perucci, sob orientação das professoras Lirlândia Pires de Souza, Karina Braga Gomes Borges e Luci Maria Sant’Ana Dusse e armazenadas à -80°C até a presente data na Faculdade de Farmácia da UFMG e na Universidade Federal de Ouro Preto.

As participantes do **Estudo Transversal 1** foram selecionadas seguindo os critérios de exclusão: obesidade graus II e III, hipertensão crônica, diabetes, câncer, distúrbios de coagulação e doenças cardiovasculares, autoimunes, hepáticas, renais e infectocontagiosas.

Após a seleção, as gestantes foram subdivididas em três grupos, de acordo com critérios de inclusão, sendo eles:

Grupo 1: Gestantes com pré-eclâmpsia (n=30). Os critérios de inclusão foram PA $\geq 140/90$ mm Hg (aferida no mínimo em duas medidas com intervalo de 4 a 6 horas), proteinúria $\geq 0,3\text{g}/24\text{h}$ ou $\geq 1+$ (urina isolada) (na ausência de proteinúria, o diagnóstico de PE foi dado pelo surgimento de hipertensão e pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: trombocitopenia (contagem de plaquetas $<100.000/\text{mm}^3$); concentração sérica de creatinina superior a $1,1\text{ mg/dL}$ ou duplicação dos valores basais de creatinina na ausência de doença renal subjacente; disfunção hepática (duplicação das concentrações basais das transaminases hepáticas); edema pulmonar; sintomas visuais ou cerebrais) e 3º trimestre de gestação.

Grupo 2: Gestantes normotensas (n=26), cujos critérios de inclusão foram PA $\leq 120 \times 80$ mm Hg e 3º trimestre de gestação, ausência de proteinúria e sem histórico de PE.

Grupo 3: Mulheres não gestantes (n=20), cujos critérios de inclusão foram PA $\leq 120 \times 80$, ausência de proteinúria e sem histórico de PE.

As gestantes do Grupo 1 foram recrutadas no pré-parto da Maternidade Odete Valadares (rede FHEMIG), do Hospital Municipal Odilon Behrens, do Hospital Público Regional de Betim e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. As gestantes do Grupo 2 foram selecionadas do pré-parto ou durante a consulta do pré-natal da Unidade Básica de Saúde da Família Guanabara (Betim). As mulheres do Grupo 3 foram recrutadas enquanto faziam acompanhamento ou consultas médicas nas unidades de saúde já citadas anteriormente e as condições clínicas foram avaliadas, de maneira que foram selecionadas apenas mulheres que não se enquadravam nos critérios de exclusão deste estudo.

Todas as participantes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa no momento da seleção para o estudo e coleta de sangue, bem como assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram coletados, além das amostras de sangue, dados clínicos e laboratoriais das pacientes utilizando fichas individuais padronizadas e a partir de dados do cartão de pré-natal e/ou prontuário médico e entrevista.

O diagnóstico da PE foi feito pela equipe médica obstétrica nos hospitais em que as gestantes estavam com base nos critérios estabelecidos pela *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG).

No **Estudo Transversal 2**, foram utilizadas placentas provenientes do projeto intitulado “Associação de polimorfismos de genes de FTO (rs9939609), MC4R (rs17782313) eUCP-2 (rs659366) e adipocinas materna com parâmetros antropométricos e de desenvolvimento do recém-nascido”, CAAE 82125417.0.0000.5149 aprovado no comitê de ética em pesquisa da UFMG. Este estudo é coordenado pela professora Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite e as amostras foram gentilmente cedidas para a realização deste estudo. As placentas utilizadas em nosso trabalho foram coletadas por Simone Fátima Gomes de Oliveira, doutoranda do programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, no ano de 2019, nos hospitais Risoleta Tolentino Neves e Hospital Sofia Feldman, em Belo Horizonte. As gestantes foram recrutadas e informadas sobre os objetivos da pesquisa durante o pré-parto e assinaram o TCLE aprovado no respectivo projeto. O delineamento do estudo quanto aos critérios de exclusão e inclusão foram os mesmos citados para o Estudo Transversal 1 das amostras de plasma.

O **Estudo Longitudinal** foi desenvolvido na Faculdade de Medicina da UFMG e as amostras coletadas no Hospital das Clínicas da UFMG, sob coordenação da Dra. Eura Martins Lage. Todas as gestantes selecionadas possuíam fatores de risco para PE, sendo eles: PE em

gestação anterior, primipaternidade, etnia não branca, limite inferior da idade fértil (menores de 18 anos) e hipertensão prévia. Os critérios para diagnóstico de PE foram: mínimo de dois episódios de PA 140/90 mmHg e/ou proteinúria superior a 0,3 g/L em urina de 24 horas ou maior que (+) pelo método semi-quantitativo e/ou sintomas clínicos (edema nas mãos e face, cefaleia, distúrbios visuais, dor abdominal, náuseas e vômito). Foram coletadas amostras em 4 períodos da gestação, sendo eles:

- 12 a 19 semanas (A)
- 20 a 29 semanas (B)
- 30 a 34 semanas (C)
- Acima de 35 semanas (D)

Neste trabalho, foram utilizadas 55 alíquotas de amostras de plasma provenientes de 21 gestantes, coletadas e estocadas a -80°C . O número de amostras coletadas em cada período é mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Número de amostras em cada período de gestação do Estudo Longitudinal

	Gestantes Normotensas (n=12)	Gestantes que desenvolveram PE (n=9)
A	12	4
B	6	5
C	12	3
D	7	3

Embora tenham sido realizadas coletas em 4 períodos da gestação, nem sempre foram coletadas de cada gestante amostras nos 4 períodos. Sendo assim, apenas para uma das gestantes normotensas tivemos acesso às 4 coletas; de 5 gestantes temos as coletas A, B e C e de 6 gestantes as coletas A, C e D. De uma das gestantes que desenvolveram PE temos amostras das coletas A, C e D; de 2 somente as coletas B e C; de outras 2 as coletas B e D; de uma somente B e 3 somente A.

6.3 ELISA para quantificação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2

Os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 foram dosados por ELISA nas alíquotas de plasma provenientes do Estudo Transversal 1 e do Estudo Longitudinal, gentilmente cedidas pelas Dras. Luci Maria Sant'Ana Dusse, Patrícia Nessler Alpoim, Luíza de Oliveira Perucci e Eura Martins Lage. As amostras foram mantidas estocadas em freezer a -80°C . Para PTX3, foi utilizado o anticorpo policlonal MNB4 produzido e gentilmente cedido pela Dra. Cecilia Garlanda do Istituto Humanitas, Milão (Itália). Para a dosagem de FGF2 foi usado o kit *Human FGF basic DuoSet ELISA* da *R&D systems* (DY233-05).

Para o ELISA de PTX3, as placas de 96 poços *high binding* (SARSTEDT) foram sensibilizadas por 18h à 4°C com o anticorpo MNB4 (1 mg/mL) diluído 1:1000 em *coating buffer* (tampão pH 9,6, 159 mg Na₂CO₃ e 293 mg NaHCO₃ para cada 100 mL de água, com ajuste de pH feito com HCl) de maneira que a concentração final fosse 100 ng/poço. Depois da incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS 1X com 0,05% de Tween 20, pH 7) e foi adicionado o tampão de bloqueio (PBS 1X com 1% de BSA, pH 7) para bloquear sítios de ligação inespecíficos. Após 2h à temperatura ambiente, o procedimento de lavagem foi repetido por 2 vezes e uma alíquota de 50 µL de cada amostra de plasma EDTA foi incubada com 1 µL de Polybreno 2,5% (Sigma Aldrich) por 10 minutos à temperatura ambiente (o Polybreno favorece o reconhecimento de PTX3 pelo anticorpo). Decorrido este tempo, as amostras foram diluídas na proporção 1:5 em tampão diluente (PBS 1X com 2% de BSA, pH 7) e adicionadas nas placas, bem como o padrão, também diluído em tampão diluente. As concentrações de padrão foram 0,075; 0,15; 0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 ng/mL, para construção de uma curva de diluição e obtenção da equação da reta, utilizada no cálculo de concentração das amostras. Cada ponto da curva de diluição foi aplicado em duplicata. Após 2 horas à 37°C, os poços foram lavados por 2 vezes com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção pAb IgG de coelho biotilado (1 mg/mL) diluído 1:20.000 em tampão de lavagem foi adicionado, de maneira que a concentração final foi de 5 ng/poço e a placa foi incubada novamente à 37°C por 1 hora. Em seguida, a Estreptavidina conjugada com HRP (*horsedish peroxidase*) (R&D systems) foi adicionada, em uma diluição de 1:40 utilizando o tampão diluente, e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, para detecção do anticorpo biotilado adicionado no passo anterior. Em seguida, os poços foram lavados novamente por 3 vezes. Por fim, adicionou-se a solução de substrato contendo H₂O₂ e Tetrametilbenzidina (TMB) 1:1 (R&D systems) e, após 20 minutos, uma solução de parada da reação contendo 2N H₂SO₄ (R&D systems) foi adicionada, para interromper a formação da cor azul e converter em amarelo. Assim, imediatamente após a adição da solução de parada, as placas foram levadas para leitura em espectrofotômetro para microplacas Multiskan GO (Thermo scientific) no comprimento de onda de 450 nm. Todos os passos deste protocolo foram padronizados pelo grupo da Dra. Cecilia Garlanda, do Instituto Humanitas (Itália), que nos forneceu o kit.

No ELISA para detecção de FGF2, as placas de 96 poços *high binding* (SARSTEDT) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura anti-FGF2 humano, de maneira que cada poço continha 0,2 µg de anticorpo diluído em PBS 1X. Após incubação por 18h, os poços foram

lavados com tampão de lavagem (PBS 1X com 0,05% de Tween 20, pH 7.2-7.4) por 3 vezes. Em seguida, foi adicionado o reagente diluente (PBS 1X com 1% de BSA, pH 7.2 – 7.4) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido este tempo, os poços foram lavados novamente por 3 vezes e as amostras foram adicionadas em seus respectivos poços sem nenhuma diluição. Nesta etapa, adicionou-se também o padrão, nas diluições de 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128 pg/mL, em duplicata técnica para cada placa feita. A placa foi então colocada sob uma agitação moderada de 300 rpm em Thermomixer 5350 (Eppendorf) por 2 horas na temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas novamente por 3 vezes e o anticorpo de detecção anti-FGF2 humano biotilado diluído em reagente diluente foi adicionado nos poços, de maneira que a quantidade final de anticorpo por poço fosse 250 ng/mL. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente sob agitação de 300 rpm, as placas foram lavadas por 3 vezes e a estreptavidina conjugada com HRP (*R&D systems*) foi adicionada na diluição 1:40 em reagente diluente e incubada por 20 minutos. Da mesma forma que no protocolo para o ELISA de PTX3, adicionamos a mesma solução de substrato por 20 minutos e, em seguida, a solução de parada. Imediatamente após a adição da solução de parada, as placas foram lidas em espectrofotômetro para microplacas Multiskan GO (Thermo scientific) no comprimento de onda de 450 nm. Os passos deste protocolo foram os recomendados no protocolo oficial fornecido pela *R&D systems*, exceto a parte de agitação. Testamos este kit de FGF2 com nossas amostras e observamos que a leitura era baixa e, por isso, precisamos otimizar o protocolo. Algumas alterações (alteração na concentração de BSA no reagente diluente para 1,5% ou 2% e adição de agitação) foram propostas pelo fabricante do kit e a agitação nos momentos que foram descritos no decorrer do protocolo foi suficiente para melhorar o sinal no momento da leitura.

6.4 Coleta de placenta

As placentas utilizadas neste projeto foram provenientes do Estudo Transversal 2. Dois fragmentos de 0,5x0,5x0,5 cm² foram retirados de cada placenta a meio caminho do local de inserção do cordão umbilical e da borda periférica e livres de infartos visíveis, calcificação ou hematomas, a partir da face fetal da placenta (figura 1, painel B) e foram armazenados em 1 mL de RNA later a -20 °C até o momento da extração do ácido nucleico. Todos os fragmentos eram da face materna, não havia fragmento da face fetal em nenhuma das amostras.

6.5 Análise histológica das placentas

Dois fragmentos de placenta, um de normotensas e um de PE, fixados em RNA later, foram enviados para o Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral do ICB – UFMG, que é coordenado pelo professor Geovanni Dantas Cassali, para serem processadas. Após fixação e emblocamento, secções de 4 µm de espessura foram colorados com hematoxilina-eosina (HE). Cada fragmento de placenta foi examinado em microscópio (Olympus BX41) nos aumentos de 4X, 10X e 40X e fotografados utilizando a câmera científica acoplada ao microscópio (Olympus OPT).

6.6 Análise do perfil de expressão gênica de PTX3 e FGF2 na placenta

6.6.1 Extração de RNA

O RNA das placentas foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizado 1 mL de TRIzol por fragmento de 0,5x0,5x0,5 cm² de placenta. A quantificação do RNA total foi feita por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm usando o NanoDrop® (Thermo scientific). A contaminação do RNA total por proteínas foi estimada pela razão entre as absorbâncias 260/280 nm e a razão 260/230 forneceu a estimativa da contaminação do RNA por fenol, polissacarídeo e sais. Foram considerados RNAs com pureza aceitável os que apresentaram valores da razão 260/280 de aproximadamente 2,0 e da razão 260/230 entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA total foi verificada através de fracionamento eletroforético de 400 ng de cada amostra em gel de agarose 1% em TAE corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e observado sobre a luz ultravioleta (UV). Foram considerados de integridade aceitável as amostras nas quais as bandas correspondentes ao RNA ribossomal (rRNA) 28S apresentavam o dobro ou pelo menos a mesma intensidade das bandas correspondentes ao rRNA 18S e que não apresentassem um perfil de arraste na corrida.

6.6.2 Síntese de cDNA

Para síntese do cDNA, 2 µg do RNA total de cada amostra foram submetidos à transcrição reversa (RT) utilizando iniciadores oligodT (Invitrogen) 0,5 µg/mL. A qualidade do cDNA sintetizado foi aferida pela amplificação, por PCR, do gene constitutivo da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) utilizando os iniciadores *Fw*: CTCTCTGCTCCTCTGTTC e *Rv*: GATGATGACCCTTTTGGCTC. O produto da amplificação foi avaliado por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em tampão

tris-acetato-EDTA (TAE) 1X. Os parâmetros utilizados para as reações de PCR foram: 95°C/5' – 1 ciclo (desnaturação); 95°C/30" (desnaturação), 55°C 45" (anelamento), 72°C/1' (extensão) – 35 ciclos; 72°C/10' – 1 ciclo (extensão). O produto da amplificação foi avaliado por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1,2% em TAE corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e observado sobre a luz UV. Foram consideradas de boa qualidade as amostras que apresentavam amplificação da banda de 434 pb sem sinais de inibição da reação.

6.6.3 PCR em tempo real

A expressão gênica foi avaliada por RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o cDNA previamente sintetizado a partir do RNA extraído da placenta das gestantes e pares de iniciadores específicos para cada gene, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores específicos utilizados na análise de expressão gênica por RT-qPCR

ID	Sequência	µmol/µL	Eficiência	Slope
<i>TNFA Fw</i>	CAGGCAGTCAGATCATCTTC	20	96%	-3,4267
<i>TNFA Rv</i>	CTT GAG GGT TTG CTA CAA CA			
<i>IL1B Fw</i>	TCC TGC GTG TTG AAA GAT GAT AA	5	95%	-3,445
<i>IL1B Rv</i>	TTG GGT AAT TTT TGG GAT CTA CAC T			
<i>PTX3 Fw</i>	CGG CAG GTT GTG AAA CAG	20	99,60%	-3,331
<i>PTX3 Rv</i>	GGC ACT AAA AGA CTC AAG CC			
<i>HPRT1 Fw</i>	CCC ACG AAG TGT TGG ATA TAA GC	5	91%	-3,55
<i>HPRT1 Rv</i>	GGG CAT ATC CTA CAA CAA ACT TGT C			
<i>GAPDH Fw</i>	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA	10	93%	-3,495
<i>GAPDH Rv</i>	CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T			
<i>FGF2 Fw</i>	AGA GCG ACC CTC ACA TCA AG	15	104%	-3,236
<i>FGF2 Rv</i>	CGG TTA GCA CAC ACT CCT TTG			
<i>FGFBP Fw</i>	AGA CTC ACA GAT GGA TGA CA	15	100%	-3,322
<i>FGFBP Rv</i>	GCA CAC CAG GCT CTT G			
<i>VEGFA Fw</i>	TGC CCA CTG AGG AGT C	10	103%	-3,241
<i>VEGFA Rv</i>	CTC TAT CTT TCT TTG GTC TGC			
<i>FLT1 Fw</i>	ACA ACA GGA TGG TAA AGA CT	10	100%	-3,3084
<i>FLT1 Rv</i>	TCA GAG AAG GCA GGA GTT			
<i>KDR Fw</i>	CTA CAA GAC CAA AGG GGC AC	5	100%	-3,3069
<i>KDR Rv</i>	CTC CTC CAC AAA TCC AGA GC			

Para a RT-qPCR foi utilizado o sistema de fluorescência *SYBR Green Master Mix* (Applied Technologies) e a plataforma ABI 7900 HT *Real Time PCR* (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Para padronização das reações, foram feitas curvas de diluição seriadas do cDNA de amostras que sabidamente expressam os genes supracitados¹³³ utilizando iniciadores cujas concentrações variaram de 5 a 20 pmol/μL. As reações tiveram sua eficiência (E) calculada utilizando a Equação 1, onde o *slope* é o decaimento da curva de diluição.

Equação 1 - Cálculo de eficiência de amplificação

$$E = \left[\left(10^{-\frac{1}{\text{slope}}} \right) - 1 \right] \cdot 100$$

Foram consideradas padronizadas aquelas condições que apresentaram eficiência de amplificação na faixa de 90 - 110% e com um pico único nas curvas de dissociação. Para todos os genes, foi utilizado um programa de ciclagem universal (1x 50 °C 2'; 95 °C 10'; 40x 95 °C 15', 60 °C 1'). A curva de dissociação foi obtida empregando os seguintes parâmetros no termociclador: 95 °C 15', 60 °C 15' e 95 °C 15'.

A análise da expressão gênica foi feita utilizando uma diluição 1:10 de amostras de cDNA de placenta de gestantes normotensas e com PE, que foi previamente padronizada para amostras de placenta em um experimento piloto, empregando o método de quantificação relativa normalizada para o gene de expressão constitutiva *GAPDH* e a fórmula proposta por Pfaffl¹³⁴ (Equação 2), onde R é a expressão relativa normalizada, *E*_{alvo} é a eficiência de amplificação dos iniciadores do gene de interesse, *E*_{ref} é a eficiência de amplificação dos iniciadores do gene de referência e *C*_q é o ciclo de quantificação.

Equação 2 - Cálculo da expressão relativa normalizada utilizando um gene calibrador

$$R = \frac{E_{alvo}^{\Delta Cq_{alvo}} (calibrador-amostra)}{E_{ref}^{\Delta Cq_{ref}} (calibrador-amostra)}$$

6.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o pacote estatístico Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para a plataforma Microsoft Windows 10. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para aferir índice de normalidade das amostras. Na análise dos dados paramétricos, para dois grupos de amostras, usamos teste t de *Student* para dados não pareados. Para mais de dois grupos de amostras, os dados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste de Mann Whitney para dois grupos de amostras e Kruskal-Wallis para mais

de dois grupos de amostra e pós-teste de Dunn. Testes de correlação de Pearson foram utilizados para correlacionar variáveis quantitativas paramétricas. Para variáveis quantitativas não paramétricas e não lineares, foi usado o teste de correlação de Spearman. Para análise de correlação de variáveis categóricas, utilizamos o teste de qui-quadrado.

7. RESULTADOS

7.1 Dados Clínicos

As características clínicas do grupo amostral do Estudo Transversal 1 são apresentadas na tabela 3, do Estudo Transversal 2 na tabela 4 e do Estudo Longitudinal na tabela 5.

Tabela 3 - Dados clínicos das mulheres do Estudo Transversal 1

Variáveis	NG (n=20)	NT (n=26)	PE (n=30)	valor p
Idade (anos) ^a @	26,9 ± 5,5	27,8 ± 6,7	26,3 ± 6,1	0,6619
GPG (kg) ^a #	N/A	10,5 ± 4,2	15 ± 6,4	0,0073
IG na data da coleta (semanas) ^a #	N/A	36 ± 3,5	35,5 ± 3,9	0,8539
Primigesta (%) ^b &	N/A	10 (38,46)	16 (53,3)	0,3985
Histórico familiar de PE ^{d,e} &	N/A	5	5	0,9204
Histórico pessoal de PE ^d &	N/A	0	4	0,1580
PAS (mm Hg) ^c @	120 (110-120)	110 (100-120)	160 (140-170)	>0,0001
PAD (mm Hg) ^c @	80 (80-80)	70 (67,5-80)	100 (100-110)	>0,0001
PE precoce ^d	N/A	N/A	11 ^g	N/A
PE tardia ^d	N/A	N/A	19	N/A
Gestantes em tratamento ^d	N/A	N/A	20 ^f	N/A
Nifedipina ^d	N/A	N/A	14	N/A
Metildopa ^d	N/A	N/A	11	N/A
Hidralazina ^d	N/A	N/A	3	N/A
Corticóide ^d	N/A	N/A	11	N/A
MgSO ₄ ^d	N/A	N/A	9	N/A

GPG – Ganho de Peso na Gestação; IG – Idade Gestacional; PE – Pré-eclâmpsia; PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica; N/A – Não se aplica; RN – Recém-nascido

^a média ± desvio padrão

^b número absoluto de gestantes e (porcentagem sobre o número total)

^c mediana (percentil 25 e 75)

^d número total de gestantes

^e Histórico familiar = episódio de PE em mãe e/ou irmã

^f Todas as gestantes com PE grave e/ou precoce faziam algum tipo de tratamento e algumas gestantes usavam mais de um tipo de medicamento.

@ One-way ANOVA

Teste t de Student

& Teste qui-quadrado com correção de Yates.

Tabela 4 - Dados clínicos das mulheres do Estudo Transversal 2

Variáveis	NT (n=4)	PE (n=4)	valor p
Idade (anos) ^{a #}	27,7 ± 8,3	32,2 ± 2,9	0,343
GPG (Kg) ^{a #}	9,32 ± 8,3	6,3 ± 11,4	0,691
IG (semanas) ^{a #}	39,0 ± 1,4	38 ± 0	0,207
Peso do RN (kg) ^{a #}	3,308 ± 0,349	3,221 ± 0,123	0,703

GPG – Ganho de Peso na Gestação; IG – Idade Gestacional; PE – Pré-eclâmpsia; PAS – Pressão Arterial Sistólica; PAD – Pressão Arterial Diastólica; N/A – Não se aplica; RN – Recém-nascido

^a média ± desvio padrão

Teste t de *Student*

Tabela 5 - Dados clínicos das mulheres do Estudo Longitudinal

Variáveis	NT (n=12)	PE (n=9)
Idade (anos) ^a	.	27,2 ± 5,1
Primigesta (%)	.	3 (33,3)
Parto Vaginal (%)	.	2 (22,2)
Cesárea (%)	.	7 (77,8)

PE – Pré-eclâmpsia; NT – normotensas.

^a média ± desvio padrão

Podemos destacar, conforme mostrado nas Tabelas 3 e 4, a homogeneidade do grupo de mulheres incluídas nos diferentes Estudos. Não houve diferença estatística no que se refere à idade das gestantes e a idade gestacional no momento da coleta e não observamos diferença significativa entre as médias dos grupos (PE, não gestante e normotensas). No Estudo Transversal 1, a pressão arterial (PA) em gestantes com PE foi maior quando comparada a PA de gestantes normotensas e não gestantes, e o ganho de peso durante a gestação também foi maior nas mulheres que desenvolveram PE em comparação com as gestantes normotensas, conforme já era esperado. Também está representado na tabela 3 o número de gestantes com PE que estavam fazendo algum tipo de tratamento com os principais medicamentos indicados na clínica e o número de gestantes com PE precoce e tardia dentro do grupo de gestantes com PE.

No Estudo Transversal 2, também tivemos acesso ao peso do recém-nascido, que não apresentou diferença entre os grupos NT e PE.

Para o Estudo Longitudinal, não foi possível fazer análise estatística com as características clínicas, uma vez que faltaram informações sobre as gestantes normotensas, conforme mostrado na tabela.

7.2 ELISA para quantificação de PTX3 e FGF2

7.2.1 Avaliação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 na PE

Os resultados da avaliação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 estão representados na figura 7. Para análise estatística dos dados, utilizamos as amostras do Estudo Transversal 1 e algumas amostras de mesmo período (C ou D) do Estudo Longitudinal, tanto de gestantes NT quanto de PE. Primeiramente aplicou-se um teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Na dosagem de FGF2, as amostras de NT e PE apresentaram distribuição normal, enquanto NG não apresentou. Para estas análises, portanto, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações.

Os níveis de FGF2 no plasma de mulheres não gestantes é, em média, 3,69 pg/mL e sofre um aumento significativo durante a gestação (média = 15,77 pg/mL) [$p < 0,0001$]. Em gestantes com PE ocorre um aumento ainda maior da concentração plasmática de FGF2 (média = 30,66 pg/mL) em comparação os encontrados em gestantes normotensas [(média = 15,77 pg/mL), $p = 0,005$].

Na dosagem de PTX3 apresentaram distribuição normal as amostras de não gestantes (NG) e normotensas (NT) e de PE não houve distribuição normal. Portanto, para comparação entre as amostras foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para múltiplas comparações.

Os resultados do ELISA para dosagem de PTX3 no plasma não mostraram diferença significativa de concentração entre não gestantes (média = 6,1 ng/mL) e gestantes normotensas [(média = 7,51 ng/mL), valor $p = 0,941$]. Entretanto, encontramos um aumento significativo de concentração no plasma das gestantes com PE (média = 19,04) em comparação com mulheres NG [(média = 6,1 ng/mL); valor $p = 0,0005$] e entre PE e NT (valor $p = 0,0036$). Estes resultados ressaltam que na PE a concentração de PTX3 é bastante aumentada.

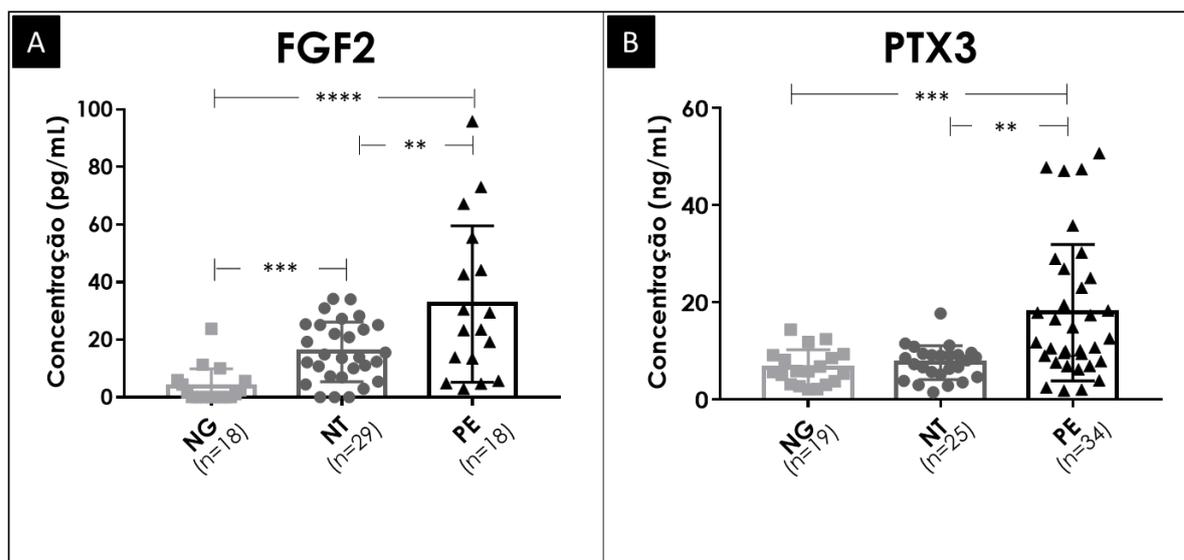


Figura 7 - Concentração plasmática de FGF2 e PTX3 durante a gestação normal e em pré-eclâmpsia

Os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 foram avaliados por ELISA sanduíche. Os resultados estão representados como média e erro padrão da concentração plasmática (ng/mL para PTX3 e pg/mL para FGF2). Os gráficos mostram as médias dos níveis de FGF2 (Painel A) e de PTX3 (Painel B) encontrados no plasma de mulheres não gestantes (NG), gestantes normotensas (NT) e com pré-eclâmpsia (PE). As amostras utilizadas nesta análise foram provenientes do Estudo Transversal 1 e algumas amostras de mesmo período (C ou D) do Estudo Longitudinal. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para comparação entre as concentrações plasmáticas que não apresentaram distribuição normal, testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para múltiplas comparações foram realizados. **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$; ****- $p < 0,0001$.

7.2.2 Avaliação da concentração plasmática de PTX3 em gestantes com PE que fazem uso de GCs durante a gestação

Utilizando as amostras do Estudo Transversal 1, analisamos se o uso de GCs influenciava a concentração plasmática de PTX3 na PE. Para estas análises, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado e os grupo PE + GCs e NT apresentaram distribuição normal, enquanto o grupo PE sem GCs não apresentou. Sendo assim, as comparações foram feitas utilizando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

Conforme observado na figura 8, não encontramos diferença significativa entre os níveis plasmáticos de PTX3 nas gestantes com PE que faziam uso do GCs (média = 33,34 ng/mL) comparado com as que não faziam [(média = 14,84 ng/mL), $p = 0,0779$]. Quando comparamos as concentrações de PTX3 no plasma de gestantes com PE que usam GCs (média = 33,34 ng/mL) com as NT (média = 7,506 ng/mL), a diferença significativa se

manteve (valor $p < 0,0001$), bem como quando comparamos PE sem GCs com NT (valor $p = 0,0020$).

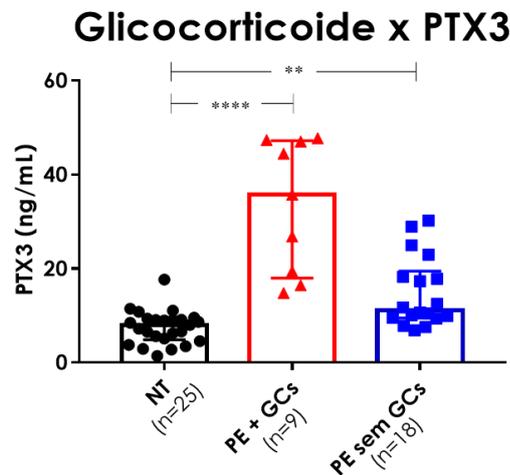


Figura 8 – Impacto do tratamento com glicocorticoide sobre as concentrações de PTX3 no plasma de gestantes

Os níveis plasmáticos de PTX3 foram avaliados por ELISA sanduíche. Os resultados estão representados como média e erro padrão da concentração plasmática em ng/mL. Os gráficos mostram as médias dos níveis de PTX3 encontrados no plasma de gestantes normotensas (NT), gestantes com pré-eclâmpsia que faziam uso de corticoide (PE + corticoide) e gestantes com PE que não faziam uso de corticoide (PE sem corticoide). Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram realizados e os dados estão representados como mediana e intervalo interquartil. **- $p < 0,01$; ****- $p < 0,0001$.

7.2.3 Avaliação dos níveis de PTX3 e FGF2 no plasma de gestantes com PE precoce e PE tardia

Para estas análises, foram utilizadas amostras provenientes do Estudo Transversal 1. Testes de normalidade foram realizados, utilizando o teste de Shapiro-Wilk e como as amostras do grupo de gestantes com PE tardia da análise de PTX3 não apresentaram distribuição normal, testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn para múltiplas comparações foram realizados para PTX3. Para FGF2, as amostras apresentaram distribuição normal e, portanto, a comparação foi feita utilizando One-way ANOVA com pós teste de Tukey.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a concentração de FGF2 no plasma das gestantes normotensas (média = 15,77 pg/mL) e das gestantes com PE tardia [(média = 13,08 pg/mL), $p = 0,8605$] (Figura 9, painel A). Entretanto, a concentração deste fator no plasma das gestantes com PE precoce (média = 37,45 pg/mL) é

significativamente maior do que a observada em gestantes normotensas [(média = 15,77 pg/mL), $p=0,0022$] e PE tardia [(média = 13,08 pg/mL), $p = 0,0044$].

Estudos reportados na literatura apontam que os níveis plasmáticos de PTX3 são mais elevados na PE precoce do que na tardia. No nosso estudo, apesar de termos observado níveis significativamente aumentados de PTX3 no plasma de gestantes com PE precoce [(média = 28,01 ng/mL), $p = 0,0001$] e tardia [(média = 15,9 ng/mL), $p = 0,0008$] em comparação com os encontrados no plasma de gestantes normotensas (média = 7,51 ng/mL), não encontramos diferença significativa entre os níveis de PTX3 encontrados na PE precoce (média = 28,01 ng/mL) quando comparados a PE tardia [(média = 15,9 ng/mL), $p = 0,7772$] (figura 9, painel B). Os dados são apresentados na Figura 9, juntamente com os respectivos números amostrais (n) de cada grupo.

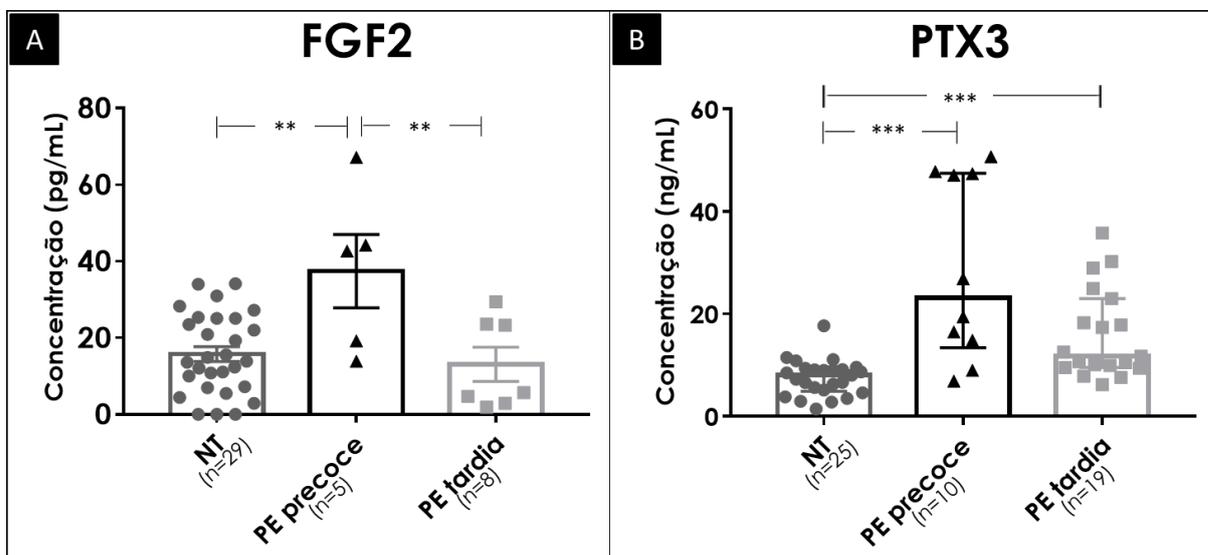


Figura 9 - Concentração de FGF2 e PTX3 no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia precoce e tardia

Nestas análises, foram utilizadas as amostras do Estudo Transversal 1 e amostras do mesmo período (C e D) do Estudo Longitudinal. Os níveis de PTX3 e FGF2 no plasma das gestantes e mulheres não gestantes foram determinados através de ELISA sanduíche. Os resultados estão representados como média e erro padrão da concentração plasmática (ng/mL para PTX3 e pg/mL para FGF2). Os gráficos mostram a média dos níveis plasmáticos de FGF2 (Painel A) e de PTX3 (Painel B) nas gestantes com pré-eclâmpsia precoce (PE precoce) e tardia (PE tardia) e gestantes normotensas (NT). Para FGF2, a comparação foi feita utilizando One-way ANOVA com pós teste de Tukey. Para PTX3, a comparação foi feita utilizando Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. FGF2: média e erro padrão. PTX3: mediana e intervalo interquartil. **- $p<0,01$; ***- $p<0,001$; ****- $p<0,0001$.

7.2.4 Correlação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2

Utilizando a correlação de postos de Spearman, fizemos uma análise de correlação entre os níveis de PTX3 e FGF2 para cada um dos grupos (não gestantes, normotensas e pré-eclâmpsia) utilizando as amostras do Estudo Transversal 1 e algumas amostras do Estudo Longitudinal com idade gestacional próxima (coleta C ou D) à do Estudo Transversal 1. Conforme observado na figura 13, não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 em nenhum dos grupos.

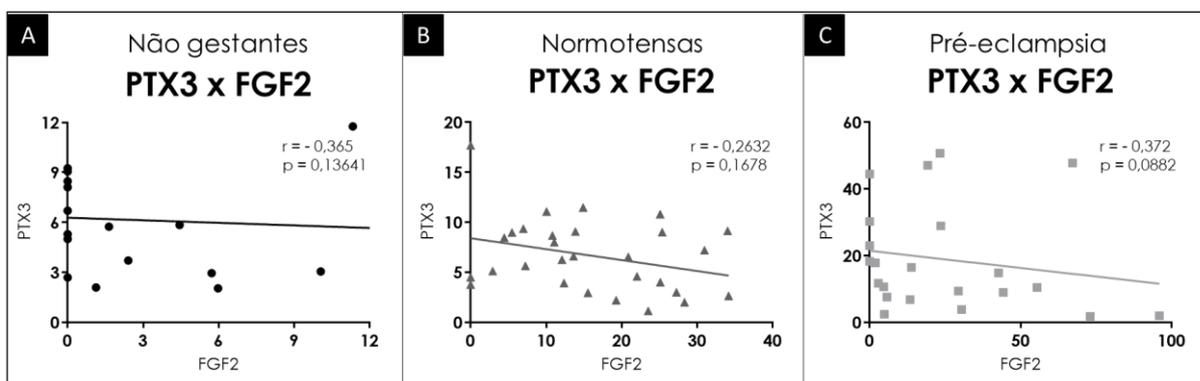


Figura 10 - Correlação entre níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2

Para estas análises, foram utilizadas amostras do Estudo Transversal 1 e amostras do mesmo período do Estudo Longitudinal (coletas C e D). Os níveis de PTX3 e FGF2 foram determinados através de ELISA sanduíche e a correlação da concentração dos dois marcadores no período final da gestação foi feita usando o teste de Spearman. Painel A: amostras de mulheres não gestantes; Painel B: amostras de gestantes normotensas; Painel C: amostras de gestantes com PE.

7.2.5 Correlação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 e fatores de risco para PE

Para algumas das amostras do Estudo Transversal 1 utilizadas em nosso trabalho tivemos acesso às informações sobre ganho de peso na gestação e primigestação, as quais foram coletadas durante o recrutamento das gestantes. Os dados resultantes dos estudos de associação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 com estes fatores de risco são apresentados na figura 14. Conforme apresentado na figura 14, não foi encontrada nenhuma associação entre os níveis plasmáticos de PTX3 ou FGF2 com os fatores de risco analisados, variando estes, portanto, de forma independente.

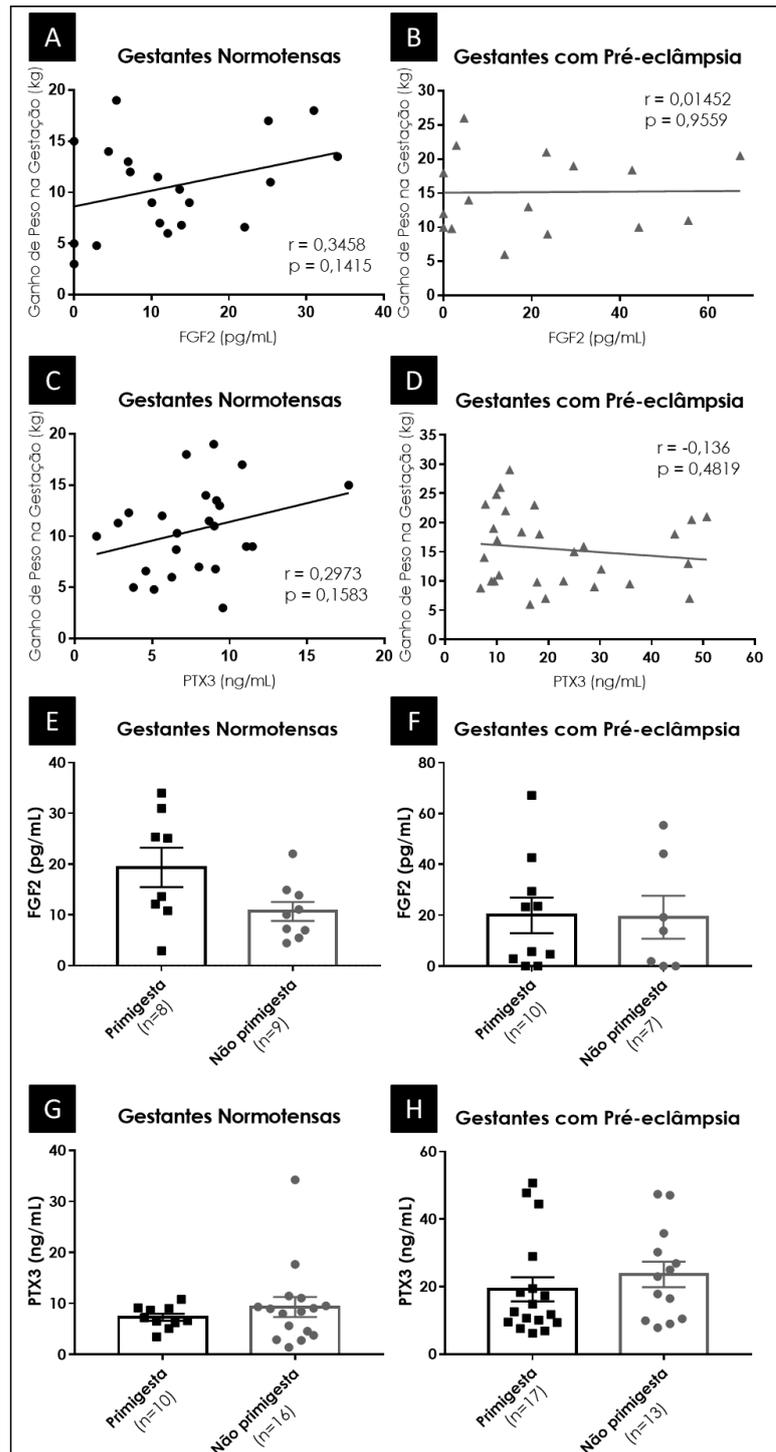


Figura 11 - Comparação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 em mulheres com fatores de risco para pré-eclâmpsia

Para estas análises, foram utilizadas amostras provenientes do Estudo Transversal 1. A associação entre a concentração dos marcadores FGF2 (A e B) e PTX3 (C e D) e ganho de peso na gestação (GPG) em gestantes normotensas (A e C) e com PE (B e D) foi analisada pelo teste de correlação de Spearman. A relação entre primigestação e concentração plasmática de FGF2 (E e F) e PTX3 (G e H) foi avaliada em gestantes normotensas que estavam ou não na primeira gestação (E e G) e gestantes com PE que estavam ou não na primeira gestação (F e H) usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados são apresentados como mediana e intervalo interquartil dos níveis plasmáticos de FGF2 e PTX3.

7.2.6 Correlação entre níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 e outros marcadores plasmáticos

As amostras usadas nestas análises são provenientes do Estudo Transversal 1, que já foram utilizadas em trabalhos anteriores nos quais foram feitas dosagens de alguns outros marcadores anti-inflamatórios (Lipoxina A4 (LXA4) e Anexina A1 (ANXA1)) e pró-inflamatórios (CRP) e fatores relacionados ao sistema nervoso (neurotrofina 3 (NT3), fator de crescimento neuronal (NGF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)).

Através da análise de correlação de Spearman, encontramos correlação positiva significativa entre os níveis plasmáticos de PTX3 e de ANXA1 ($r=0,59217$; $p=0,0023$) em gestantes normotensas. Não foram encontradas correlações significativas para nenhum dos outros marcadores avaliados, para nenhum dos três grupos. Os dados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Correlação entre os níveis de PTX3 e FGF2 e de outros marcadores em amostras de plasma de mulheres não gestantes, gestantes normotensas e gestantes com pré-eclâmpsia

	Não gestantes				Normotensas				Pré-eclâmpsia			
	FGF2		PTX3		FGF2		PTX3		FGF2		PTX3	
	r	valor p	r	valor p	r	valor p	r	valor p	r	valor p	r	valor p
LXA4	0,44814	0,06216	-0,1404	0,56658	0,23266	0,33779	0,19162	0,40535	-0,3144	0,21743	-0,1892	0,39904
NT3	0,05753	0,82062	0,04758	0,84663	-0,3197	0,18216	-0,2935	0,22259	0,18052	0,4837	0,04394	0,85406
NGF	0,00054	0,99829	0,10842	0,65863	-0,0303	0,90195	-0,2793	0,24683	0,18951	0,46224	-0,0737	0,75735
GDNF	0,20953	0,40402	-0,0324	0,89529	0,03511	0,88652	-0,3654	0,12397	0,36575	0,14783	0,06071	0,79929
CRP	0,37386	0,12643	-0,0984	0,68853	-0,0395	0,87237	0,21017	0,34784	-0,0851	0,74401	0,0514	0,8203
ANXA1	-0,0659	0,79511	-0,2351	0,33263	0,43791	0,06076	0,59217	0,0023	0,29488	0,24814	0,36117	0,06418
BDNF	0,11986	0,63568	0,2193	0,36703	-0,2492	0,30349	0,16316	0,50452	-0,1726	0,50442	-0,1293	0,58685

7.2.7 Avaliação dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 nas amostras do Estudo Longitudinal

As amostras utilizadas para esta análise são provenientes do Estudo Longitudinal. Testes de normalidade de Shapiro Wilk foram realizados e, atestada a distribuição normal de todos os pontos analisados, análises utilizando *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey foram realizadas.

Os níveis plasmáticos de FGF2 (figura 12, painéis A, C e E) e PTX3 (figura 12, painéis B, D e F) foram determinados em um estudo longitudinal, descrito na metodologia, no qual as

gestantes foram acompanhadas durante o pré-natal e foram feitas coletas em quatro momentos durante a gestação: A (12 a 19 semanas), B (20 a 29 semanas), C (30 a 34 semanas) e D (acima de 35 semanas). As amostras de cada ponto de coleta foram agrupadas e uma comparação entre níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 entre as NT (figura 12, painéis A e B) e gestantes com PE (figura 12, painéis C e D) em cada ponto de coleta e entre os grupos de gestantes NT e PE (figura 12, painéis E e F) foi realizada. Não foram encontradas diferenças significativas entre os pontos para nenhuma das análises feitas.

Com o objetivo de analisar qualitativamente a variação destes dois marcadores em uma mesma gestante no decorrer da gestação, foram construídos gráficos com duplo eixo e plotados os valores dos níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2, conforme mostrado nas figuras 11 e 12.

Todas as gestantes normotensas analisadas na figura 11 tiveram o plasma coletado em, pelo menos, 3 momentos diferentes da gestação. Nas gestantes NT 1, NT 3, NT 4, NT 6, NT 7 e NT 12, observa-se que os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 não são coincidentes, ou seja, não aumentam ou diminuem juntos, as curvas são contrárias. Nas gestantes NT 1, NT 3, NT 4, NT 11 e NT 7, os níveis de FGF2 aumentam no decorrer da gestação e nas gestantes NT 2, NT 5 e NT 6 parecem estar diminuindo. As gestantes NT 2 e NT 10 apresentam uma baixa nos níveis plasmáticos de FGF2 em C e NT 9 uma baixa em B. Já PTX3 parece diminuir no decorrer da gestação em NT 1 e NT 4, aumentar em NT 2, NT 6, NT 8, NT 10 e NT 11. Um aumento no ponto intermediário seguido de diminuição no último ponto é observado em NT 3, NT 5, NT 7 e NT 11 e uma diminuição seguida de aumento é observada em NT 12. Não foi realizada nenhuma análise estatística nestes dados. Conforme observado na figura 12, os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 na PE parecem apresentar o mesmo perfil, ou seja, variam na mesma direção, embora em magnitudes diferentes, de maneira que pareçam mais homogêneos. Nas gestantes normotensas, essa homogeneidade não é observada.

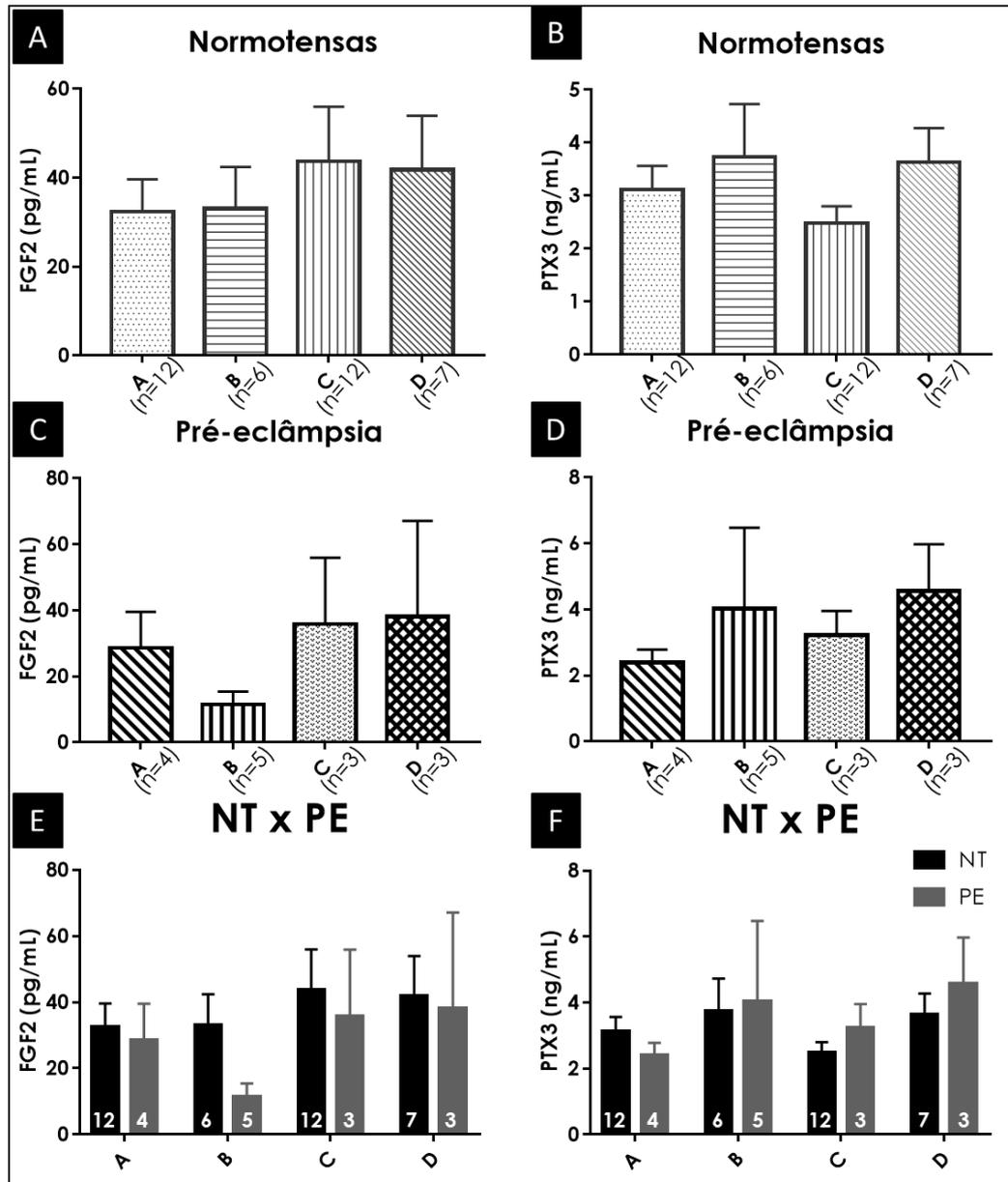


Figura 12 - Avaliação dos níveis de FGF2 e PTX3 no plasma de gestantes normotensas e com PE em diferentes períodos da gestação

Os níveis de FGF2 e PTX3 no plasma das gestantes foram mensurados por ELISA sanduíche. Os resultados estão representados como média e erro padrão dos níveis de FGF2 (Painéis A, C e E) e PTX3 (Painéis B, D e F) no plasma de gestantes com pré-eclâmpsia (PE) e gestantes normotensas (NT). As letras no eixo das abscissas representam os momentos em que a coleta de amostra de plasma foi feita: A (12 a 19 semanas); B (de 20 a 29 semanas); C (30 a 34 semanas); D (acima de 35 semanas). Para todos os casos, testes de normalidade foram realizados, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos nas análises por múltiplos testes t de *Student* (painéis E e F) ou *One-way ANOVA* (painéis A, B, C e D). O número amostral (n) utilizado para cada análise está representado na figura.

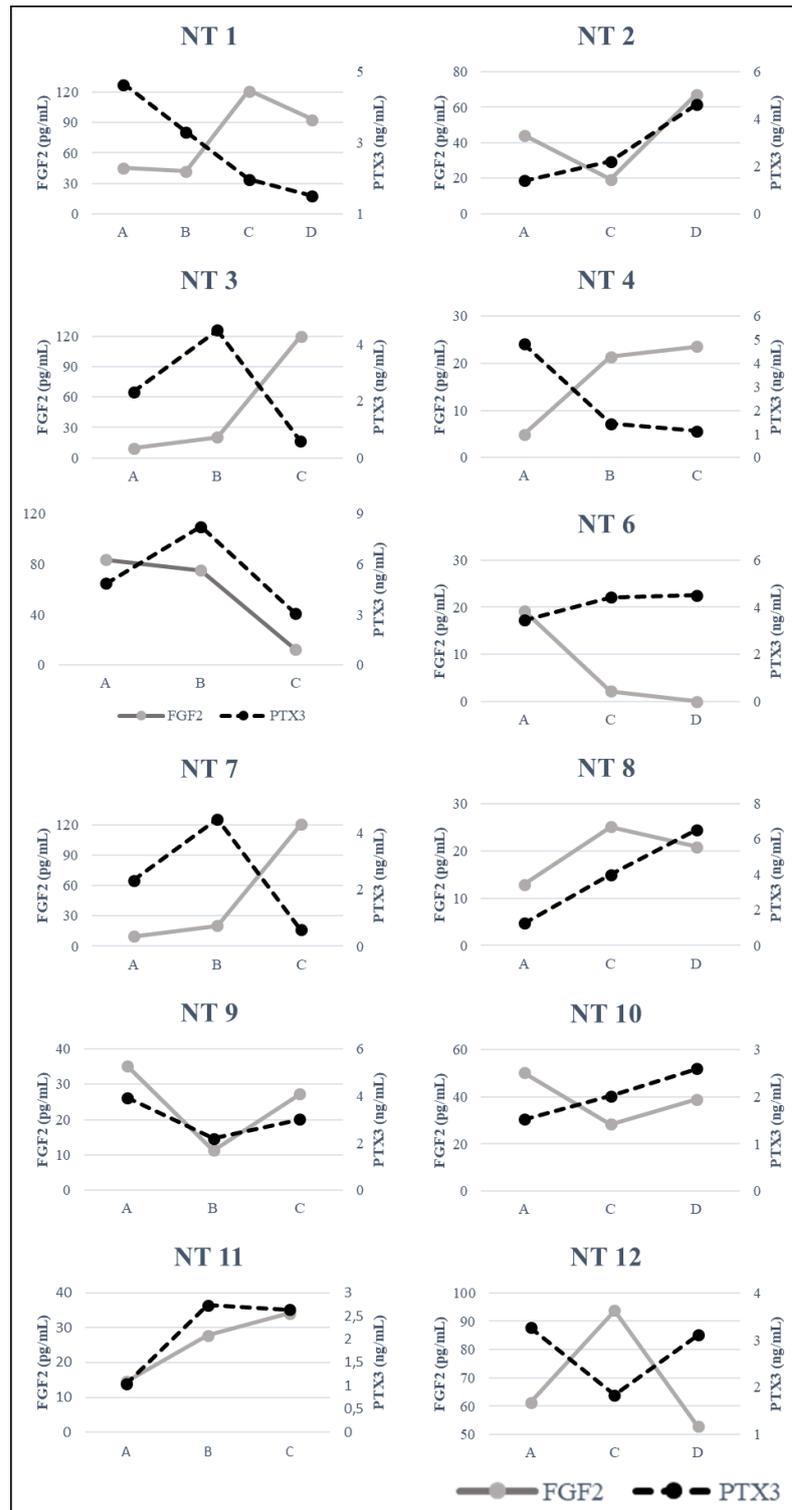


Figura 13 - Níveis plasmáticos de FGF2 e PTX3 em cada uma das gestantes normotensas acompanhadas em Estudo Longitudinal

Os níveis de FGF2 e PTX3 no plasma das gestantes foram determinados por ELISA sanduíche. Foram acompanhadas doze gestantes normotensas (NT 1 a 12). Cada gráfico apresenta os níveis de concentração de FGF2 (pg/mL) e (PTX3 ng/mL) no determinado momento da coleta ao longo do tempo de gestação. As letras no eixo das abscissas representam os momentos em que a coleta de amostra de plasma foi feita: A (12 a 19 semanas); B (de 20 a 29 semanas); C (30 a 34 semanas); D (acima de 35 semanas).

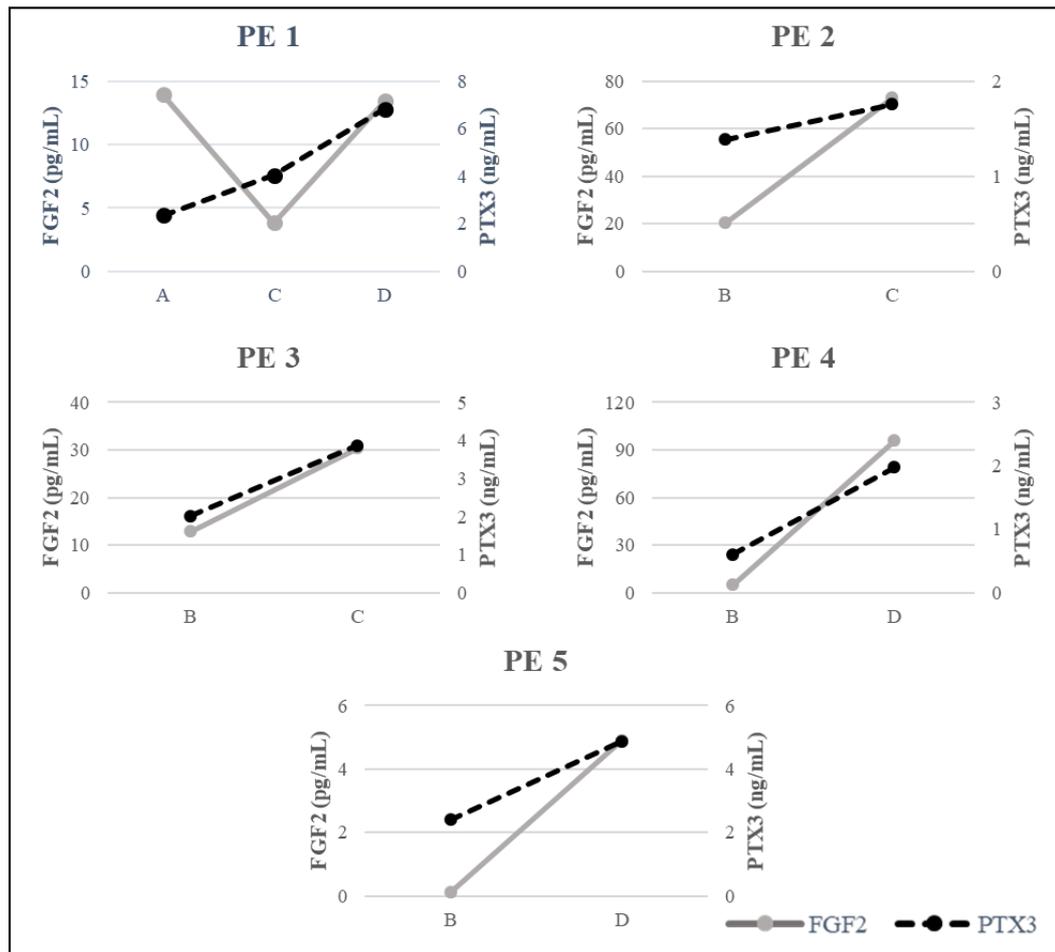


Figura 14 - Níveis plasmáticos de FGF2 e PTX3 em cada uma das gestantes com PE acompanhadas em Estudo Longitudinal

Os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 das gestantes que desenvolveram PE foram determinados por ELISA sanduíche. Foram acompanhadas cinco gestantes com PE (PE 1 a 5). Cada gráfico apresenta os níveis plasmáticos de FGF2 (pg/mL) e (PTX3 ng/mL) no determinado momento da coleta ao longo do tempo de gestação. As letras no eixo das abscissas representam os momentos em que a coleta de amostra de plasma foi feita: A (12 a 19 semanas); B (de 20 a 29 semanas); C (30 a 34 semanas); D (acima de 35 semanas).

7.3 Análise histológica da placenta

As fotomicrografias obtidas das amostras de placenta estão representadas na figura 15. Os painéis A, C e E são correspondentes à placenta coletada de gestante normotensa e os painéis B, D e F à placenta de paciente com PE. As imagens A e B foram obtidas utilizando o aumento de 4X, C e D aumento de 10X e E e F o aumento de 40X. Na seta azul, estão indicados os vasos sanguíneos. De acordo com o mostrado na figura 15, os vasos sanguíneos placentários das amostras de PE têm lesão característica de hiperplasia de células musculares, com espessamento da membrana basal, que causa o estreitamento da luz do vaso (painéis B, D

e F, seta azul). Esta característica não é observada nos vasos da placenta de gestante normotensa (painéis A, C e E, seta azul), conforme era esperado ¹³⁵.

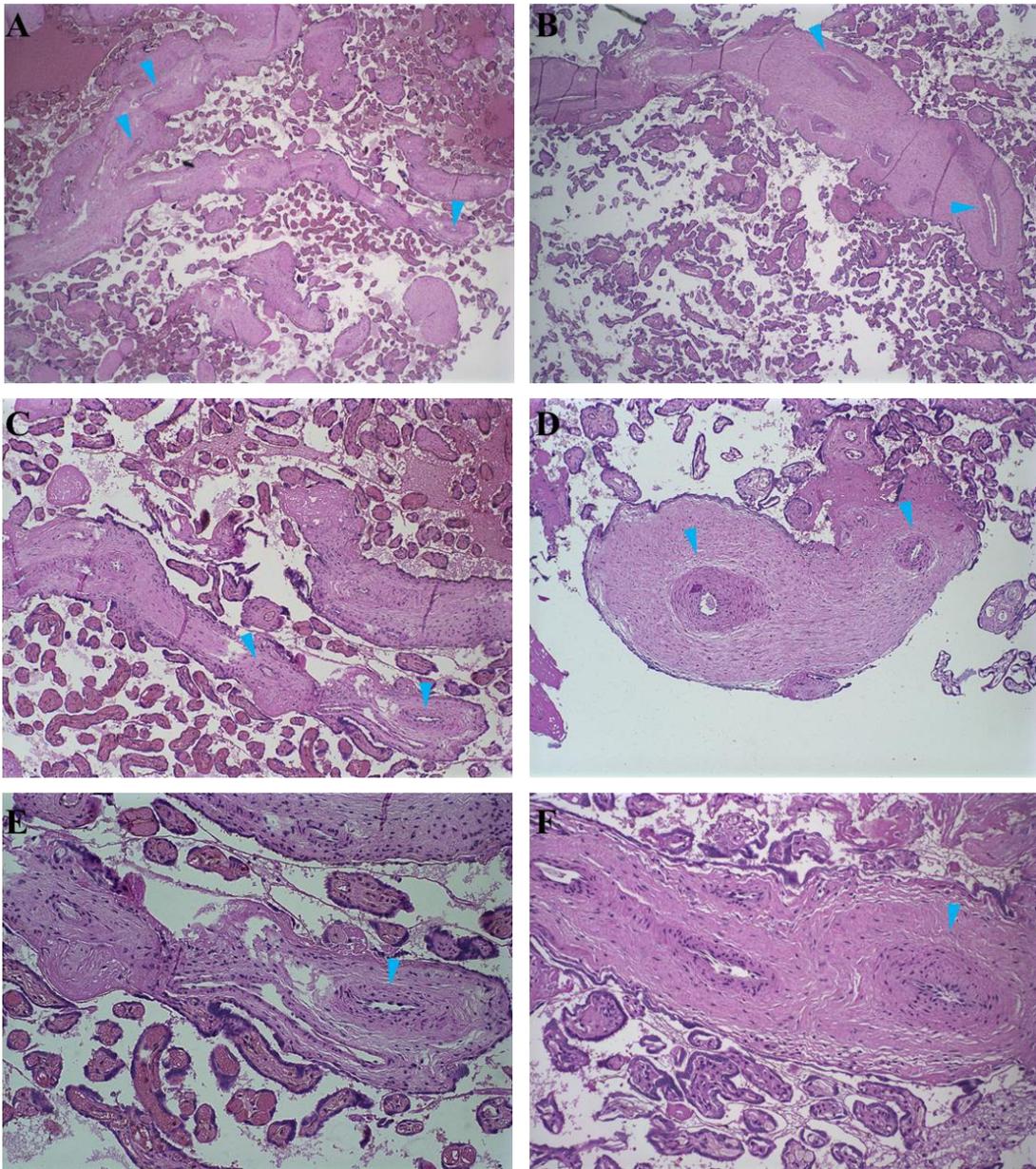


Figura 15 - Histologia da placenta de normotensa e PE

Cortes histológicos obtidos de placenta de gestantes com gestação normal (A, C e E) e com PE (B, D e F), corados com HE. As setas azuis indicam vasos sanguíneos. Painel A e B: aumento de 4X, painel C e D: aumento de 10X, painel E e F: aumento de 40X.

7.4 Análise do perfil de expressão gênica

7.4.1 Extração de RNA

Para a análise de expressão gênica foram utilizadas as amostras de placenta de gestantes normotensas e com PE provenientes do Estudo Transversal 2. O RNA total foi pelo método TRIzol e os resultados da quantificação e análise da pureza são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Quantificação e estimativa da contaminação por proteínas e sais nos RNAs totais extraídos de fragmentos de placenta

Amostra	Total (µg)	260/280	260/230
NT 1	20,31	2,07	1,90
NT 2	55,73	2,08	1,64
NT 3	47,40	2,05	2,21
NT 4	49,79	2,06	1,97
PE 1	45,45	2,07	2,04
PE 2	88,43	2,09	2,07
PE 3	20,70	2,08	1,84
PE 4	54,60	2,07	2,18

A quantidade de RNA total obtida foi suficiente para a síntese do cDNA de todas as amostras de placenta. Os RNAs apresentaram valores da razão 260/280 e 260/230 dentro dos parâmetros de pureza aceitáveis, conforme mostrado na tabela 7.

O fracionamento eletroforético de uma alíquota de 1 µg de RNA total foi feito em gel de agarose 1% em TAE corado com SYBR safe possibilitando observar a integridade satisfatória dos RNAs extraídos (figura 16), uma vez que foi possível visualizar as bandas dos rRNAs 18 e 28S, sendo que a intensidade da banda do RNA ribossomal 28S aproximadamente a mesma ou o dobro da observada para o RNA ribossomal 18S. Somente a amostra PE 1 apresentou uma intensidade menor das bandas, indicando ter um grau de degradação maior do que o das demais amostras (figura 16).

1.1.1 Transcrição reversa

Atestada a qualidade satisfatória dos RNAs totais extraídos, 2 µg de cada um foram utilizados como molde em reações de transcrição reversa utilizando iniciadores oligodT. A qualidade da reação de transcrição reversa foi avaliada por amplificação por PCR, utilizando iniciadores específicos para o gene constitutivo *GAPDH*. Esse procedimento permite detectar, no caso de

não haver presença de inibidores da reação nas amostras e da transcrição reversa ter ocorrido de forma eficiente um produto amplificado do gene GAPDH, de tamanho esperado e contendo regiões próximas à região 5' do gene, em todas as amostras. Quando avaliamos eletroforeticamente a qualidade do cDNA pela amplificação por PCR deste gene, observamos bandas de tamanho esperado e intensidade qualitativamente semelhantes (figura 17).



Figura 16 – Análise da Integridade do RNA total extraído das amostras de placenta de gestantes normotensas e com PE provenientes do Estudo Transversal 2

O RNA total dos fragmentos de placenta de tamanho 0,5 x 0,5 x 0,5 cm foi extraído pelo método TRIzol. Uma alíquota de 1 µg de RNA foi fracionada eletroforeticamente em gel de agarose 1,2% em TAE corado com SYBR safe.

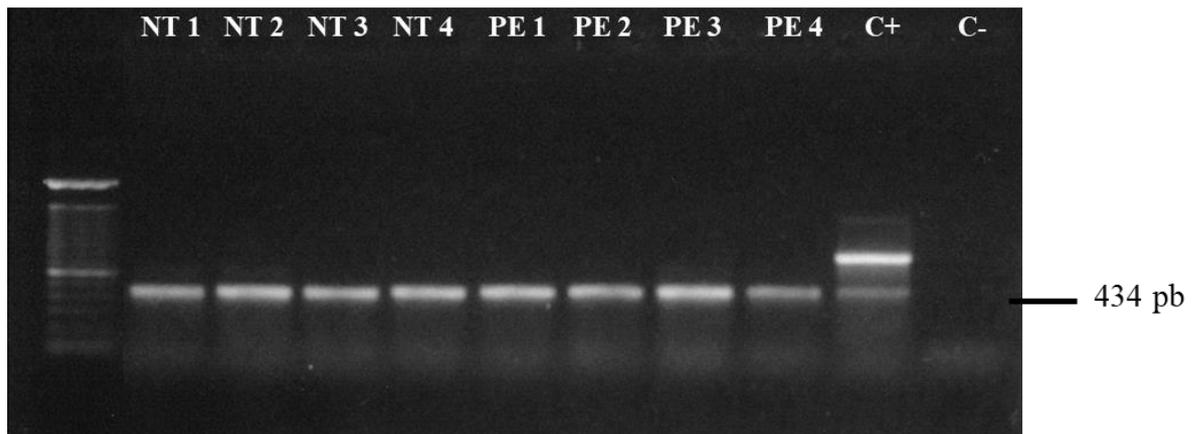


Figura 17 - Análise eletroforética do cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das amostras de placenta

O RNA total das amostras de placenta da face materna armazenadas em RNA later foi extraído pelo método TRIzol e uma alíquota de 2 µg do RNA foi utilizado como molde em reações de transcrição reversa. A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por amplificação do gene constitutivo *GAPDH* por PCR. O produto da reação foi fracionado eletroforeticamente em gel de agarose 1% em TAE corado com SYBR safe. Tamanho da banda observada: 434 pares de base. Canaleta M: Marcador de peso molecular Ladder 100 bp; Canaletas NT 1 a NT 4: amostras de placenta de gestantes normotensas; Canaletas PE 1 a PE 4: amostras de placenta de gestantes com pré-eclâmpsia; Canaleta C+: Controle positivo (cDNA de célula tumoral proveniente do epitélio intestinal humano); Canaleta C-: Controle negativo (sem DNA).

1.1.2 Expressão gênica relativa

Os cDNAs sintetizados nas reações de transcrição reversa foram utilizados como molde em reações de PCR em tempo real para avaliar a expressão dos genes *PTX3*, *FGF2*, *IL1B*, *TNFA*, *KDR*, *FLT-1*, *VEGFA* e *FGFBP*. Testes de Shapiro-Wilk foram utilizados para aferir a normalidade na distribuição dos valores de expressão relativa dos genes e como todos apresentaram uma distribuição normal, foi realizado o teste ANOVA *Two way* com pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. Conforme observado na figura 18, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a expressão destes genes nas amostras da face materna da placenta de gestantes com PE quando comparadas com as de placenta de gestantes normotensas ao final da gestação.

A avaliação da expressão proteica de *PTX3* e *FGF2* nas placentas está em andamento.

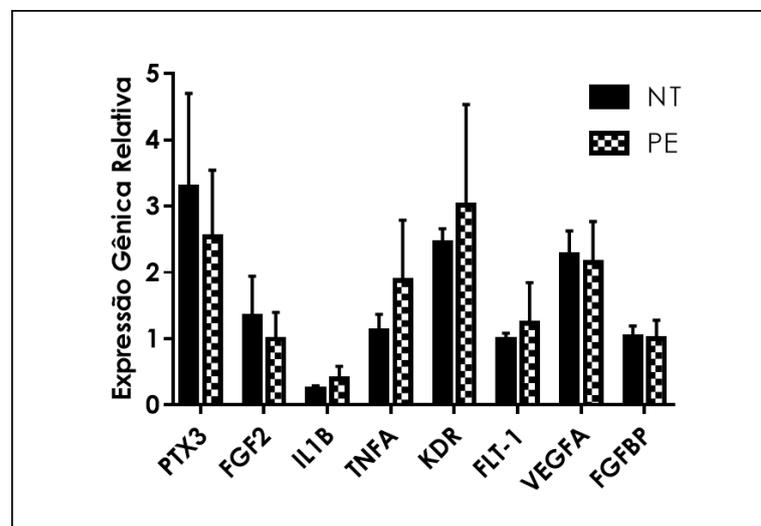


Figura 18 - Expressão gênica de *PTX3*, *FGF2*, *IL1B*, *TNFA*, *KDR*, *FLT-1*, *VEGFA* e *FGFBP* em placentas de gestantes normotensas e com pré-eclâmpsia

Os fragmentos de placenta (0,5 x 0,5 x 0,5 cm) da face materna coletados no momento do parto foram imediatamente armazenados em RNA later e, posteriormente, submetidas a extração de RNA pelo método TRIzol. O RNA total foi utilizado como molde em reações de transcrição reversa utilizando primer de oligo dT e o cDNA sintetizado foi usado como molde em reações de PCR em tempo real com iniciadores específicos para *PTX3*, *FGF2*, *IL1B*, *TNFA*, *KDR*, *FLT-1*, *VEGFA* e *FGFBP*. O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para aferir o índice de normalidade das amostras e como todas apresentaram uma distribuição normal, os dados foram analisados utilizando *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada da comparação entre o grupo de gestantes normotensas (NT) e com pré-eclâmpsia (PE). O número amostral (n) foi de 4 amostras de placenta para PE e 4 para NT.

2. DISCUSSÃO

A PE é uma doença documentada há pelo menos 200 anos ¹³⁶. Apesar de ser bem conhecida e caracterizada clinicamente e afetar de 4 a 5% de mulheres grávidas no mundo todo ¹, a fisiopatologia da PE ainda é pouco entendida, o que limita as intervenções terapêuticas e a prevenção. Dentro do que se sabe até a presente data, a PE possui mecanismos fisiopatológicos semelhantes às doenças cardiovasculares, como por exemplo aterosclerose e doenças arteriais coronárias e periféricas, que são aumento da liberação de citocinas e moléculas pró-inflamatórias (IL1B, TNFA, CRP, PTX3, ANXA1, dentre outras), disfunção e desregulação endotelial, inflamação grave, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo e desequilíbrio angiogênico ¹²⁵. A angiogênese é um processo natural e importante para o desenvolvimento embrionário e para a formação da placenta. Seu controle é regulado pelo equilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos e um desequilíbrio, tanto positivo quanto negativo, pode favorecer o desenvolvimento de doenças. No caso da PE, a angiogênese é relatada como diminuída devido a um desequilíbrio entre os fatores pró e antiangiogênicos, o que favorece uma placentação superficial e o aporte sanguíneo insuficiente para o feto, acarretando as manifestações clínicas da doença ⁵⁴.

Desde a sua caracterização como uma molécula de fase aguda, devido ao rápido aumento dos seus níveis plasmáticos na inflamação (cerca de 400x, a depender da condição), PTX3 é estudada em vários contextos inflamatórios, tanto infecciosos quanto assépticos. Uma vez que PTX3 tem sido relacionada a um importante e não redundante papel na inflamação, estudos vêm sendo feitos para caracterizar esta proteína como um biomarcador em potencial de várias condições patológicas. Em doenças cardiovasculares, PTX3 já foi descrita como um potencial biomarcador em infarto agudo do miocárdio, falha cardíaca, aterosclerose e parada cardíaca ¹²⁵.

Na PE, a PTX3 é descrita como aumentada e estudos sugerem que esta molécula possui um importante papel na disfunção endotelial e na inflamação características da PE ^{128,137-139}. PTX3 possui uma função antiangiogênica, pois sequestra FGF2 e impede sua ligação aos seus receptores. FGF2 tem seu papel biológico atribuído ao efeito mitogênico, ao desenvolvimento embrionário (pulmão, coração, cérebro músculo, sangue, pele, olho, osso e membros), sobrevivência celular, bloqueio da apoptose em células neuronais, cicatrização de feridas, angiogênese, entre outros ¹⁴⁰. Ademais, dentre os membros da família FGF, FGF2 é o principal indutor de angiogênese, tanto diretamente quanto de maneira indireta, visto que

também pode induzir a produção de outros fatores pró-angiogênicos importantes, como a angiopoetina-2 e o VEGF^{141,142}, que já foram relatados como diminuídos no sangue de gestantes com PE^{1,143}.

Apesar de seu importante papel na angiogênese e tendo em vista a importância deste processo na fisiopatologia da PE, FGF2 é pouco explorado nesta doença. Até a presente data, apenas dois trabalhos relatam níveis elevados de FGF2 em distúrbios hipertensivos associados à gestação^{70,71}. Não há relatos na literatura de correlação entre os níveis plasmáticos ou placentários de PTX3 e FGF2 na PE e, sabendo da relevante interferência da ligação PTX3/FGF2 no processo angiogênico, resolvemos investigar se há alguma associação entre estas duas proteínas no plasma de gestantes com PE. Além disto, tendo em vista a importância destas duas proteínas em processos biológicos relacionados ao desenvolvimento da PE e também a relevância de caracterizá-las no contexto da doença, investigamos a correlação isolada de PTX3 ou FGF2 com subclassificações da doença (PE precoce e PE tardia) e com alguns fatores de risco.

O grupo de estudos sobre Pré-eclâmpsia da Faculdade de Farmácia da UFMG, coordenado pela professora Luci Maria Sant'Ana Dusse, é referência no estudo da PE. Este grupo vem se dedicando ao esclarecimento da fisiopatologia da PE desde 1995 e possui um repositório de amostras biológicas coletadas ao longo dos anos, que foram utilizadas para a publicação de diversos trabalhos relevantes para a elucidação da doença. Em nosso estudo, utilizamos algumas destas amostras coletadas previamente e gentilmente fornecidas pela professora Luci Maria Sant'Ana Dusse e colaboradores. As amostras são provenientes de dois grandes estudos, sendo um deles transversal (denominado Estudo Transversal 1), ou seja, com coleta pontual no terceiro trimestre de gestação, e o outro estudo longitudinal (denominado Estudo Longitudinal), com coletas ao longo da gestação em gestantes com pelo menos um fator de risco para PE.

No Estudo Transversal 1, relatamos que as amostras eram homogêneas quanto à idade e idade gestacional, o que é importante para eliminar vieses das análises de dados.

Desde o início do século XX, onde os distúrbios hipertensivos da gestação eram uma incógnita para os obstetras e os recursos disponíveis só propiciavam o acesso à evidências clínicas para delinear fatores de risco que diferenciam a PE da hipertensão crônica,

estabeleceu-se quase um dogma de que a PE é uma “doença de primigestas”¹⁴⁴. No entanto, no grupo amostral do Estudo Transversal 1 nós não encontramos diferença estatística na porcentagem de gestantes na primeira gestação entre os grupos PE e NT ($p = 0,3985$). Além disto, não encontramos diferença entre o número de gestantes com histórico familiar ($p = 0,9204$) e pessoal de PE ($p = 0,1580$) entre os grupos PE e NT. Em uma revisão sistemática, foram atribuídos riscos relativos a fatores de risco para PE e, dentre os fatores analisados, ao histórico familiar foi atribuído o risco de 2,9 com relação às mulheres que não tinham este fator e de 7,19 para mulheres com histórico pessoal de PE também em relação às gestantes que não tinham o fator¹⁴⁵. Apesar de serem fatores de risco importantes para o desenvolvimento da doença, não necessariamente eles são igualmente frequentes e o motivo para não encontrarmos diferença pode estar associado ao fato de que o número amostral (N) não foi suficiente para reproduzir dados populacionais.

O ganho de peso na gestação (GPG) foi maior em gestantes com PE quando comparado com gestantes normotensas (Tabela 3, $p = 0,0073$). O ganho elevado de peso durante a gestação é associado ao risco maior de desenvolver PE¹⁴⁶ e o aumento súbito de peso ao invés de distribuído ao longo da gestação também é característico desta doença. Um dos fatores que podem contribuir para este GPG característico da PE é a retenção hídrica excessiva, que ocorre mesmo sem a manifestação visível de edema, uma vez que a perda de proteína resulta em queda na osmolaridade intravascular e consequente perda de líquido para o interstício, causando a retenção de líquido extravascular^{147,148}.

Como esperado, a PA tanto sistólica como diastólica era significativamente maior em gestantes com PE quando comparadas com gestantes normotensas e com não gestantes (Tabela 3, $p > 0,0001$). A hipertensão após a vigésima semana de gestação é a característica clínica principal da PE e mulheres com diagnóstico da doença necessariamente apresentam PA $\geq 140/90$ mmHg¹.

As amostras de placenta utilizadas para análise de expressão gênica e imuno-histoquímica fazem parte do Estudo Transversal 2. Para este estudo, as amostras eram homogêneas quanto a idade das mulheres e idade gestacional, sem diferença significativa entre os grupos de gestantes com PE e NT. Também não encontramos diferença entre os grupos quanto ao GPG (Tabela 4, $p = 0,5614$). Quanto a PA, não obtivemos os dados das medições, no entanto, o diagnóstico de PE foi feito previamente pela equipe médica.

Os dados clínicos das gestantes NT coletados durante o Estudo Longitudinal foram insuficientes e, portanto, a análise estatística ficou comprometida. Por se tratar de um banco de dados antigo, não conseguimos acesso às informações, somente foi possível distinguir entre as amostras pertencentes ao grupo PE e ao grupo NT.

Cetin e colaboradores em 2006, em um estudo com 26 gestantes normais e 17 com PE, relataram pela primeira vez que níveis plasmáticos de PTX3 estão aumentados na PE ¹⁴⁹. Posteriormente, Rovere-Querini também relatou níveis séricos de PTX3 mais aumentados em gestantes com PE quando comparados com normotensas ¹⁵⁰.

Kurz e colaboradores em 2001 relataram que os níveis séricos de FGF2 estavam aumentados na hipertensão induzida pela gravidez, condição descrita como PA \geq 140/90 mmHg após a vigésima semana de gestação ⁷¹. Este estudo foi realizado com 46 mulheres que apresentaram hipertensão induzida pela gravidez, 46 gestantes saudáveis e 46 mulheres não grávidas. Atualmente, de acordo com a ISSHP, a condição de hipertensão induzida pela gravidez relatada no estudo é classificada como hipertensão gestacional ², caracterizada por hipertensão de novo (pressão arterial sistólica (PAS) \geq 140 mm Hg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) \geq 90 mm Hg) após a vigésima semana de gestação e sem a presença de outros sintomas. FGF2 também foi relatado como aumentado no plasma de pacientes com PE leve, uma subclassificação da doença que já não é mais considerada de acordo com a literatura atual, que é caracterizada por PAS \geq 140 mmHg e PAD \geq 90 mmHg e proteinúria $>$ 300 mg/24h ⁷⁰. Neste mesmo trabalho, os autores não encontraram variação significativa entre os níveis de FGF2 em soro de gestantes com PE grave quando comparado com o soro de gestantes normais. A PE grave também é uma subclassificação antiga caracterizada por PAS \geq 160 mmHg e PAD \geq 110 mmHg, proteinúria $>$ 5g/24h, creatinina sérica elevada ($>$ 1mg/dL), edema pulmonar, oligúria ($<$ 500 mL/24h), hemólise microangiopática, trombocitopenia ($<$ 150.000 g/L), eclâmpsia ou restrição do crescimento fetal intrauterino ⁷⁰.

Na gestação normal, os níveis de FGF2 ^{71,151} e PTX3 ¹⁵² já foram relatados como aumentados e esse aumento pode ter relação tanto com a resposta inflamatória leve característica da gestação quanto com a angiogênese, que é importante para o processo de desenvolvimento da gestação. Nossos dados para FGF2 estão de acordo com o que já foi reportado, no entanto, não encontramos diferença entre níveis plasmáticos de PTX3 de não gestantes e gestantes normais (figura 7). Embora sejam os mesmos marcadores dosados, o grupo amostral dos

estudos encontrados na literatura é diferente do grupo de mulheres que recrutamos para nosso estudo, de nacionalidade e etnia diferente e essa variação pode influenciar nos resultados. As diferentes concentrações de biomarcadores nas diversas etnias podem ocorrer como consequência de fatores genéticos e ambientais ¹⁵³. Visto isso, para a elucidação de mecanismos envolvidos na fisiopatologia de doenças, estudos em diferentes populações e subpopulações são importantes, de maneira que várias etnias sejam investigadas. Sendo assim, mesmo que estudos anteriores tenham encontrado uma relação de PTX3 e FGF2 com a PE, ainda não existem estudos com estes fatores na população brasileira, ressaltando, portanto, a relevância do nosso trabalho.

FGF2 já foi reportado como aumentado no soro de gestantes com doenças hipertensivas associadas a gestação ^{70,71}, porém os estudos ainda são escassos e antigos e não há nenhum que relata as alterações de FGF2 em amostras de sangue (sejam soro ou plasma) de mulheres diagnosticadas com PE de acordo com os parâmetros de diagnóstico adotados na clínica atualmente e já citados anteriormente na introdução. Por se tratar de uma doença antiga, frequente e ainda pouco elucidada, várias definições das manifestações clínicas da PE foram publicadas ao longo do tempo na literatura e propostas por vários órgãos profissionais espalhados pelo mundo todo e a dificuldade na interpretação de dados envolvendo a PE se deve à grande variação nas definições da doença. Como consequência, várias diretrizes diferentes para o manejo da PE são adotadas, tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento, o que dificulta ainda mais a comparação de estudos desenvolvidos anteriormente. Atualmente, uma definição internacionalmente acordada para diagnóstico da PE é a da ISSHP, o que facilita e contribui para uma caracterização da doença mais homogênea e universal ². Os trabalhos publicados envolvendo FGF2 e distúrbios hipertensivos da gestação, ora chamados de PE no decorrer das descrições dos estudos, não estão de acordo com esta classificação atual, o que torna difícil a associação dos dados encontrados em nosso estudo com estes já publicados. Apesar disto, os dados encontrados na literatura dão suporte aos nossos resultados, uma vez que FGF2 vêm sendo descrito como aumentado nos distúrbios hipertensivos associados à gestação ^{70,71}.

Embora a PE seja caracterizada por um estado antiangiogênico, encontramos FGF2, um potente fator pró-angiogênico, aumentado nesta doença (figura 7). Sabe-se que FGF2 possui um papel na manutenção do tônus vascular, uma vez que a administração deste diminui a PA em ratos ¹⁵⁴ e é capaz de restaurar a atividade da NO sintase em ratos espontaneamente

hipertensos ¹⁵⁵. Além disso, vasos de camundongos *Fgf2*^{-/-} têm uma resposta reduzida aos vasoconstrictores ¹⁵⁶. Estes camundongos nocautes são hipotensos devido a diminuição da contratilidade do músculo liso e, apesar disto, ainda apresentavam capacidade de regulação da pressão sanguínea ¹⁵⁷ e a vascularização é normal ¹⁵⁸. Por outro lado, a superexpressão de *Fgf2* não desencadeou efeitos vasculares espontâneos ¹⁵⁹. Notoriamente, existe um mecanismo compensatório entre os mediadores da angiogênese, o que nos leva a pensar que apesar da PE ser uma doença na qual o estado antiangiogênico seja crucial em sua fisiopatologia, FGF2 aumenta como uma resposta de compensação aos fatores pró-angiogênicos que estão diminuídos nesta doença, como VEGF e PlGF.

Uma outra característica da PE que pode ter influência nos níveis aumentados de FGF2 é a hipóxia, que tem uma forte relação com a fisiopatologia da PE, uma vez que é relatada como exacerbada ¹. Em um modelo de cocultura, condições de hipóxia induziram a produção de FGF2 em células endoteliais vasculares das artérias espirais uterinas estressadas e FGF2 foi relacionado com a diminuição de MMP9 (*Matrix Metalloproteinase 9*) e aumento de TIMP1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) em trofoblastos extravilosos, que são moléculas cujo equilíbrio entre elas é importante para invasão trofoblástica. Essa incongruência observada leva a uma invasão reduzida e, conseqüentemente, à placentação superficial ¹⁶⁰.

Além disso, FGF2 pode ser produzido por células inflamatórias, como monócitos/macrófagos ^{84,85}, linfócitos T ^{81,161} e mastócitos ⁸⁶ e através de uma análise transcriptômica, foi demonstrado que FGF2 ativa uma complexa assinatura pró-inflamatória em células endoteliais microvasculares de camundongos ⁷². FGF2 amplifica a resposta à estímulos inflamatórios de células endoteliais através dos seus efeitos vasoativos e recrutamento de infiltrado inflamatório e coopera sinergicamente com a Interleucina 17 (IL17) na promoção de inflamação autoimune em artrite reumatoide ¹⁶². Estudos anteriores demonstraram que IL17 está aumentado no plasma de gestantes com PE ¹⁶³, assim como FGF2, conforme relatamos neste estudo, o que pode ser um indicativo de correlação entre estas duas moléculas também na PE e a investigação desta correlação é uma perspectiva interessante.

Mediadores inflamatórios, tais como IL1B ¹⁶⁴ e IL2 ⁸⁹, desencadeiam a produção e liberação de FGF2 a partir de células endoteliais e, em soro de gestantes com PE, estes mediadores já foram relatados como aumentados ¹⁶⁵. O envolvimento de FGF2 com inflamação e resposta imune também pode explicar o porquê do aumento no plasma de gestantes com PE conforme

encontramos, tendo em vista que a inflamação é relatada como exacerbada na PE e importante para o desenvolvimento da doença e os mediadores que desencadeiam a produção de FGF2 em outros contextos, já foram relatados também como aumentados na PE.

A inflamação também pode prejudicar a angiogênese promovida por FGF2, uma vez que estimula a produção de moléculas que impedem a ação de FGF2. Uma destas moléculas é a PTX3, que também encontramos aumentada em plasma de gestantes com PE. Embora FGF2 seja uma molécula pró-angiogênica e os níveis de estejam aumentados na PE, a produção aumentada de PTX3, um inibidor natural da angiogênese mediada por FGF2, pode estar contribuindo para o estado anti-angiogênico característico da PE.

Outrossim, concentrações plasmáticas de PTX3 aumentadas encontradas em nosso trabalho suportam a hipótese de que a PE representa a manifestação clínica de uma DE como parte de uma resposta inflamatória exacerbada ¹²³.

Evidências têm mostrado que os GCs são capazes de modular a expressão de PTX3. Essa modulação é variável e específica para os diferentes tipos celulares ¹⁶⁶. Em células dendríticas mieloides, os GCs regulam negativamente PTX3, enquanto nos fibroblastos e nas células endoteliais, a expressão de PTX3 é regulada positivamente por GCs ¹⁶⁷. Na PE, os GCs são utilizados para maturação do pulmão dos fetos em desenvolvimento, além de prevenirem a síndrome do desconforto respiratório neonatal ¹⁶⁸. Tendo em vista a possível influência dos GCs na concentração plasmática de PTX3 em mulheres com PE que faziam o uso destes medicamentos, nós avaliamos se havia diferença entre os níveis de PTX3 encontrados em gestantes com a doença que faziam o uso ou não de de GCs. Nas amostras avaliadas, os GCs não influenciaram na concentração de PTX3 no plasma das gestantes, uma vez que não houve diferença significativa entre os grupos. No entanto, conforme podemos observar na figura 8, as amostras com maiores concentrações de PTX3 no grupo amostral avaliado estão entre as gestantes que faziam uso de GCs. Por se tratar de um N pequeno, talvez por isso não foi possível observar o aumento de PTX3 de maneira significativa nas gestantes que utilizaram GC. Contudo, tanto as gestantes com PE que utilizaram GCs quanto as que não utilizaram, apresentaram concentrações plasmáticas de PTX3 mais elevadas que as gestantes normotensas, reforçando que embora essa classe de medicamentos possa influenciar na expressão de PTX3, os níveis plasmáticos elevados ainda persistem mesmo sem os GCs, indicando que PTX3 não aumenta como consequência da utilização de GCs unicamente.

A DE é uma característica de distúrbios cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial. Os principais mecanismos que levam à esta característica na hipertensão são a vasoconstrição do músculo liso aumentada e o comprometimento da via do NO ^{169,170}. Evidências apontam que a inflamação local e sistêmica possui um papel fundamental para o desenvolvimento da DE e sugerem um papel importante das proteínas de fase aguda ^{171,172}. Altos níveis plasmáticos de PTX3 vêm sendo associados à DE em diferentes doenças, tais como insuficiência renal crônica e PE. Em modelos experimentais, a ausência de PTX3 é acompanhada por diminuição da inflamação e lesão tecidual e diminui a letalidade dos animais nocautes após reperfusão da artéria mesentérica superior isquêmica, demonstrando que PTX3 é fundamental para a cascata de eventos que levam à inflamação e lesão tecidual após isquemia/reperfusão ¹⁷³.

A inflamação associada a PE é um fator que contribui para o aumento dos níveis plasmáticos de PTX3. Estudos prévios demonstraram que TNFA ^{174,175} também está aumentado no plasma e soro de gestantes com PE e essa citocina é estimuladora da produção de PTX3 por diversas células (figura 5). Outras moléculas envolvidas no processo inflamatório já foram relatadas como aumentadas na PE, como CRP, ANXA1 ¹⁷⁶ e LXA4 ¹⁷⁷. A CRP é uma proteína que pertence a mesma família de PTX3 e elas compartilham a região C-terminal semelhante. Apesar disso, níveis plasmáticos de PTX3 em muitos casos não se correlacionam com CRP em doenças cardiovasculares, indicando que estas proteínas são independentes ¹²⁵.

A ANXA1 é uma proteína anti-inflamatória e pró-resolutiva que tem sua produção estimulada por LPS e IL6 ¹⁷⁶. Entre suas funções no processo inflamatório pode-se destacar a limitação no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da inflamação, a produção de mediadores pró-inflamatórios, bem como a indução de apoptose de neutrófilos ¹⁷⁸. Por outro lado, a PTX3 possui uma função dual na inflamação, conforme mencionado na introdução, podendo ser promotora da inflamação em alguns casos e anti-inflamatória em outros e sua ação é dependente da amplitude e origem da lesão ¹⁷⁹.

Estudos anteriores utilizando as mesmas amostras que utilizamos neste trabalho caracterizaram o aumento de ANXA1, CRP e LXA4 na PE ^{176,177}. Neste estudo, encontramos uma correlação positiva entre PTX3 e ANXA1 (Tabela 6, $r = 0,59217$; $p = 0,0023$) em gestantes normais. Na PE, não há correlação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e ANXA1, conforme mostrado na tabela 6. Estes resultados reforçam o envolvimento de PTX3 na inflamação e a correlação da concentração plasmática de PTX3 e ANXA1 em gestantes normotensas pode ser um indicativo de que PTX3 tenha um papel anti-inflamatório na

gestação normal, que é caracterizada por uma inflamação crônica leve. No entanto, mais estudos são necessários para confirmação desta hipótese.

PTX3 também foi reportada na literatura como um marcador de gravidade da PE, uma vez que níveis mais elevados desta proteína foram encontrados nas formas mais graves da doença, tal como a PE precoce^{180,181}. A PE precoce é menos frequente e a forma clinicamente mais grave da doença, com prognóstico ruim, numerosas lesões isquêmicas na placenta e associada a uma recorrência de 60% em gestações futuras da mãe que desenvolveu, enquanto que na forma tardia, a recorrência é de 10 a 20%^{3,4,182}. Encontrar biomarcadores de gravidade da PE é muito importante, pois além de ser uma doença com etiologia desconhecida, a PE é silenciosa e de rápida evolução¹⁸³ e havendo biomarcadores preditivos, o manejo da doença se torna mais efetivo e pode-se estabelecer, através da prevenção, uma terapia para escapar das complicações mais severas.

No presente estudo, encontramos concentrações plasmáticas elevadas de PTX3 em PE precoce e PE tardia quando comparados com NT e não houve diferença entre os níveis de PTX3 na PE precoce quando comparada com PE tardia (figura 9). Por outro lado, FGF2 apresentou um perfil de concentrações diferente nas duas entidades da doença: as concentrações plasmáticas de FGF2 são maiores na PE precoce quando comparadas com PE tardia (figura 9). Nossos resultados indicam que PTX3 é um potente marcador de PE, uma vez que sua produção se mantém elevada em qualquer que seja o período da gestação em que os sintomas se manifestam e que FGF2 pode ser um potente biomarcador de gravidade. Além disso, estes dados apontam que PTX3 e FGF2 podem estar envolvidos em mecanismos fisiopatológicos distintos, uma vez que as formas precoce e tardia da PE são propostas como tendo etiologias diferentes⁵. Para confirmar nossa hipótese, seria interessante um estudo com um número maior de mulheres pois o número de amostras disponíveis provenientes de gestantes com PE precoce e tardia eram baixos.

De encontro com a hipótese de que PTX3 e FGF2 estão relacionados a mecanismos fisiopatológicos diferentes e levando-se em consideração que a PE é uma doença multifatorial¹, não encontramos correlação entre os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 na PE, tampouco na gestação normal ou em mulheres não gestantes (figura 10). PTX3 é uma molécula de fase aguda com importantes funções na imunidade inata, na regulação de reações inflamatórias, angiogênese e fertilidade feminina¹⁸⁴. Por outro lado, FGF2 é um fator pró-angiogênico que

tem funções importantes na inflamação, hipóxia, embriogênese, proliferação e migração celular ⁵⁷. Ainda que estas duas moléculas estejam envolvidas em processos semelhantes, como a inflamação e a angiogênese, e sejam capazes de interagir entre si através de uma ligação altamente específica, os mecanismos que levam a produção de cada uma delas são independentes e os estímulos derivados de vias distintas, o que pode influenciar os níveis plasmáticos também de maneira independente, conforme encontramos aqui.

O envolvimento de PTX3 e FGF2 no processo de placentação pode ser melhor caracterizado através da dosagem destes marcadores no período da gestação em que a invasão trofoblástica ocorre massivamente, que compreende o primeiro trimestre. Cetin e colaboradores em 2009, através de um estudo prospectivo caso-controle, examinaram um grupo de gestantes no primeiro trimestre de gestação (11 a 14 semanas) através de exames de ultrassom e análise de marcadores em soro, com coleta pontual somente neste período. Dentre as gestantes examinadas, 16 desenvolveram PE e outras 60 tiveram gestações sem complicações até o momento do parto (grupo controle). As gestantes que desenvolveram PE tinham níveis séricos aumentados de PTX3 já no primeiro trimestre de gestação, quando comparados com os níveis séricos do grupo controle ¹²⁹. Esse estudo indica que PTX3 é um potencial preditivo para o risco de desenvolver PE e pode estar envolvido na resposta inflamatória materna à placentação superficial atribuída à PE.

Um estudo longitudinal, envolvendo PTX3 e outros marcadores com coletas de sangue ao longo dos três trimestres de gestações que progrediram para PE (n=13), identificou que apesar de níveis séricos aumentados em todos os períodos quando comparados com gestantes saudáveis com mesma idade gestacional (n=70), não foram encontradas variações na concentração de PTX3 entre os intervalos avaliados ¹³⁰. Esse trabalho reafirma que PTX3 está elevada já no primeiro trimestre de gestação, indicando-a como um potencial biomarcador preditivo para PE. Além disso, na gestação normal, diferente da gestação com PE, um aumento progressivo de PTX3 ao longo dos trimestres foi observado, o que sugere que o aumento da resposta inflamatória pode ser progressivo ¹³⁰.

Não existe nenhum estudo longitudinal que descreva a concentração plasmática de FGF2 no decorrer da gestação em mulheres que desenvolveram PE. No entanto, Lygnos e colaboradores em 2006 descreveram o perfil da concentração plasmática de FGF2 em diferentes períodos da gestação saudável. Para este estudo, foram recrutadas 11 mulheres no

primeiro trimestre, 18 no segundo, 39 no terceiro e 9 gestantes no dia do parto. Os níveis plasmáticos de FGF2 estavam significativamente aumentados no primeiro trimestre da gestação e subsequentemente, apresentaram uma tendência de declínio, aumentando novamente no dia do parto. Em todos os trimestres, observou-se um aumento na concentração plasmática quando comparada com a FGF2 no plasma de mulheres não gestantes. O aumento de FGF2 no primeiro trimestre da gestação normal pode ter correlação com o ambiente com baixa tensão de oxigênio nos estágios iniciais da implantação, que ocorre normalmente nas primeiras 9 semanas de gestação. Esse ambiente de hipóxia é importante para favorecer a proliferação dos trofoblastos e a invasão da decídua ^{18,24}.

Através de um pequeno estudo longitudinal, avaliamos a concentração plasmática de PTX3 e FGF2 em 4 períodos da gestação: segundo trimestre (A), segundo e terceiro trimestre (B) e terceiro trimestre (C e D). Não encontramos diferença estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de PTX3 ou FGF2 entre nenhum dos períodos quando comparados com normotensas no mesmo período e nem entre os pontos A, B, C ou D (Figura 12). Além do número de amostras para cada ponto ser pequeno, fazendo com que o resultado encontrado não seja consistente, o delineamento do estudo não contemplou o primeiro trimestre da gestação, que é um período crucial na formação da placenta. Em abordagens futuras, pretendemos incluir o primeiro trimestre no estudo, para melhor caracterizar possíveis biomarcadores preditivos, além de tentar abranger um N maior.

Através de gráficos com dois eixos de cada amostra individualmente, buscamos verificar qualitativamente os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 das gestantes (figuras 13 e 14). Observamos que na pré-eclâmpsia, PTX3 e FGF2 apresentaram uma tendência de aumento dos seus níveis plasmáticos ao longo da gestação, enquanto nas gestantes normotensas, a variação foi maior e PTX3 e FGF2, sem uma tendência aparente. De um modo geral, encontramos mais pontos de divergências entre PTX3 e FGF2 em gestantes normotensas do que na PE. Devido ao pequeno número amostral, não foi possível observar um padrão que pudesse servir como base para alguma conclusão sobre esse resultado e seria interessante que PTX3 e FGF2 fossem avaliados qualitativamente e individualmente com um número maior de gestantes, para que seja possível uma análise mais robusta. A ausência de coleta em vários períodos de amostra da mesma gestante também comprometeu o estabelecimento de uma cinética mais elucidativa bem como a falta de dados clínicos das pacientes.

Buscamos avaliar as alterações na modulação da expressão de PTX3, FGF2 e de alguns genes inflamatórios (IL1B e TNFA), pró-angiogênicos (VEGFA, FGF2 e KDR) e antiangiogênicos (FLT-1) no contexto da placenta. Embora os genes avaliados sejam importantes para os processos angiogênicos e inflamatórios, nós não encontramos diferença significativa de expressão gênica, na placenta no momento do parto, entre NT e PE para nenhum deles (figura 18). Nem sempre o que está alterado no sangue, estará também na placenta e essa constatação se deve ao fato de que a PE é uma doença multissistêmica e multifatorial, ou seja, envolve tanto o processo de formação da placenta e de desenvolvimento embrionário, quanto as manifestações sistêmicas maternas (hipertensão, inflamação, imunidade, etc).

Sendo assim, mesmo que tenhamos encontrado PTX3 aumentada no plasma das gestantes com PE, não encontramos diferença entre os níveis de expressão placentária quando comparados com normotensas. Ainda que o N que utilizamos para este experimento tenha sido pequeno, o que torna nosso resultado inconclusivo, estes dados vão de encontro com a hipótese de que PTX3 pode estar envolvida na resposta inflamatória materna e que o endotélio sistêmico da mãe representa um importante local de síntese de PTX3 na PE e não a placenta. Para confirmar esta suspeita, seria necessário um estudo com um número maior de amostras, além de outras abordagens de detecção da proteína na placenta das gestantes, tanto de PTX3 quanto dos outros marcadores utilizados na análise de expressão gênica deste estudo. Como, muitas vezes, as taxas de transcrição em um dado momento podem não corresponder à expressão proteica, estão em andamento experimentos de imuno-histoquímica para avaliar os níveis destas proteínas no tecido. Estas análises serão também importantes para identificar as células responsáveis pela produção de PTX3 e FGF2 na placenta.

3. RESUMO DOS RESULTADOS

- A concentração de PTX3 no plasma de gestantes com PE no terceiro trimestre de gestação são muito mais altos do que os encontrados em mulheres não gestantes ou na gestação normal, entretanto, os níveis plasmáticos são semelhantes das gestantes com PE precoce e tardia no terceiro trimestre de gestação;
- Os níveis plasmáticos de FGF2 no terceiro trimestre de gestação são mais elevados do que os encontrados no plasma de mulheres não gestantes e são ainda maiores no plasma de gestantes que desenvolveram PE;

- O uso de glicocorticoides não impactou as concentrações de PTX3 no plasma das gestantes com PE, no terceiro trimestre da gestação;
- Os níveis plasmáticos de FGF2 são mais altos em gestantes do que em mulheres não grávidas e a concentração no plasma de gestantes normotensas e com PE tardia são semelhantes no terceiro trimestre da gestação. Entretanto, seus níveis aumentam mais de duas vezes no plasma coletado na terceira semana das gestantes que apresentaram PE precoce;
- Os níveis plasmáticos de PTX3 e FGF2 não se correlacionam no terceiro trimestre de gestação;
- As concentrações plasmáticas de PTX3 e FGF2 não estão correlacionadas com ganho de peso na gestação ou primigestação;
- Os níveis plasmáticos de PTX3 no terceiro trimestre da gestação em gestantes normotensas se correlacionam positivamente com os níveis plasmáticos de ANX1A;
- Não foram encontradas variações estatisticamente significativas dos níveis de PTX3 e FGF2 no plasma coletado das gestantes normotensas e com PE nos diferentes trimestres ao longo da gestação;
- Não há diferença entre a expressão gênica de PTX3, FGF2, IL1B, TNFA, KDR, FLT1, VEGFA e FGF2 na placenta de gestantes e de gestantes com PE.

4. CONCLUSÃO

PTX3 e FGF2 estão aumentados na PE e as concentrações plasmáticas destas duas moléculas aumentam de maneira independente entre si, não havendo correlação entre os seus níveis plasmáticos. A concentração aumentada de FGF2 no plasma no terceiro trimestre de gestação correlaciona-se à forma mais grave da doença, que é a PE precoce, apontando seu potencial como um marcador de gravidade. PTX3, por sua vez, mostra-se um marcador de PE e suas concentrações plasmáticas no terceiro trimestre da gestação normal correlaciona-se positivamente à da ANX1A, porém não permite diferenciar a doença entre tardia ou precoce.

5. PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresenta dados que ajudam a melhor entender a PE através da caracterização do perfil de expressão de PTX3 e FGF2 nesta doença e suscitam a necessidade de novos estudos. Embora nossos resultados sejam consistentes, alguns experimentos deverão ser realizados para sanar algumas das limitações encontradas em nosso estudo, tais como

aumento do número amostral e coleta de maior número de informações clínicas das pacientes bem como coleta de amostras em período mais inicial do primeiro trimestre da gestação e/ou em intervalos mais curtos (o que seria ideal para estabelecimento de uma cinética de concentração dos marcadores). O uso de outras abordagens metodológicas como a imunohistoquímica poderão ajudar a elucidar os tipos celulares e a relevância da expressão dos marcadores alvo de nosso estudo na placenta e sua interferência no desenvolvimento da placenta.

Numa tentativa de aumento do número amostral, um convênio foi firmado entre a UFMG e a Maternidade Odete Valadares e também para coleta de amostras nos centros de saúde da Prefeitura de Belo Horizonte. Com estes acordos espera-se criar um repositório de amostras tanto de plasma quanto de placenta para trabalhos posteriores utilizando diferentes abordagens. Estas amostras vão abranger dois modelos experimentais: um estudo transversal, com coletas pontuais no terceiro trimestre de gestação de plasma e soro e de placenta, que será coletada no momento do parto; e um estudo longitudinal, com coletas nos três trimestres da gestação.

Com estas novas amostras, pretendemos analisar a concentração de PTX3 e FGF2 no plasma das gestantes com PE, desta vez com o número amostral maior e correlacionar com a expressão placentária em uma mesma paciente. Além disso, seria interessante também avaliar a expressão de TNFAIP6, tendo em vista que, conforme descrito na figura 6, TNFAIP6 influencia a ligação entre PTX3 e FGF2.

O estudo longitudinal é o ponto chave para a elucidação de moléculas envolvidas na patogênese da doença. Com ele, poderemos correlacionar as concentrações plasmáticas encontradas em cada período com os estágios da gestação. Com um número amostral satisfatório, de aproximadamente 30 gestantes que desenvolverem PE, conseguiremos dados robustos sobre a concentração de PTX3 e FGF2 ao longo da gestação.

Com o desenvolvimento do presente trabalho, ressalta-se a importância da coleta rigorosa também dos dados clínicos das pacientes, que são fundamentais para o entendimento do contexto biológico e extremamente úteis em análises de correlação que poderão apontar padrões de expressão de moléculas que de forma isolada ou em combinação possam apresentar poder diagnóstico ou mesmo preditivo de PE.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzing, T. & Karumanchi, S. A. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nature Reviews Nephrology* **15**, 275–289 (2019).
2. Poon, L. C. *et al.* The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on pre-eclampsia: A pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **145**, 1–33 (2019).
3. Dekker, G. A. *et al.* Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* (1995). doi:10.1016/0002-9378(95)91324-6
4. Von Dadelszen, P., Magee, L. A. & Roberts, J. M. Subclassification of Preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy* (2003). doi:10.1081/PRG-120021060
5. Khodzhaeva, Z. S. *et al.* Clinical and pathogenetic features of early- and late-onset pre-eclampsia. *J. Matern. Neonatal Med.* **29**, 2980–2986 (2016).
6. Keyes, L. E. *et al.* Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr. Res.* (2003). doi:10.1203/01.PDR.0000069846.64389.DC
7. Hypertension in Pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **122**, 1122–1131 (2013).
8. Sammour, M. B., El-Kabarity, H., Fawzy, M. M. & Schindler, A. E. *WHO Recommendations for prevention and treatment of pre-eclampsia and eclampsia. WHO Recommendations for Prevention and Treatment of Pre-Eclampsia and Eclampsia* **97**, (2011).
9. Peraçoli, J. C. *et al.* Pre-eclampsia/Eclampsia. *Rev Bras Ginecol Obs.* **41**, 318–332 (2019).
10. Roberge, S., Bujold, E. & Nicolaides, K. H. Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **218**, 287-293.e1 (2018).
11. Committee Opinion Emergent Therapy for Severe Hypertension e175. doi:10.1002/14651858.CD001449.pub3
12. *Gestação de alto risco: manual técnico.* (Editora MS, 2010).
13. The Eclampsia Trial Collaborative Group. Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial. *Lancet* **345**, 1455–1463 (1995).
14. Duley, L., Gülmezoglu, A. M. & Chou, D. Magnesium sulphate versus lytic cocktail for eclampsia. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2010). doi:10.1002/14651858.cd002960.pub2
15. Duley, L., Henderson-Smart, D. J., Walker, G. J. & Chou, D. Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2010). doi:10.1002/14651858.cd000127.pub2
16. Duley, L., Henderson-Smart, D. J. & Chou, D. Magnesium sulphate versus phenytoin for eclampsia. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2010). doi:10.1002/14651858.cd000128.pub2

17. Moore, K. L. & Persaud, M. G. T. *Embriologia Clínica*. (Elsevier, 2016).
18. Chaiworapongsa, T., Chaemsaihong, P., Yeo, L. & Romero, R. Pre-eclampsia part 1: Current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology* **10**, 466–480 (2014).
19. Lunell, N. O., Nylund, L. E., Lewander, R., Sarby, B. & Thornström, S. Uteroplacental blood flow in pre-eclampsia measurements with indium-113m and a computer-linked gamma camera. *Hypertens. Pregnancy* **B1**, 105–117 (1982).
20. Brosens, I., Robertson, W. B. & Dixon, H. G. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J. Pathol. Bacteriol.* **93**, 569–579 (1967).
21. Brosens, I. & Renaer, M. ON THE PATHOGENESIS OF PLACENTAL INFARCTS IN PRE-ECLAMPSIA. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **79**, 794–799 (1972).
22. Zhou, Y. *et al.* Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate: A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.* **99**, 2139–2151 (1997).
23. Zhou, Y., Damsky, C. H. & Fisher, S. J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype: One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J. Clin. Invest.* **99**, 2152–2164 (1997).
24. Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N. & Jauniaux, E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2954–2959 (2002).
25. Caniggia, I. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF β 3. *J. Clin. Invest.* **105**, 577–587 (2000).
26. Cindrova-Davies, T. *et al.* Energy status and HIF signalling in chorionic villi show no evidence of hypoxic stress during human early placental development. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 296–308 (2014).
27. Rajakumar, A., Doty, K., Daftary, A., Harger, G. & Conrad, K. P. Impaired oxygen-dependent reduction of HIF-1 α and -2 α proteins in pre-eclamptic placentae. *Placenta* **24**, 199–208 (2003).
28. Tal, R. *et al.* Effects of hypoxia-inducible factor-1 α overexpression in pregnant mice: Possible implications for preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am. J. Pathol.* **177**, 2950–2962 (2010).
29. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* **25**, 287–299 (2011).
30. Burton, G. J., Woods, A. W., Jauniaux, E. & Kingdom, J. C. P. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. *Placenta* **30**, 473–482 (2009).
31. Rätsep, M. T. *et al.* Uterine natural killer cells: Supervisors of vasculature construction in early decidua basalis. *Reproduction* **149**, R91–R102 (2015).
32. Cavalli, R. C. *et al.* Induced human decidual NK-like cells improve utero-placental perfusion in mice. *PLoS One* **11**, (2016).
33. Hiby, S. E. *et al.* Maternal activating KIRs protect against human reproductive failure

- mediated by fetal HLA-C2. *J. Clin. Invest.* **120**, 4102–4110 (2010).
34. Chazara, O., Xiong, S. & Moffett, A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 703–716 (2011).
 35. Robillard, P. Y., Dekker, G. A. & Hulsey, T. C. Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: Primigravidity or primipaternity? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **84**, 37–41 (1999).
 36. Sones, J. L. *et al.* Angiogenic factor imbalance precedes complement deposition in placentae of the BPH/5 model of preeclampsia. *FASEB J.* **32**, 2574–2586 (2018).
 37. Vaught, A. J. *et al.* Germline mutations in the alternative pathway of complement predispose to HELLP syndrome. *JCI insight* **3**, (2018).
 38. Verdonk, K., Visser, W., Van Den Meiracker, A. H. & Danser, A. H. J. The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia: The delicate balance between good and bad. *Clin. Sci.* **126**, 537–544 (2014).
 39. Burke, S. D. *et al.* Soluble FMS-like Tyrosine Kinase 1 promotes angiotensin II sensitivity in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* **126**, 2561–2574 (2016).
 40. Hubel, C. A. *et al.* Agonistic angiotensin II type 1 receptor autoantibodies in postpartum women with a history of preeclampsia. in *Hypertension* **49**, 612–617 (2007).
 41. Saleh, L., Verdonk, K., Visser, W., Van Den Meiracker, A. H. & Danser, A. H. J. The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* **10**, 282–293 (2016).
 42. Lankhorst, S., Danser, A. H. J. & Van Den Meiracker, A. H. Endothelin-1 and antiangiogenesis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **310**, R230–R234 (2016).
 43. Brandão, A. H. F., Félix, L. R., Do Carmo Patrício, E., Leite, H. V. & Cabral, A. C. V. Difference of endothelial function during pregnancies as a method to predict preeclampsia. *Arch. Gynecol. Obstet.* **290**, 471–477 (2014).
 44. Sierra-Laguado, J., Garcia, R. G. & López-Jaramillo, P. Flow-mediated dilatation of the brachial artery in pregnancy. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **93**, 60–61 (2006).
 45. Canbakan, B. *et al.* Circulating endothelial cells in preeclampsia. *J. Hum. Hypertens.* **21**, 558–563 (2007).
 46. Adekola, H. *et al.* Endocan, a putative endothelial cell marker, is elevated in preeclampsia, decreased in acute pyelonephritis, and unchanged in other obstetrical syndromes. *J. Matern. Neonatal Med.* **28**, 1621–1632 (2015).
 47. Tuzcu, Z. B. *et al.* Circulating endothelial cell number and markers of endothelial dysfunction in previously preeclamptic women. in *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **213**, 533.e1-533.e7 (Mosby Inc., 2015).
 48. Cakmak, M. *et al.* Serum levels of endocan correlate with the presence and severity of pre-eclampsia. *Clin. Exp. Hypertens.* **38**, 137–142 (2016).
 49. Possomato-Vieira, J. S. & Khalil, R. A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Pregnancy and Preeclampsia. in *Advances in Pharmacology* **77**, 361–431 (Academic Press Inc., 2016).
 50. Venkatesha, S. *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia.

- Nat. Med.* **12**, 642–649 (2006).
51. Wallace, K. *et al.* Hypertension, inflammation and T lymphocytes are increased in a rat model of HELLP syndrome. *Hypertens. Pregnancy* **33**, 41–54 (2014).
 52. Levine, R. J. *et al.* Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* **355**, 992–1005 (2006).
 53. Powe, C. E., Levine, R. J. & Karumanchi, S. A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: The role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* **123**, 2856–2869 (2011).
 54. Jardim, L. L. *et al.* Is the imbalance between pro-angiogenic and anti-angiogenic factors associated with preeclampsia? *Clinica Chimica Acta* (2015). doi:10.1016/j.cca.2015.05.004
 55. Wikström, A. K. *et al.* Placental growth factor and soluble FMS-like tyrosine kinase-1 in early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **109**, 1368–1374 (2007).
 56. Maynard, S., Epstein, F. H. & Karumanchi, S. A. Preeclampsia and Angiogenic Imbalance. *Annu. Rev. Med.* **59**, 61–78 (2008).
 57. Presta, M., Foglio, E., Schuind, A. C. & Ronca, R. Long pentraxin-3 modulates the angiogenic activity of fibroblast growth factor-2. *Front. Immunol.* **9**, 1–9 (2018).
 58. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**, 389–395 (2000).
 59. Ronca, R., Benkheil, M., Mitola, S., Struyf, S. & Liekens, S. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. *Med. Res. Rev.* **37**, 1231–1274 (2017).
 60. Presta, M. *et al.* Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 159–178 (2005).
 61. Shing, Y. *et al.* Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223**, 1296–9 (1984).
 62. Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R. & Schreiber, A. B. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. *Science* **225**, 932–5 (1984).
 63. Katoh, M. & Nakagama, H. FGF Receptors: Cancer Biology and Therapeutics. *Med. Res. Rev.* **34**, 280–300 (2014).
 64. Giacomini, A. *et al.* Blocking the FGF/FGFR system as a “two-compartment” antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy. *Pharmacol. Res.* **107**, 172–185 (2016).
 65. Nunes, J. P. S. Avaliação do papel da Pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas. (2018).
 66. Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erbeni, T. & Kotowski, A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat. (Basel)*. **136**, 190–203 (1989).
 67. Aşan, E., Kaymaz, F. F., Cakar, A. N., Dağdeviren, A. & Beksaç, M. S. Vasculogenesis in early human placental villi: an ultrastructural study. *Ann. Anat.* **181**, 549–54 (1999).
 68. Zygmont, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U. & Liang, O. D. Angiogenesis and

- vasculogenesis in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **110**, 10–18 (2003).
69. Khaliq, A. *et al.* Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors* **13**, 243–50, color plates I–II, pre. bk cov (1996).
 70. Hohlagschwandtner, M. *et al.* Basic fibroblast growth factor and hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertens. Pregnancy* **21**, 235–241 (2002).
 71. Kurz, C. *et al.* Maternal Basic Fibroblast Growth Factor Serum Levels Are Associated With Pregnancy-Induced Hypertension. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **8**, 24–26 (2001).
 72. Andrés, G. *et al.* A pro-inflammatory signature mediates FGF2-induced angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 2083–2108 (2009).
 73. Szade, A., Grochot-Przeczek, A., Florczyk, U., Jozkowicz, A. & Dulak, J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life* **67**, 145–159 (2015).
 74. Presta, M., Andrés, G., Leali, D., Dell’Era, P. & Ronca, R. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis. *European Cytokine Network* **20**, 39–50 (2009).
 75. Zijlstra, A. *et al.* Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* **107**, 317–327 (2006).
 76. Aplin, A. C., Gelati, M., Fogel, E., Carnevale, E. & Nicosia, R. F. Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor induce expression of inflammatory cytokines before angiogenesis. *Physiol. Genomics* **27**, 20–28 (2006).
 77. Danese, S., Dejana, E. & Fiocchi, C. Immune Regulation by Microvascular Endothelial Cells: Directing Innate and Adaptive Immunity, Coagulation, and Inflammation. *J. Immunol.* **178**, 6017–6022 (2007).
 78. Ribatti, D. & Crivellato, E. Immune cells and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 2822–2833 (2009).
 79. Presta, M. *et al.* Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 159–178 (2005).
 80. Mor, F., Quintana, F. J. & Cohen, I. R. Angiogenesis-Inflammation Cross-Talk: Vascular Endothelial Growth Factor Is Secreted by Activated T Cells and Induces Th1 Polarization. *J. Immunol.* **172**, 4618–4623 (2004).
 81. Blotnick, S., Peoples, G. E., Freeman, M. R., Eberlein, T. J. & Klagsbrun, M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: Differential production and release by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2890–2894 (1994).
 82. Moldovan, N. I., Goldschmidt-Clermont, P. J., Parker-Thornburg, J., Shapiro, S. D. & Kolattukudy, P. E. Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: The drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ. Res.* **87**, 378–384 (2000).
 83. Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R. & Sorg, C. Macrophages and angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* **55**, 410–422 (1994).
 84. Kuwabara, K. *et al.* Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth

- factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4606–4610 (1995).
85. Baird, A., Mormède, P. & Bohlen, P. Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 358–364 (1985).
 86. Ribatti, D. *et al.* Angiogenic activity of rat mast cells in the chick embryo chorioallantoic membrane is down-regulated by treatment with recombinant human alpha-2a interferon and partly mediated by fibroblast growth factor-2. *Haematologica* **87**, 465–71 (2002).
 87. Anderton, S. M. & Wraith, D. C. Selection and fine-tuning of the autoimmune T-cell repertoire. *Nature Reviews Immunology* **2**, 487–498 (2002).
 88. Bertrand-Duchesne, M. P., Grenier, D. & Gagnon, G. Epidermal growth factor released from platelet-rich plasma promotes endothelial cell proliferation in vitro. *J. Periodontal Res.* **45**, 87–93 (2010).
 89. Finetti, F. *et al.* Prostaglandin E2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *J. Biol. Chem.* **283**, 2139–2146 (2008).
 90. Cozzolino, F. *et al.* Interferon- α and interleukin 2 synergistically enhance basic fibroblast growth factor synthesis and induce release, promoting endothelial cell growth. *J. Clin. Invest.* **91**, 2504–2512 (1993).
 91. Perollet, C., Han, Z. C., Savona, C., Caen, J. P. & Bikfalvi, A. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* **91**, 3289–99 (1998).
 92. Garlanda, C. *et al.* Pentraxins in innate immunity and inflammation. *Novartis Found Symp* **279**, 80-91,216-219 (2006).
 93. Breviario, F. *et al.* Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* **267**, 22190–22197 (1992).
 94. Seery, L. T., Schoenberg, D. R., Barbaux, S., Sharp, P. M. & Whitehead, A. S. Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis*. *Proc Biol Sci* **253**, 263–270 (1993).
 95. Pepys, M. B. & Hirschfield, G. M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* **111**, 1805–1812 (2003).
 96. Inforzato, A. *et al.* The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. *J Biol Chem* **285**, 17681–17692 (2010).
 97. Lee, T. H., Lee, G. W., Ziff, E. B. & Vilcek, J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **10**, 1982–1988 (1990).
 98. Vouret-Craviari, V. *et al.* Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun* **65**, 1345–1350 (1997).
 99. Introna, M. *et al.* Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood* **87**, 1862–1872 (1996).
 100. Goodman, A. R., Levy, D. E., Reis, L. F. & Vilcek, J. Differential regulation of TSG-

- 14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* **67**, 387–395 (2000).
101. Abderrahim-Ferkoune, A. *et al.* Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells. *J Lipid Res* **44**, 994–1000 (2003).
 102. dos Santos, C. C. *et al.* DNA microarray analysis of gene expression in alveolar epithelial cells in response to TNFalpha, LPS, and cyclic stretch. *Physiol Genomics* **19**, 331–342 (2004).
 103. Han, B. *et al.* TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol* **175**, 8303–8311 (2005).
 104. Nauta, A. J. *et al.* Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int* **67**, 543–553 (2005).
 105. Garlanda, C., Bottazzi, B., Magrini, E., Inforzato, A. & Mantovani, A. PTX3, a humoral pattern recognition molecule, in innate immunity, tissue repair, and cancer. *Physiol. Rev.* **98**, 623–639 (2018).
 106. Inforzato, A. *et al.* Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry* **45**, 11540–11551 (2006).
 107. Rusnati, M. *et al.* Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* **104**, 92–99 (2004).
 108. Giacomini, A., Ghedini, G. C., Presta, M. & Ronca, R. Long pentraxin 3: A novel multifaceted player in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (2018). doi:10.1016/j.bbcan.2017.11.004
 109. Camozzi, M. *et al.* Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *J. Biol. Chem.* (2006). doi:10.1074/jbc.M601023200
 110. Leali, D. *et al.* Fibroblast growth factor 2-antagonist activity of a long-pentraxin 3-derived anti-angiogenic pentapeptide. *J Cell Mol Med* **14**, 2109–2121 (2010).
 111. Bayliss, M. T. *et al.* Up-regulation and differential expression of the hyaluronan-binding protein TSG-6 in cartilage and synovium in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 42–48 (2001).
 112. Garlanda, C. *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* **420**, 182–186 (2002).
 113. Bottazzi, B. *et al.* Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* **272**, 32817–32823 (1997).
 114. Nauta, A. J. *et al.* Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* **33**, 465–473 (2003).
 115. Braunschweig, A. & Józsi, M. Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein. *PLoS One* **6**, e23991 (2011).
 116. Doni, A. *et al.* Interactions of the humoral pattern recognition molecule PTX3 with the complement system. *Immunobiology* **217**, 1122–1128 (2012).
 117. Dias, A. A. *et al.* TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. *J Leukoc Biol* **69**, 928–936 (2001).

118. Souza, D. G. *et al.* The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. *Am J Pathol* **174**, 1309–1318 (2009).
119. Soares, A. C. *et al.* Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes Infect* **8**, 1321–1329 (2006).
120. Bottazzi, B. *et al.* The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. *J Hepatol* **64**, 1416–1427 (2016).
121. Salustri, A. *et al.* PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development* **131**, 1577–1586 (2004).
122. Scarchilli, L. *et al.* PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. *J Biol Chem* **282**, 30161–30170 (2007).
123. Redman, C. W. G., Sacks, G. P. & Sargent, I. L. Preeclampsia: An excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 499–506 (1999).
124. Zlibut, A., Bocsan, I. C. & Agoston-Coldea, L. *Pentraxin-3 and endothelial dysfunction. Advances in Clinical Chemistry* **91**, (Elsevier Inc., 2019).
125. Ristagno, G. *et al.* Pentraxin 3 in cardiovascular disease. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
126. Volpe, M. *et al.* Association and cosegregation of stroke with impaired endothelium-dependent vasorelaxation in stroke prone, spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* **98**, 256–261 (1996).
127. Carrizzo, A. *et al.* Pentraxin 3 induces vascular endothelial dysfunction through a P-selectin/matrix metalloproteinase-1 pathway. *Circulation* **131**, 1495–1505 (2015).
128. Cetin, I. *et al.* Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Obs. Gynecol* **194**, 1347–1353 (2006).
129. Cetin, I. *et al.* First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction. *Acta Obs. Gynecol Scand* **88**, 846–849 (2009).
130. Garg, P., Jaryal, A. K., Kachhawa, G., Deepak, K. K. & Kriplani, A. Estimation of asymmetric dimethylarginine (ADMA), placental growth factor (PLGF) and pentraxin 3 (PTX 3) in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* **14**, 245–251 (2018).
131. Hamad, R. R., Eriksson, M. J., Berg, E., Larsson, A. & Bremme, K. Impaired endothelial function and elevated levels of pentraxin 3 in early-onset preeclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **91**, 50–56 (2012).
132. Leali, D. *et al.* Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. *Mol Cancer Ther* **10**, 1600–1610 (2011).
133. Nunes, J. P. S. : Avaliação do efeito biológico da Pentraxina-3 sobre a proliferação celular, capacidade metastática, migração e perfil de expressão gênica em linhagens de células tumorais humanas. (UFMG, 2014).
134. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, 509–515 (2004).

135. Bogliolo, L. *Bogliolo Patologia*. (Guanabara Koogan S.A., 2011).
136. Burton, G. J., Redman, C. W., Roberts, J. M. & Moffett, A. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *The BMJ* **366**, (2019).
137. Cetin, I. *et al.* First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **88**, 846–849 (2009).
138. Akhter, T. *et al.* Serum Pentraxin 3 is associated with signs of arterial alteration in women with preeclampsia. *Int. J. Cardiol.* **241**, 417–422 (2017).
139. Cozzi, V. *et al.* PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. *Placenta* **33**, 1039–1044 (2012).
140. Ornitz, D. M. & Itoh, N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 215–266 (2015).
141. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 824–831 (1992).
142. Fujii, T. & Kuwano, H. Regulation of the expression balance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 by Shh and FGF-2. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **46**, 487–491 (2010).
143. Sharkey, A. M. *et al.* Maternal plasma levels of vascular endothelial growth factor in normotensive pregnancies and in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Eur. J. Clin. Invest.* **26**, 1182–1185 (1996).
144. Robillard, P. Y. *et al.* Preeclampsia and the 20th century: “Le siècle des Lumières”. *Pregnancy Hypertension* **13**, 107–109 (2018).
145. Duckitt, K. & Harrington, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. *British Medical Journal* **330**, 565–567 (2005).
146. Shao, Y. *et al.* Pre-pregnancy BMI, gestational weight gain and risk of preeclampsia: a birth cohort study in Lanzhou, China. doi:10.1186/s12884-017-1567-2
147. Alpoim, P. N. Pré-eclâmpsia precoce e tardia: avaliação de ADMA, GMPc e polimorfismos da sintase de óxido nítrico. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2013).
148. Mottelson, M. N., Lundsgaard, C. C. & Møller, S. Mechanisms in fluid retention – towards a mutual concept. *Clinical Physiology and Functional Imaging* (2019). doi:10.1111/cpf.12615
149. Cetin, I. *et al.* Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **194**, 1347–1353 (2006).
150. Rovere-Querini, P. *et al.* Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. *Obs. Gynecol* **108**, 148–155 (2006).
151. Lygnos, M. C. *et al.* Changes in maternal plasma levels of VEGF, bFGF, TGF- β 1, ET-1 and sKL during uncomplicated pregnancy, hypertensive pregnancy and gestational diabetes. *In Vivo (Brooklyn)*. **20**, 157–164 (2006).
152. Larsson, A., Palm, M., Helmersson, J. & Axelsson, O. Pentraxin 3 values during normal pregnancy. *Inflammation* **34**, 448–451 (2011).
153. Tahmasebi, H., Trajcevski, K., Higgins, V. & Adeli, K. Influence of ethnicity on

- population reference values for biochemical markers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **55**, 359–375 (2018).
154. Orr-Urtreger, A. *et al.* Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev. Biol.* **158**, 475–486 (1993).
 155. Yan, G., Fukabori, Y., McBride, G., Nikolaropolous, S. & McKeegan, W. L. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4513–4522 (1993).
 156. Yayon, A. *et al.* A confined variable region confers ligand specificity on fibroblast growth factor receptors: implications for the origin of the immunoglobulin fold. *EMBO J.* **11**, 1885–90 (1992).
 157. Wuechner, C., Nordqvist, A. C., Winterpacht, A., Zabel, B. & Schalling, M. Developmental expression of splicing variants of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in mouse. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 1185–8 (1996).
 158. Miki, T. *et al.* Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: Two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 246–250 (1992).
 159. De Moerlooze, L. *et al.* An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* **127**, 483–492 (2000).
 160. Luo, J., Qiao, F. & Yin, X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *J. Reprod. Dev.* **57**, 84–91 (2011).
 161. Peoples, G. E. *et al.* T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: A potential pathologic role. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6547–6551 (1995).
 162. Shao, X. *et al.* FGF2 cooperates with IL-17 to promote autoimmune inflammation. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 163. Barnie, P. A., Lin, X., Liu, Y., Xu, H. & Su, Z. IL-17 producing innate lymphoid cells 3 (ILC3) but not Th17 cells might be the potential danger factor for preeclampsia and other pregnancy associated diseases. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 11100–11107 (2015).
 164. Lee, H. T., Lee, J. G., Na, M. & Kay, E. D. P. FGF-2 induced by interleukin-1 β through the action of phosphatidylinositol 3-kinase mediates endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 32325–32332 (2004).
 165. Daneva, A. M., Hadži-Lega, M. & Stefanovic, M. Correlation of the system of cytokines in moderate and severe preeclampsia. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **43**, 220–4 (2016).
 166. Zhang, J. *et al.* Glucocorticoids regulate pentraxin-3 expression in human airway smooth muscle cells. *PLoS One* **14**, (2019).
 167. Doni, A. *et al.* Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and nonhematopoietic cells. *J Biol Chem* **283**, 29983–29992 (2008).
 168. Gerber, A. N. Glucocorticoids and the lung. *Adv. Exp. Med. Biol.* **872**, 279–298 (2015).

169. Milkiewicz, M., Kelland, C., Colgan, S. & Haas, T. L. Nitric oxide and p38 MAP kinase mediate shear stress-dependent inhibition of MMP-2 production in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **208**, 229–237 (2006).
170. Chen, H. H. & Wang, D. L. Nitric oxide inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via the induction of activating transcription factor 3 in endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* **65**, 1130–1140 (2004).
171. Sinha, I. *et al.* The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants. *Ann. Vasc. Surg.* **20**, 92–98 (2006).
172. Ridnour, L. A. *et al.* Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16898–16903 (2007).
173. Souza, D. G. *et al.* The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. *Am. J. Pathol.* **174**, 1309–1318 (2009).
174. Teran, E. *et al.* Elevated C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines in Andean women with pre-eclampsia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **75**, 243–249 (2001).
175. Kupferminc, M. J., Peaceman, A. M., Wigton, T. R., Rehnberg, K. A. & Socol, M. L. Tumor necrosis factor-alpha is elevated in plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **170**, 1752–7; discussion 1757–9 (1994).
176. Perucci, L. O. *et al.* Annexin A1 Is increased in the plasma of preeclamptic women. *PLoS One* **10**, (2015).
177. Perucci, L. O. *et al.* Lipoxin A4 is increased in the plasma of preeclamptic women. *Am. J. Hypertens.* **29**, 1179–1185 (2016).
178. Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Teixeira, M. M. & Sousa, L. P. Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *Journal of Immunology Research* **2016**, (2016).
179. Inforzato, A. *et al.* The ‘sweet’ side of a long pentraxin: how glycosylation affects PTX3 functions in innate immunity and inflammation. *Front Immunol* **3**, 407 (2012).
180. Hamad, R. R., Eriksson, M. J., Berg, E., Larsson, A. & Bremme, K. Impaired endothelial function and elevated levels of pentraxin 3 in early-onset preeclampsia. *Acta Obs. Gynecol Scand* **91**, 50–56 (2012).
181. Cozzi, V. *et al.* PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of preeclampsia and IUGR. *Placenta* **33**, 1039–1044 (2012).
182. Reis, Z. S. N. *et al.* Pré-eclâmpsia precoce e tardia: Uma classificação mais adequada para o prognóstico materno e perinatal? *Rev. Bras. Ginecol. e Obstet.* **32**, 584–590 (2010).
183. Mol, B. W. J. *et al.* Pre-eclampsia. in *The Lancet* **387**, 999–1011 (Lancet Publishing Group, 2016).
184. Inforzato, A., Bottazzi, B., Garlanda, C., Valentino, S. & Mantovani, A. Pentraxins in humoral innate immunity. *Adv Exp Med Biol* **946**, 1–20 (2012).