

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

PERFIL DE MARCADORES DE
ANGIOGÊNESE NAS GESTANTES COM
PRÉ-ECLÂMPsia E A CORRELAÇÃO
COM A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA

Patrícia Gonçalves Teixeira
Belo Horizonte-MG 2006

PATRÍCIA GONÇALVES TEIXEIRA

**PERFIL DE MARCADORES DE
ANGIOGÊNESE NAS GESTANTES COM
PRÉ-ECLÂMPسيا E A CORRELAÇÃO
COM A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Perinatologia

Orientador: Prof. Cezar Alencar de Lima Rezende

Co-orientadora: Prof. Dra. Sílvia Passos de Andrade

Universidade Federal de Minas gerais Faculdade de Medicina Belo Horizonte 2006

A viabilização desta pesquisa contou com o apoio financeiro da FAPEMIG, com base no Projeto 9.671.

O Laboratório de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas cedeu material de coleta, processamento, armazenamento e apoio técnico-científico.

No Laboratório de Angiogênese do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG foram realizadas as dosagens dos fatores de angiogênese.

Aos meus filhos, Ana Maura e Eduardo, meus amores. Ao James, meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram na realização deste trabalho e, em especial:

Aos orientadores, Prof. Cezar Alencar de Lima Rezende e Prof^a Sílvia Passos Andrade, com quem muito aprendi, pelas valiosas orientações e pela atenção.

Ao Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral, pelo espírito inovador e brilhante de pesquisador que contagia a todos, pela idealização do projeto e ensinamento prático, dando o formato necessário a idéias disformes, e pelo acolhimento.

À Dra. Zilma Silveira Nogueira Reis, grande professora e guia que não poupou esforços na orientação deste trabalho, associando conhecimento científico e prático, amizade, descontração, espontaneidade e alegria.

À Dra. Jaqueline Braga Pereira, pelo apoio técnico e incondicional no momento preciso no Laboratório de Angiogênese.

Aos acadêmicos Marina, Mônica, Livia, Breno e Henrique, pelo trabalho, amizade e descontração.

Ao Prof. Henrique Vitor Leite e médicos da Maternidade do Hospital das Clínicas da UFMG, que abriram espaço para a realização deste trabalho.
À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À Maria de Lourdes de Almeida Barros, por moldar meus sentimentos.

Ao James, meu porto seguro, pela forma carinhosa e pelo apoio nos momentos de dificuldades e por assumir em meu lugar funções e deveres enquanto me dediquei à pesquisa, minhas desculpas e eterna gratidão.

A Ana Maura e Eduardo, minhas crianças, pelo apoio no computador e compreensão pela minha ausência, em todo seu significado.

A todas as pacientes, meu especial agradecimento, por colaborarem como sujeitos da pesquisa.

Esta dissertação faz parte de um trabalho em equipe e sozinha seria impossível realizá-la, agradeço a todos.

“O que sabemos é uma gota. O que ignoramos é um oceano”. Isaac Newton

RESUMO

Objetivo: os achados fisiopatológicos presentes na pré-eclâmpsia (hipertensão e proteinúria) parecem estar associados a respostas e/ou produção inadequadas de fatores angiogênicos. Este estudo foi desenvolvido para avaliar os níveis plasmáticos dos fatores angiogênicos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento placentário (PIGF) em gestantes com e sem pré-eclâmpsia e correlacionar possíveis alterações nas concentrações sanguíneas destes marcadores com o quadro hipertensivo destas gestantes. **Desenho do Estudo:** foram avaliadas 23 gestantes com pré-eclâmpsia (NHBPEPWG 2000) e comparadas com nove gestantes normotensas da Maternidade do Hospital das Clínicas de Belo Horizonte/MG. A pressão arterial média (PAM= $2/3$ pressão diastólica + $1/3$ pressão sistólica) foi calculada e seguiu-se a coleta de amostras sanguíneas para determinação do VEGF e PIGF (método de ELISA pg/ml). A idade gestacional do grupo variou entre 33 e 35 semanas de gestação. **Resultados:** a concentração sanguínea de VEGF ($243,3 \pm 193$) em gestantes com pré-eclâmpsia não foi estatisticamente diferente da concentração em gestantes

normotensas ($160,6 \pm 143$). No entanto, a concentração plasmática de PIGF ($40,8 \pm 37,5$) foi mais baixa em gestantes com pré-eclâmpsia comparada às normotensas (480 ± 347). Correlação inversa foi observada entre os níveis de PIGF e PAM. Para cada diminuição de 1pg/ml na concentração de PIGF, houve aumento de 6,58 mmHg na PAM ($p= 0,002$). **Conclusão:** estes resultados mostraram que o PIGF pode exercer papel determinante na pressão arterial media em gestantes com pré-eclâmpsia.

Palavras- chave: Angiogênese. Pré-eclâmpsia. VEGF. PIGF.

ABSTRACT

Objective: the pathophysiological clinical findings of preeclampsia (hypertension and proteinuria) seem to be associated with inadequate responses to and/or production of angiogenic factors. This study was performed to evaluate plasmatic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PIGF) in pregnant women with or without preeclampsia and whether any alteration in systemic levels of these angiogenic markers would be associated with increased mean arterial pressure. **Study Design:** twenty-three preeclamptic and nine normotensive pregnant women from the Maternity of Hospital das Clínicas in Belo Horizonte were assessed by NHBPEPWG 2000 criteria and blood samples were collected at the time of diagnosis (33-35 weeks). The plasmatic levels of VEGF and PIGF were determined by ELISA assay and mean arterial pressure was calculated

(MAP= $\frac{2}{3}$ diastolic arterial pressure + $\frac{1}{3}$ systolic). Correlation between MAP values and angiogenic markers concentration was determined through regression analysis. **Results:** VEGF concentration (243.3 ± 193 pg/ml) in preeclamptic woman were not statistically different from the levels (160.6 ± 143 pg/ml) of non preeclamptic pregnant. However, plasma concentration of PIGF was lower in preeclamptic *versus* normotensive pregnancies (40.8 ± 37.5 *versus* 480 ± 374 pg/ml). Inverse correlation was observed between PIGF plasma levels and mean arterial pressure. A decrease in 1pg/ml of PIGF resulted in 6.58 mm Hg increase in MAP ($p=0.002$). **Conclusion:** these results support a determinant role of PIGF in mean arterial pressure in pregnant women.

Words-key: Angiogenesis, preeclampsia, VEGF, PIGF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang Angiopoetinas CIUR Crescimento intra-uterino restrito Dp Desvio-padrão
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético ELISA *Enzyme-linked immunoabsorbent assay*
FAPEMIG Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais FDA *Food and Drug Administration* FGF Fator de crescimento do fibroblasto GMP
Monofosfato de guanosina HCG Hormônio gonodotrófico coriônico HELLP
Hemolyses liver dysfunction and low platelet IC Intervalo de confiança ICB Instituto de Ciências Biológicas mRNA Ácido ribonucléico mensageiro NHBPEPWG
National High Blood Pressure Education Program Working Group NRP Co-receptor celular neurofilin PAM Pressão arterial média PD Pressão diastólica
PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas PgE Prostaglandinas PIGF Fator de crescimento placentário pO₂ Pressão de oxigênio PS Pressão sistólica

rpm Rotações por minuto
T_ié Tirosina-quinase
TNF α Fator de necrose tumoral
UFMG Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF Fator de crescimento vascular
endotelial
VPF Fator de permeabilidade vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Cronograma esquemático hipotético da fisiopatologia da pré-eclâmpsia	28
FIGURA 2 – Angiogênese e parede vascular	41
FIGURA 3 - Interação do VEGF com receptores celulares	46
FIGURA 4 - A angiogênese placentária e o desenvolvimento dos vilos placentários em diferentes concentrações de oxigênio	57
FIGURA 5 - Representação de forma esquemática das etapas do ensaio enzimático da reação de ELISA	69

Gráficos

GRÁFICO 1 - Representação individual do VEGF (pg/ml) nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia e nas normotensas	78
GRÁFICO 2 - Regressão do VEGF em relação à pressão arterial média	
GRÁFICO 3 – Representação da distribuição das concentrações	
GRÁFICO 4 - Representação por caixas do PIGF (pg/ml) nas gestantes	

GRÁFICO 5 - Regressão do PIGF em relação à pressão arterial média

GRÁFICO 6 - Representação do nível médio da hemoglobina em g/dl

GRÁFICO 7 - Distribuição da concentração plasmática individual do

GRÁFICO 8 - Distribuição da concentração plasmática individual do

VEGF das gestantes do estudo quanto à presença ou não de

(PAM) no grupo de estudo	80
médias do PIGF (pg/ml) nos grupos estudados	81
que apresentaram pré-eclâmpsia e nas normotensas	82
(PAM) no grupo de estudo	84
nos grupos estudados	107
PIGF quanto à presença ou não de infecção no pré-natal	109
infecção no pré-natal	110

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadros

QUADRO 1 - Fatores de risco de pré-eclâmpsia	30
QUADRO 2 - Classificação da pré-eclâmpsia	32
QUADRO 3 - Complicações maternas e fetais na pré-eclâmpsia grave ...	34
QUADRO 4 - Classificação dos estados hipertensivos na gravidez	36
Tabelas	
TABELA 1 - Inibidores séricos endógenos e da matrix extracelular	47
TABELA 2 - Distribuição das gestantes por idade materna nos grupos estudados	62
TABELA 3 - Características das gestantes do grupo de pré-eclâmpsia em relação ao controle, segundo a idade e paridade materna e idade gestacional	63
TABELA 4 - Distribuição das gestantes do grupo estudado, segundo o número de gestações	64
TABELA 5 - Distribuição das pacientes com pré-eclâmpsia segundo presença de fator de risco anterior	74

TABELA 6 - Distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo a forma clínica, de acordo com os critérios de gravidade	76
TABELA 7 - Distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo a proteinúria	76
TABELA 8 - Distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo o grau da proteinúria qualitativa	77
TABELA 9 - Características da concentração plasmática do VEGF nos grupos estudados	79
TABELA 10 - Características da concentração plasmática do PIGF nos grupos estudados	83
TABELA 11 - Características do nível de hemoglobina nos grupos estudados	107
TABELA 12 - Fatores de angiogênese e infecção durante a gravidez	109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Pré-eclâmpsia e marcadores de angiogênese - Fisiopatologia	

..... 18

2.2 Base do diagnóstico 28

2.3 Classificação da pré-eclâmpsia 35

2.4 Formação vascular – vasculogênese 38

2.5 Angiogênese 40

2.6 Reguladores da angiogênese 41

2.6.1 Estimuladores da angiogênese 41

2.6.2 Inibidores da angiogênese 46

2.6.3 Angiogênese fisiológica e patológica	48
2.7 Vasculogênese e angiogênese no desenvolvimento placentário e pré-eclâmpsia	51
3 OBJETIVOS	59
4 PACIENTES E MÉTODOS	60
4.1 Pacientes	60
4.1.1 Critérios de inclusão	60

4.1.2 Critérios de exclusão 61

4.1.3 Características do grupo de estudo 62

4.2 Métodos..... 65

4.2.1 Medida da pressão arterial..... 65

4.2.2 Mensuração da proteinúria..... 66

4.2.3 Coleta do sangue materno.....

..... 66

4.2.4 Técnica de dosagem dos fatores de angiogênese - ensaio de ELISA .. 67

4.3 Análise estatística
..... 72

5 RESULTADOS
..... 74

5.1 Presença de fatores de risco de pré-eclâmpsia
..... 74

5.2 Classificação das gestantes com pré-eclâmpsia, conforme gravidade do quadro clínico
..... 75

5.3 Avaliação da proteinúria nas gestantes com diagnóstico de pré-

eclâmpsia 76

5.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
..... 77

5.5 Fator de crescimento placentário (PIGF)
..... 80

6 DISCUSSÃO 85

7 CONCLUSÕES 95

REFERÊNCIAS 96

APÊNDICES E ANEXO 105

1 INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia é um distúrbio multissistêmico de elevada mortalidade e morbidade materno fetal, que acomete o período gravídico puerperal com prevalência de 6 a 8% (ACOG, 2002). Apesar de descrita desde a Idade Antiga, permanece até os dias atuais sem etiologia bem definida (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005).

Nos países desenvolvidos, a pré-eclâmpsia é o maior problema obstétrico, com desafio aos cuidados clínicos. Portanto, torna-se necessária a elucidação de sua etiologia e melhor esclarecimento fisiopatológico (ABDALA; HARRINGTON, 2005). No Brasil, as doenças hipertensivas são responsáveis pela maioria das mortes maternas (BRASIL, 2000) e grande parte das mortes neonatais é determinada pela condição da gestante, principalmente a pré-eclâmpsia, além das circunstâncias do parto e do nascimento (ALMEIDA *et al.*, 2003).

Embora as manifestações clínicas da doença se apresentem no final da gravidez, acredita-se que a fisiopatologia esteja ligada ao processo de placentação (DEKKER; SIBAI, 1998; DUCKITT; HARRINGTON, 2005). Nesta, a invasão trofoblástica nas arteríolas espiraladas leva baixa resistência ao fluxo sanguíneo para atender a demanda metabólica dos tecidos em desenvolvimento. Na pré-eclâmpsia, o processo de invasão do trofoblasto é incompleto na porção miometrial das arteríolas espiraladas (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003; PIJNENBORG *et al.*, 1983) causando hipóxia tecidual, com liberação de fatores de angiogênese na circulação materna, que parecem causar disfunção endotelial

sistêmica (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 2004; ZYGMUND *et al.*, 2003).

Vários estudos têm mostrado que gestantes com pré-eclâmpsia apresentam elevados níveis séricos da forma solúvel do receptor livre do VEGF (sFlt-1) e baixos níveis de PlGF (KOGA *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 2003; TSATSARIS *et al.*, 2003) . Os receptores livres formam complexos inativos com o VEGF e PlGF, limitando o efeito protetor endotelial dessas moléculas (STAFF; BRAEKKER; HARSEM; 2005).

Apesar das evidências clínicas e experimentais da participação de fatores angiogênicos na disfunção endotelial da pré-eclâmpsia, os dados são ainda limitados e as concentrações do VEGF mostram resultados conflitantes (BAKER *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 2000; LYALL; GREER; FLEMING, 1997). Portanto, estudos adicionais realizados em grupos populacionais diversos que venham corroborar e refutar dados da literatura poderão consolidar e universalizar o perfil desses marcadores de angiogênese na pré-eclâmpsia.

Considerando a pré-eclâmpsia uma intercorrência clínica freqüente - aproximadamente 20% em maternidades de alto risco no Brasil - e que há fortes evidências do envolvimento dos fatores de angiogênese na patogenia dessa síndrome, principalmente hipertensão e proteinúria, e das relações contundentes entre os níveis séricos do VEGF, este estudo visa a ampliar outros descritos na

literatura científica (BAKER *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 2000; LEVINE *et al.*, 2004; POLLIOTTI *et al.*, 2003; SHARON *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2003).

Essa linha de pesquisa sobre os marcadores de angiogênese na gravidez é pioneira no centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG, sendo a pré-eclâmpsia o primeiro estudo, pela peculiaridade dessa síndrome endotelial. A análise do perfil de marcadores de angiogênese, VEGF e PlGF, nas gestantes com pré-eclâmpsia que freqüentam a maternidade do Hospital das Clínicas ainda não havia sido objetivo de investigações anteriores.

Esclarecer o comportamento dos fatores angiogênicos na gravidez e nos processos patogênicos que acometem esse período e suas relações com o endotélio materno (BROSKELEBY *et al.*, 2000) pode ser a chave da terapêutica obstétrica futura. Além disso, ativadores de angiogênese vêm sendo empregados em outras doenças, como na isquemia do miocárdio e o uso de inibidores em oncologia (CARMIELET, 2003; DVORAK, 2002; FOLKMAN, 2006).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pré-eclâmpsia e marcadores de angiogênese- Fisiopatologia

A pré-eclâmpsia é um distúrbio multisistêmico específico do período gestacional humano, de etiologia desconhecida, que expõe o binômio mãe/feto a riscos, pela

elevada morbimortalidade (ACOG, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003).

O foco patogênico da pré-eclâmpsia decorre de uma resposta materna anômala à presença de placenta e tecido trofoblástico (CHESLEY, 1984). Durante a placentação, a falha do citotrofoblasto em remodelar as arteríolas espiraladas em sua porção miometrial (KAUFMANN; BLACK; HUPPERTZ, 2003) pode levar à diminuição na perfusão local e hipóxia tecidual (RAJAKUMAR *et al.*, 2004) e conseqüente alteração na resposta angiogênica (LI *et al.*, 2005; MATSUBARA *et al.*, 2005), modulada provavelmente por predisposição genética (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005).

As alterações morfológicas e funcionais das gestantes portadoras de pré-eclâmpsia têm como base fundamental o espasmo arteriolar, decorrente do aumento da resistência vascular (DEKKER; SIBAI, 1998; 2001). Estudos de necropsia mostraram que as lesões teciduais são decorrentes principalmente de hipoperfusão do que propriamente do grau de hipertensão arterial (CHESLEY, 1984). No entanto, as alterações endoteliais presentes nessas gestantes são anteriores à manifestação clínica da doença (FERRIS, 1991; HAYMAN *et al.*, 1999; ROBERTS; LAIN, 2002).

A mais consistente delas é a anormalidade morfológica renal, denominada endoteliose glomerular, na qual o endotélio glomerular mostra-se edemaciado, com luz reduzida, expansão da matriz mesangial e depósitos subendoteliais de

aspecto amorfo ou granular (PIRES DO RIO, 2000). Esse achado é patognomônico da pré-eclâmpsia e está presente em 70% dos casos, com remissão completa após o parto, concomitante ao término do quadro clínico materno (ROBERTS *et al.*, 1989).

A hipótese de que a patogenia da pré-eclâmpsia estaria relacionada à doença endotelial foi especulada por Weiss e Dexter em 1941, baseados na presença de edema de mãos e face. O edema, secundário à perda protéica do espaço intravascular para o interstício, nas mulheres com pré-eclâmpsia evidencia a perda da integridade do endotélio. A perda protéica glomerular é outro exemplo consistente de perda da barreira do endotélio normal do sistema vascular de transporte (FERRIS, 1991; ROBERTS *et al.*, 1989).

Além disso, encontram-se na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia algumas lesões vasculares caracterizadas pela oclusão por fibrina, processo denominado aterosose (DEKKER; SIBAI, 1998).

O endotélio lesado estimula a cascata de coagulação (ROBERTS *et al.*, 1989) e, embora na pré-eclâmpsia grave a coagulação intravascular disseminada seja demonstrada rotineiramente em apenas em 20% dos testes laboratoriais, marcadores mais sensíveis de anormalidade da coagulação estão alterados na maioria dessas gestantes. Achados bioquímicos seriados evidenciam consumo de plaquetas, ativação do fator VIII, circulação de β -tromboglobulina e redução dos

níveis de antitrombina III (ROBERTS, 1999).

O aumento do tromboxano (potente vasoconstrictor e agregante plaquetário) em detrimento da prostaciclina (agente vasodilatador) encontrado nas gestantes com pré-eclâmpsia tem sido atribuído à “insuficiência” da placenta. No entanto, modelos de lesão endotelial isolados têm demonstrado o mesmo perfil dessas substâncias, encontrado na pré-eclâmpsia, sugerindo, portanto, uma ação parácrina como possível mecanismo de ação (ROBERTS, 1999).

No século passado, Mauriceau relacionou a pré-eclâmpsia a um estado toxêmico materno atribuído à produção excessiva de fluido sanguíneo aquecido vindo do útero, que estimulava o sistema nervoso, e de toxinas advindas do organismo fetal em decomposição (CHESLEY, 1984).

Diversas pesquisas foram realizadas na pré-eclâmpsia e muitas substâncias foram dosadas no sangue materno como marcadoras de lesão endotelial e da reatividade vascular (HAYMAN *et al.*, 1999).

Alguns testes clínicos foram propostos para diferenciar o grupo de gestantes propensas a desenvolver pré-eclâmpsia, baseados na reatividade vascular presente nesse grupo. Na gravidez de evolução normal, há discreta queda na pressão arterial, diminuição da resistência periférica e aumento de 40% no débito cardíaco. A vasodilatação que se verifica decorre habitualmente do

desenvolvimento de resistência à angiotensina II, conseqüente do aumento da síntese de prostaglandina (DAVID *et al.*, 2000).

Menores doses de angiotensina II exógena elevam a pressão diastólica em 20mmHG nas gestantes propensas a desenvolver pré-eclâmpsia, comparadas às que permaneceram normotensas (DEKKER; SIBAI, 1991). A aplicação clínica do teste da angiotensina requer tempo e limita seu uso como *screening* (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005).

Os testes do exercício isométrico e *roll-over-test* foram propostos como *screening* para avaliar a presença de reatividade vascular. O primeiro baseia-se no aumento da resistência vascular periférica e pressão diastólica ao exercício isométrico e o segundo na queda da pressão arterial após mudança de decúbito. Os resultados desses testes variam entre os autores e há baixa reprodutibilidade no mesmo paciente (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005).

Também de importância foram os estudos em técnicas anestésicas que mostraram ser o fator hipertensivo na pré-eclâmpsia de natureza humoral e não nervosa (ROBERTS *et al.*, 1989).

Nos últimos anos, grande variedade de fatores circulantes (quimiocinas e citocinas) secretados pela placenta e que causam disfunção endotelial tem sido mensurada no sangue periférico, líquido amniótico (TRANQUILLI *et al.*, 2004;

VUORELA *et al.*, 2000), sangue de cordão umbilical e em tecido placentário (HELKSKE *et al.*, 2001; LASH *et al.*, 1999, SHORE *et al.*, 1997; ZHOU *et al.*, 2002) como preditores e marcadores da pré-eclâmpsia (EVANS *et al.*, 1998; LEVINE *et al.*, 2004; STAMILIO *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2003; WELCH, 2006; WOLF *et al.*, 2005).

Esses estudos tendem a focar moléculas cuja ação no endotélio e musculatura lisa reproduz os achados patogênicos encontrados na pré-eclâmpsia (SHARON *et al.*, 2003).

As famílias do VEGF e seus receptores foi estudada em células de citotrofoblasto de biópsia placentária a partir da detecção da reação antígeno/anticorpo nos grupos de gestantes normotensas e comparada na pré-eclâmpsia grave e HELLP síndrome. O VEGF-A e o receptor VEGFR-1/Flt-1 são expressos no tecido placentário durante toda a gestação normal (MAYHEW *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2002).

Nas pacientes normotensas no final da gestação, forte reação pode ser detectada no citotrofoblasto, que invade o interstício e o compartimento vascular, na parede uterina. Em contraposição, fraca reação ao antiVEGF-A e freqüente ausência de reação estão presentes no citotrofoblasto de gestantes com pré-eclâmpsia (ZHOU *et al.*, 2002).

Comparando tecido placentário de gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas, quanto à expressão de VEGFR-1, este se mostra diminuído na pré-eclâmpsia (MAYHEW *et al.*, 2004).

Finalmente, a expressão do receptor livre (sFlt-1) mensurado pela técnica antígeno/anticorpo e comparada entre os grupos mostra estar presente, nas placentas das gestantes com pré-eclâmpsia, o dobro da reação durante o primeiro, segundo e terceiro trimestres, na comparação com as normotensas (ZHOU *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* comparando os efeitos do soro e do plasma de mulheres com e sem pré-eclâmpsia no comportamento metabólico de células endoteliais em cultura demonstraram haver mais atividade mitogênica celular na presença de soro de pacientes com pré-eclâmpsia (BROCKELSBY *et al.*, 2000).

Além disso, níveis elevados de fatores de crescimento derivados de plaquetas e VEGF foram expressos no soro de pacientes com pré-eclâmpsia. Esse fato não ocorreu em culturas tratadas com soro de gestantes sem a doença ou mesmo em puérperas que tiveram pré-eclâmpsia (SVEDAS *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 1991).

Embora modelos de angiogênese *in vitro* muito tenham contribuído com informações sobre crescimento celular, migração, produção protéica e suas interações com receptores, na verdade não reproduzem modelo fidedigno da

angiogênese placentária. Esse processo é dinâmico, como descrito anteriormente, no qual a expressão de receptores e de suas interações varia no decorrer da gravidez (HAYMAN *et al.*, 1999).

Com o objetivo de determinar se o fator de crescimento endotelial (VEGF) estaria envolvido na patogenia da pré-eclâmpsia, muitos estudos longitudinais e transversais, por imunofluorescência e radioimunoensaio, avaliaram a concentração sérica durante a gravidez na síndrome clínica e no pós-parto (ANTHONY *et al.*, 1997; BAKER *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 2000; LIVINGSTON *et al.*, 2000; LYALL; GREER; FLEMING, 1997; SHARON *et al.*, 2003).

Nos primeiros ensaios, verificaram-se aumento nos níveis séricos do VEGF e diminuição do PIGF somente nas pacientes com a doença clínica instalada, com níveis baixos ou indetectáveis nas fases iniciais da gravidez e no pós-parto. Na 30^a semana de gravidez já havia elevação do VEGF nas gestantes que mais tarde desenvolveram pré-eclâmpsia. Concluiu-se, então, que o VEGF poderia estar envolvido na patogenia da doença e também ser agente preditor (BAKER *et al.*, 1995; HUNTER *et al.*, 2000),

Alguns trabalhos mostraram resultados conflitantes, com redução do VEGF e PIGF em gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas (LIVINGSTON *et al.*, 2000; LYALL; GREER; FLEMING, 1997).

Tal discordância é devida a erros metodológicos, técnicas diferentes de dosagem

em relação ao estado físico das citocinas (livres ou ligadas a proteínas) e dosagem de diferentes isoformas do VEGF (ANTHONY *et al.*, 1997).

Recentemente, tem sido dada grande importância ao receptor livre do VEGF (sFlt-1) e sua interação com o VEGF e PlGF no sangue periférico e no tecido placentário. Esse fator livre somente é encontrado nas mulheres durante o período de gravidez, estando ausente em outras épocas e no sexo masculino (BANKS *et al.*, 1998; CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2003; KOGA *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 2004; POWERS *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 2003; STAFF; BRAEKKE; HARSEM, 2005; TSATSARIS *et al.*, 2003).

A presença do receptor livre sFlt-1 afeta as ligações moleculares entre o VEGF e PlGF com receptores de membrana celular, com ação, portanto, antagonista (CLARK *et al.*, 1998; HUNTER *et al.*, 2000).

É plausível que o aumento do receptor livre nas placentas de mulheres com pré-eclâmpsia possa exercer papel importante na angiogênese placentária por antagonismo ao VEGF/PlGF, conseqüente a uma redução na perfusão local e hipóxia tecidual (HELSKE *et al.* 2001; LI *et al.*, 2005).

A elevação no sangue do receptor livre (sFlt-1) pode também perturbar a vascularização periférica materna, levando à disfunção endotelial (SHARON *et al.*, 2003).

A concentração de sFlt-1 no sangue de mulheres com pré-eclâmpsia é seis vezes maior que nas gestantes normotensas (KOGA *et al.*, 2003) e esse aumento antecede em seis semanas a manifestação clínica da doença (LEVINE *et al.*, 2004) e com diminuição lenta no pós-parto (POWERS *et al.*, 2004).

Além do mais, a concentração sérica de sFlt-1 em gestantes normais tem correlação com a idade gestacional, o que não foi encontrado na pré-eclâmpsia (KOGA *et al.*, 2003).

Outros estudos também demonstraram o aumento do receptor livre (sFlt-1) nas placentas de gestantes com pré-eclâmpsia e também aumento sérico. Esse aumento está associado à diminuição do VEGF e PlGF livres, sugerindo ação antagonista do receptor livre pela neutralização da ação dos estimuladores da angiogênese (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2003; TSATSARIS *et al.*, 2003).

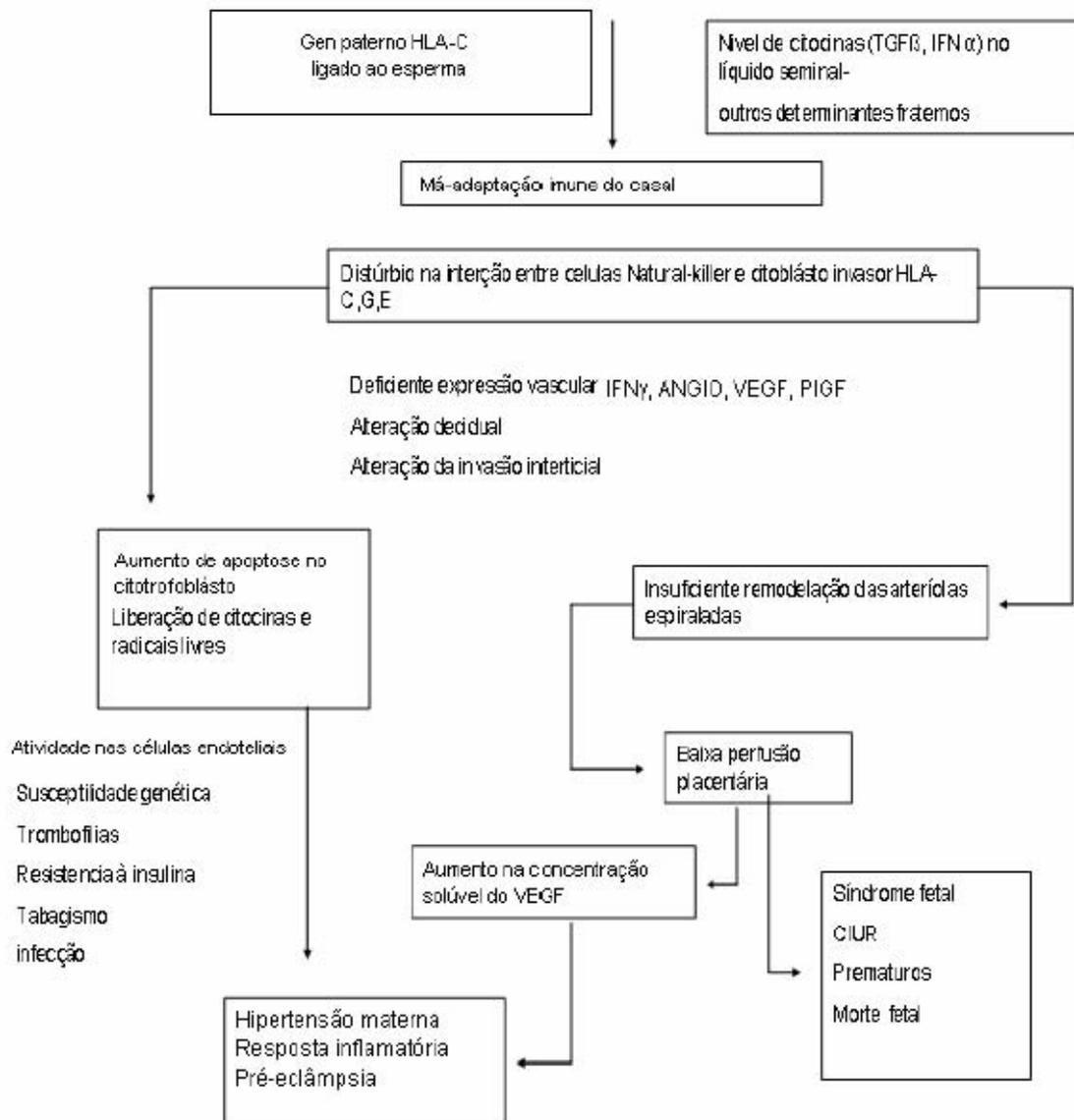
Estudos experimentais de microvasos, na presença de soro resultante de gestantes com pré-eclâmpsia, reproduziu disfunção endotelial (SVEDAS *et al.*, 2003), que foi revertida pelo acréscimo exógeno de VEGF e PlGF (SHARON *et al.*, em 2003).

Adicionalmente, VEGF e PlGF causaram relaxamento microvascular arteriolar renal em ratos, *in vitro*, sendo tal ação bloqueada pela adição de sFlt-1. Finalmente, a administração de sFlt-1 isolado em ratas prenhes e não prenhes, e

mesmo nos machos, resultou em hipertensão sistêmica, proteinúria e endoteliose glomerular, achado patognomônico da pré-eclâmpsia. Notou-se, então, que o aumento do sFlt-1 sozinho foi suficiente para reproduzir uma disfunção endotelial, semelhante à encontrada na pré-eclâmpsia (SHARON *et al.*, em 2003).

Portanto, é provável que a patogenia da pré-eclâmpsia seja decorrente da ausência de uma segunda onda de migração trofoblástica, provavelmente modulada geneticamente, levando a: placentação inadequada e hipóxia tecidual (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005).

Tem sido proposto que essa perfusão placentária reduzida leva à alteração no perfil dos fatores angiogênicos e que sua concentração na sanguínea materna resulta em injúria ao endotélio sistêmico (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2003). Conseqüentemente a essa cascata de injúria endotelial, ocorre perda da integridade do vaso - como barreira e extravasamento de fluidos extracelular, perfusão reduzida nos tecidos, ativação da cascata de coagulação e liberação de agentes vasopressores (FERRIS, 1991) - responsável pela vasoconstrição generalizada encontrada nas gestantes com pré-eclâmpsia (BANKS *et al.*, 1998; BREIER, 2000; BROCKELSBY *et al.*, 2000; HAYMAN *et al.*, 1999; LEVINE *et al.*, 2004).



Fonte: Sibai, Dekkere Kuplermenc (2005).

FIGURA 1 -Cronograma esquemático hipotético da fisiopatologia da pré-eclâmpsia.

2.2 Bases do diagnóstico

A pré-eclâmpsia é determinada primariamente pela elevação da pressão arterial e presença de proteinúria após 20 semanas de gestação ou mais cedo, na presença de doença trofoblástica ou hidropisia fetal, desaparecendo após o parto (DEKKER; SIBAI, 1998). Eclâmpsia é a manifestação convulsiva tônico-clônica da doença, do tipo “grande mal”, seguida de variável estágio de letargia ou coma, conseqüente à evolução desfavorável da pré-eclâmpsia (CHESLEY, 1984).

Na prática clínica, a pré-eclâmpsia parece ser mais de uma doença por diferir em vários aspectos: época do aparecimento na gestação, presença de fatores de risco associados (QUADRO 1), envolvimento de diversos sistemas orgânicos maternos e acometimento fetal (VATTEN; SKJAERVEN, 2004).

A pré-eclâmpsia pode manifestar-se como síndrome materna e/ou fetal, cuja gravidade do comprometimento desse binômio pode ser variável (QUADRO 2). Numa gestação próxima do termo, poderá não haver acometimento fetal, a despeito do quadro clínico materno; em fase mais inicial, antes de 34 semanas, a prematuridade e baixo peso, restrição de crescimento, redução do líquido amniótico e sofrimento fetal agudo são eventos esperados (DEKKER; SIBAI, 1991; VATTEN; SKJAERVEN, 2004).

Hipertensão e proteinúria podem estar ausentes em 10-15% de gestantes com quadro de hemólise, disfunção hepática e trombocitopenia *hemolyses liver dysfunction and low platelet* (HELLP síndrome) e em 38% das que desenvolvem

eclâmpsia (HARLOW; BROWN, 2001).

QUADRO 1 Fatores de risco de pré-eclâmpsia

Risco anterior à gestação ou fator de risco crônico:

Risco em relação aos genitores:

- . • Nuliparidade/primiparidade
- . • Exposição limitada a esperma
- . • Gestação nos extremos da idade reprodutiva (adolescente ou acima de 40 anos)
- . • Inseminação com sêmen de doador
- . • Parceiro com história de pré-eclâmpsia em outra gestação

Risco materno específico:

- . • História de pré-eclâmpsia prévia
- . • Grandes intervalos entre as gestações
- . • História familiar
- . • Hipertensão crônica ou doença renal
- . • Obesidade, resistência aumentada à insulina, baixo peso materno ao nascer
- . • Diabetes gestacional, diabetes tipo 1
- . • Síndrome antifosfolípedes
- . • Hiper-homocisteinemia
- . • Estresse
- . • Tabagismo (risco diminuído)

Risco relacionado à gravidez:

- . • Gestação múltipla
- . • Infecção do trato urinário
- . • Anomalias congênitas estruturais
- . • Hidropisia fetal
- . • Anomalias cromossômicas
- . • Mola hidatiforme

Fonte: Dekker e Sibai (2001).

A presença de fatores de risco materno difere da pré-eclâmpsia quanto à gravidade (QUADRO 3). Nas primigestas, na maioria das vezes a doença mostra-se de forma leve próxima do término da gravidez ou intraparto (75% dos casos).

Em contraste, a gravidade aumenta na presença de doenças vasculares preexistentes, na gestação múltipla, nas diabéticas ou naquelas com história de pré-eclâmpsia anterior (DEKKER; SIBAI, 2001; DUKILT; HARRINGTON, 2005; SIBAI, 2003).

Duckitt e Harrington (2005) revisaram os trabalhos científicos quanto à presença de fatores de risco individual de pré-eclâmpsia. Entre outras variáveis de risco descritas no trabalho original, a nuliparidade aumenta 2,9 vezes o evento; a história de pré-eclâmpsia anterior aumenta sete vezes; e a presença de doenças prévias, como hipertensão anterior, aumenta entre 1,3 e 2,3 vezes o risco de pré-eclâmpsia. Embora tenha sido examinada a presença de risco individual, pouco se sabe, segundo os autores, a respeito da associação de risco numa mesma gestante.

32

QUADRO 2 Classificação da pré-eclâmpsia

Forma leve: nesse grupo os níveis pressóricos são inferiores a 160/110mmHg; e a pressão diastólica situa-se sempre abaixo de 110mmHg. A proteinúria encontra-se abaixo de 2,0g em coleta urinária de 24h ou abaixo de duas cruces na medida quantitativa. As gestantes são assintomáticas e não há alterações laboratoriais que evidenciem lesões em órgãos-alvo.

Forma grave: os achados clínicos e laboratoriais que caracterizam essa fase são mais intensos e assinalam-se pela presença de pressão arterial sistólica \geq 160mmHg e/ou pressão diastólica \geq 110mmHg e/ou proteinúria acima de 2,0g por dia (proteinúria de fita \geq duas cruces). Geralmente há algum grau de lesão em

órgão-alvo, a exemplo das anormalidades de enzimas hepáticas (TGO/TGP) e hiperbilirrubinemia. O clearance da creatinina mostra-se diminuído e a creatinina acima de 1,2mg/dl. Quando presente plaquetopenia, os níveis são abaixo de 100.000mil/mm³; e os achados de hemólise (desidrogenase láctica aumentada, presença de esquizócitos e esferócitos no sangue periférico) são freqüentes. Independentemente dos sinais clínicos e achados laboratoriais, sintomas maternos como cefaléia persistente, alterações visuais, dor no andar superior do abdome, hiperreflexia, eclâmpsia e oligúria sempre caracterizam a forma grave. A associação de hemólise, trombocitopenia e alteração hepática caracteriza a HELLP síndrome, que se enquadra na forma grave da doença. Os níveis de desidrogenase láctica encontram-se acima de 600U/L, as enzimas hepáticas acima de 70U/L, as bilirrubinas acima de 1,2mg/dl e plaquetas abaixo de 100.000mil/mm

Fonte: *National High Blood Pressure Education Program Working Group* (2000).

A pressão arterial média (PAM) representa a média da pressão arterial durante todo o ciclo cardíaco, sendo mais significativa em determinar a perfusão tecidual, eliminando também confusões a respeito da significância da hipertensão sistólica e diastólica (LÓPEZ, 2004). Para seu cálculo, emprega-se a fórmula $PAM = 1/3(PS + 2PD)$, onde PS é pressão sistólica e PD pressão diastólica (ROBERTS, 1999). Na gestação, a pressão arterial média é um importante indicador de risco de desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Um terço das gestantes com PAM > 90mmHg no segundo trimestre da gestação apresenta pré-eclâmpsia na gravidez avançada (CABRAL; SILVA PEREIRA, 1984).

Na forma grave da pré-eclâmpsia, as gestantes apresentam PAM \geq 126mmHg (160/110mmHg) persistente ou aumento de 40mmHg, mesmo em repouso (CABRAL, 1998).

QUADRO 3 Complicações maternas e fetais na pré-eclâmpsia grave

Complicações maternas:

- . • Descolamento placentário (1-4%)
- . • Coagulação disseminada/HELLP síndrome (10-20 %)
- . • Edema pulmonar/aspiração (2-5%)
- . • Insuficiência renal aguda (1-5%)
- . • Eclâmpsia (<1%)
- . • Insuficiência hepática ou hemorrágica (<1%)
- . • Choque (raro)
- . • Morte (raro)
- . • Morbidade cardiovascular tardia

Complicações fetais:

- . • Prematuridade (15-67%)
- . • Restrição de crescimento intra-uterino (10-25%)
- . • Lesão neurológica por hipóxia (<1%)
- . • Morte perinatal (1-2%)
- . • Complicações cardiovasculares no futuro conseqüente ao baixo peso ao nascer (origem fetal da doença no adulto)

Fonte: Sibai, Dekker e Kuplermenc (2005).

A magnitude do risco depende da idade gestacional na ocasião do diagnóstico, do parto, da gravidade da pré-eclâmpsia e da presença de doenças associadas (SIBAI; DEKKER; KUPLERMENC, 2005).

O tratamento definitivo da pré-eclâmpsia ainda é a interrupção da gestação, muitas vezes à custa de prematuridade, com aumento de morbidade decorrente de seqüelas por hipóxia e da mortalidade fetal inerente à própria imaturidade do recém-nascido (SIBAI, 1998; ROBERTS, 1999). O desfecho torna-se também desfavorável quando presentes o descolamento placentário e asfixia fetal intra-útero (SIBAI; DEKKER; KUPLERMENC, 2005).

Os estudos já realizados sobre pré-eclâmpsia muito contribuíram com avanços nos cuidados perinatais e redução de suas formas graves, principalmente a convulsiva (DEKKER; SIBAI, 2001), no entanto, a doença mantém frequência invariável (ROBERTS; LAIN, 2002).

2.3 Classificação da pré-eclâmpsia

O *National High Blood Pressure Education Program Working Group*, na última versão de 2000, apresentou proposta de classificação das doenças hipertensivas da gravidez em quatro grupos distintos (QUADRO 4): hipertensão arterial crônica; pré-eclâmpsia e eclâmpsia; pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica e hipertensão gestacional (NHBPEPWG, 2000).

QUADRO 4 Classificação dos estados hipertensivos na gravidez

Hipertensão arterial crônica:

Pressão alta anterior à gestação de qualquer etiologia: essencial; renovascular; supra-renal; e aquela diagnosticada pela primeira vez na gestação e sem remissão no pós-parto.

Pré-eclâmpsia:

Síndrome específica do período gestacional determinada pelo aumento da pressão após 20 semanas e proteinúria.

Pré-eclâmpsia sobreposta à hipertensão crônica:

- .- Agravamento súbito dos níveis pressóricos em gestantes hipertensas bem controladas.
- .- Aparecimento de proteinúria em gestantes hipertensas.
- .- Agravamento súbito da proteinúria em gestantes hipertensas previamente proteinúricas.
- .- Presença de trombocitopenia e elevação de enzimas hepáticas.

Hipertensão gestacional:

Mulheres que tiveram níveis pressóricos elevados diagnosticado pela primeira vez durante a gravidez e sem proteinúria. Esse diagnóstico é transitório até que apareçam outros sinais da síndrome da pré-eclâmpsia ou a pressão arterial elevada persista após o parto confirmando a quadro de hipertensão crônica.

Fonte: *National High Blood Pressure Education Program Working Group (2000).*

Na pré-eclâmpsia, a pressão arterial materna elevada é definida pela aferição de P S > 140mmHg ou PD > 90mmhg (fase V de Korotkoff) em gestantes previamente normotensas. Recomendam-se duas mensurações com intervalos, para reduzirem-se artefatos técnicos e ansiedade da gestante (LÓPEZ, 2004; NHBPEPWG, 2000).

Caracteriza a proteinúria a presença de $\geq 0,3g$ de proteína em volume urinário de 24 horas. Esse nível correlaciona a proteinúria de fita de uma ou mais cruzes em amostra aleatória de urina, quando ausente infecção do trato urinário. No entanto, o método da mensuração qualitativa pode não detectar sua presença numa amostra única, sendo recomendado o diagnóstico baseado em proteinúria quantitativa de 24 horas ou na correlação com a excreção de creatinina (NHBPEPWG, 2000).

O edema materno, principalmente de membros inferiores e face, sinal clínico presente na maioria das gestantes, não é mais considerado parâmetro de gravidade (NHBPEPWG, 2000).

O diagnóstico diferencial dos quadros hipertensivos na gravidez pode ser complexo, em especial na hipertensão arterial sistêmica com lesão renal e na insuficiência renal crônica, situações freqüentes de proteinúria. Entretanto, quando se verificam sinais de doença grave, a possibilidade de diagnóstico da pré-eclâmpsia torna-se mais evidente (NHBPEPWG,2000).

Na pré-eclâmpsia há diversas dúvidas que envolvem a fisiopatologia e dois momentos relacionados com o sistema endotelial: o que se refere à formação vascular placentária e às alterações na migração trofoblástica, seguido mais tarde de alterações vasculares generalizadas no organismo materno. Os fatores de angiogênese estão envolvidos nesses dois momentos (BROCKESBY *et al.*, 2000; CHAIWORAPONGA *et al.*, 2003; SHARON *et al.*, 2003).

2.4 Formação vascular – vasculogênese

O surgimento de uma rede vascular é primordial no desenvolvimento humano e na vida embrionária dos vertebrados e é o primeiro sistema a se desenvolver, por meio de mecanismos distintos e seqüenciais de vasculogênese e angiogênese. É crucial, portanto, nas etapas de organogênese e placentação (BREIER, 2000; FLAMME; FROLICH; RISAU, 1997; KINGDOM *et al.*, 2000; SHERER; ABULAFIA,

2001).

A vasculogênese é um fenômeno quase que exclusivo da vida embrionária, embora estudos recentes mostrem que acontece no adulto, pelo recrutamento de células precursoras da medula óssea, em resposta à isquemia tecidual (TAKAHASHI *et al.*, 1999).

No período embrionário, a vasculogênese inicia-se pela migração e diferenciação das células mesangiais oriundas do saco vitelino e, mais tarde, do sistema hematopoético hepático (hemagioblasto e angioblasto). As células endoteliais - os angioblastos - formam uma rede vascular primitiva que no processo de maturação originam vasos estáveis. As linhagens hematopoéticas formam as células circulantes no interior desses vasos. Os sinais que regulam a migração e organização dessas células são complexos e alguns fatores de crescimento têm sido identificados (FLAMME; FROLICH; RISAU, 1997; RISAU; FLAMER, 1995).

A unidade funcional formada - o vaso sanguíneo - exhibe variações morfológicas e funcionais a partir da árvore capilar. Os pequenos vasos são constituídos basicamente por uma monocamada de células endoteliais, enquanto os médios e grandes são envolvidos por células perivasculares - os pericitos e células musculares lisas, respectivamente (D'AMORE; THOMPSON, 1987).

Os vasos sanguíneos repousam sobre uma membrana basal composta de uma

zona translúcida (lâmina rara) e uma zona densa (lâmina densa) de tecido intersticial conectivo, com quantidades variáveis de fibronectina, laminina, colágeno tipo IV, elastina e sulfato de proteoglicanos (ROBERTS; WALKER; SHELLENBERG, 2002).

As células endoteliais e perivasculares carregam informações genéticas para formação de tubos, ramificações e formação de rede vascular e normalmente se encontram em estado quiescente. A habilidade das células do endotélio em responder aos fatores de crescimento vascular depende da sua origem, seu fenótipo e das condições do ambiente (FERRARA, 2000; FOLKMAN; SHING, 1992).

O sistema vascular é especializado em transporte de nutrientes e de produtos da degradação metabólica, participa da resposta inflamatória, mantém o tônus e a integridade vascular e a atividade antitromboembólica, quando intacto (TOBELEM, 1999).

2.5 Angiogênese

Angiogênese é o desenvolvimento de novos capilares a partir de vasos preexistentes. Os mecanismos básicos pelos quais a angiogênese se processa mostram variadas formas de crescimento, incluindo: brotamento, intussuscepção, alongamento e ramificação (RISAU, 1997).

São etapas conhecidas, bem estudadas e necessárias na angiogênese: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; ativação proteolítica com degradação da membrana basal; depósito de fibrina que fornece nova matrix para crescimento celular; mitoses de células endoteliais; migração celular provavelmente por estímulos quimiotático; união das células endoteliais e posterior formação de lúmen (tubulação). Finalmente, os pericitos são recrutados e necessários à estabilidade vascular ao se associarem às células endoteliais e inibirem crescimentos adicionais (FLAMME; FROLICH; RISAU, 1997; RISAU, 1997).

ANGIOGÊNESE E PAREDE VASCULAR

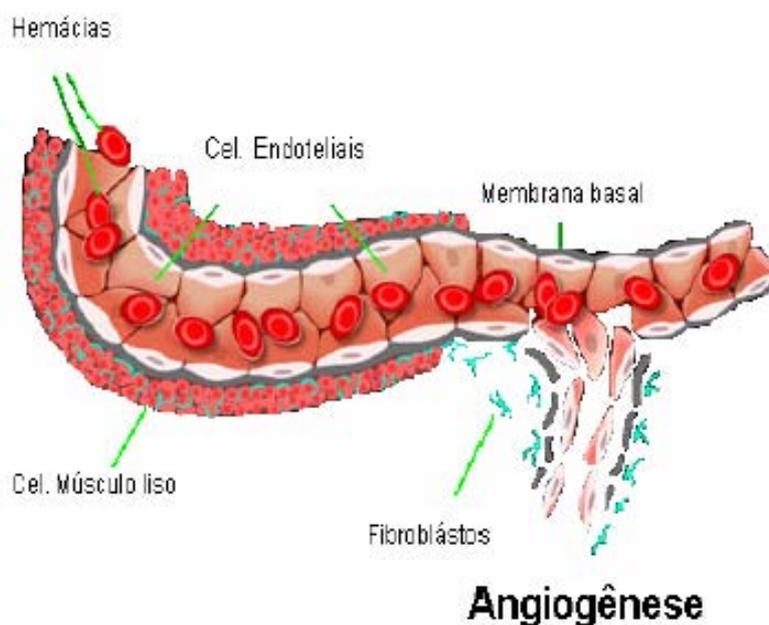


FIGURA 2 - Angiogênese e parede vascular. Fonte: <http://www.gene.com> - 30/10/2006. A figura mostra a composição da parede vascular e os caminhos da angiogênese: degradação da matriz extracelular, quimiotaxia dos fibroblastos, migração e proliferação de células endoteliais.

2.6 Reguladores da angiogênese

2.6.1 Estimuladores da angiogênese

Esse complexo processo é regulado por um mecanismo equilibrado e delicado de fatores ativadores e inibidores da angiogênese (IRUELA-ARISPE; DVORAK, 1997).

O principal estímulo à angiogênese parece ser a concentração local de oxigênio nos tecidos (FOLKMAN; SHING, 1992; GENBACEVO, 1995; JAUNIAUX; WATSON; BURTON, 2001; RISAU, 1997). Outros marcadores podem estimulá-la, como: a concentração de glicose e hormônios; as citocinas e fatores de crescimento celular (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2005); a presença de células inflamatórias e pericitos; alguns componentes da matrix extracelular, como a fibronectina e fibrina; e outras proteínas, como a uroquinase e ativadores teciduais do plaminogênio (FERRARA, 2000; FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003; FLAMME; FLORICH; RISAU, 1997).

Numerosas citocinas participam da angiogênese. Entre os fatores promotores, os fatores de crescimento do fibroblasto (FGFs) ácido e básico foram os primeiros a ser purificados, a partir do método de cromatografia, quando exibiram afinidade à heparina. Os FGFs possuem atividade mitogênica, estimulando o crescimento de vários tipos celulares, como as epiteliais, as endoteliais, as células da musculatura lisa e fibroblasto (BAIRD; KLASGBRUN, 1991).

Posteriormente, muitos outros peptídeos com atividade biológica angiogênica foram isolados: o fator de necrose tumoral (TNF α); o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); e o fator de crescimento do hepatócito e angiogenina (IRUELA-ARISPE; DVORAK, 1997).

As angiopoetinas (Ang1 e Ang2) estão envolvidas nas etapas de formação, remodelação e estabilidade do plexo capilar primário e também na sobrevivência das células endoteliais durante a vasculogênese. Expressam suas atividades pela ligação aos receptores tirosina-quinase (Tie-1 e Tie-2) das células endoteliais e hemangiopoéticas (HAYES *et al.*, 1999).

Muitas outras substâncias purificadas, de baixo peso molecular, também exibem atividade angiogênica, a exemplo das prostaglandinas (PgE1 e PgE2), adenosina, certos produtos de degradação do ácido hialurônico, complexos à base de íons, cobre e heparina (FOLKMAN; SHING, 1992).

De grande importância na angiogênese, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), uma glicoproteína de peso molecular 45kDa, foi originalmente isolada em estudos de líquidos e tecidos tumorais e subsequentemente em tecidos normais e em situações patogênicas no homem (FERRARA, 1999; 2000; HICKLIN; ELLIS, 2005).

Chamado primariamente por Senger, Galli e Dvorak em 1983 de fator de permeabilidade vascular (VPF), o VEGF/VPF tratava-se de uma mesma molécula (CONNOLLY *et al.*, 1989; DVORAK *et al.*, 1995). Essa glicoproteína apresentava atividade biológica altamente específica nas células endoteliais, com aumento de permeabilidade vascular superando em 50.000 vezes a histamina (FERRARA, 1999 e 2000; FOLKMAN; SHING, 1992).

O mecanismo de aumento da permeabilidade microvascular não é totalmente conhecido. Estudos sugerem que essa indução pode ser mediada por canais de cálcio envolvendo o óxido nítrico e ativando o monofosfato de guanosina (GMP) cíclico e estimulando a produção de prostaglandinas (Pgl2) via canais de ERK1/2. O extravasamento de macromoléculas envolve liberação de vesículas

transmembranas e induz fenestrações no endotélio sem lesão celular (BATES; HARPER, 2003; ZARCHARY, 2001). Além de induzir atividade biológica proliferativa e de migração celular no endotélio derivado de artérias, veias e vasos linfáticos e de outros tipos celulares, o VEGF é responsável também pela sobrevivência celular, pois inibe o fenômeno de apoptose (FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003; HICKLIN; ELLIS, 2005).

O VEGF é hoje conhecido como uma família de glicoproteínas com cinco membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E; e um homólogo, o fator

de crescimento placentário (PIGF 1 e 2). O VEGF-A é genericamente chamado de VEGF. E mais, específicas famílias do VEGF, como VEGF-A, podem expressar geneticamente alternativas isoformas de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA), conforme variação do peso molecular: VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206 e outras (BOBIK; CAMPBELL, 1993; FERRARA, 1999; FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003; HICKLIN; ELLIS, 2005). Ao que tudo indica, essas isoformas são tecido-específicas, com papéis diferenciados na vasculogênese e angiogênese nos processos fisiológicos e patológicos (CARMELIET, 2003)

O VEGF e suas isoformas expressam intensa atividade angiogênica, pela ligação aos receptores de membrana celular: o VEGFR-1, também chamado *fms-like tyrosine kinase -1* ou Flt-1; o VEGFR-2, mencionado KDR em humanos e Flk-1 em ratos; e o VGFR-3 (Flt-4), relacionado à linfangiogênese (SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2005). As estruturas moleculares desses receptores são similares. O VEGFR-1 mostra 80% de identidade em seqüência de aminoácido com o VEGFR-2 e VEGFR-3 (BOBIK; CAMPBELL, 1993; FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003; KUMAZAKI *et al.*, 2002).

Também existe uma fração natural solúvel do VEGFR-1 (sFlt-1) com função provavelmente moduladora da atividade do VEGF e PIGF, cuja atividade tem sido de importância na pré-eclâmpsia (BANKS *et al.*, 1998; POWERS *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 2003; STAFF; BRAEKKE; HARSEM, 2005).

Além disso, o VEGF interage com co-receptores, os neurofilins 1 e 2, que diferem dos receptores tirosina-quinase por não induzirem sinal celular direto (FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003).

Ainda não estão totalmente esclarecidas as interações dos VEGFs e seus receptores (FIG. 3) nos processos fisiológicos e patológicos humanos (FERRARA; GERBER; LECOUNTER, 2003; HICKLIN; ELLIS, 2005).

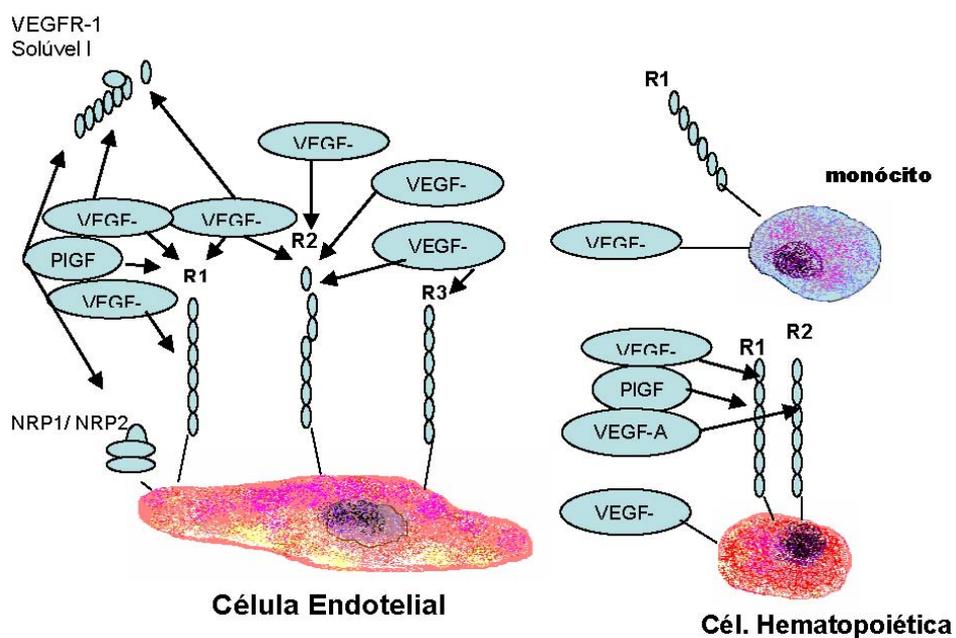


FIGURA 3 - Interação do VEGF com receptores celulares.

O VEGFR1 e VEGFR2 são expressos na superfície das principais células do sangue. O VEGFR3 está restrito ao endotélio dos vasos linfáticos. O VEGF-A liga-se aos receptores VEGFR1 e VEGFR2, no entanto, o PlGF e o VEGF-B interagem somente com VEGFR-1. Finalmente, o VEGF-C e VEGF-D ligam-se aos receptores VEGFR-2 e VEGFR-3 (FIG. 2). VEGFR1 (R1), VEGFR2 (R2), VEGFR3 (R3): receptores celulares dos fatores de crescimento vascular endotelial. NRP1/NRP2: Co-receptores celulares Neurofilins 1 e 2

Fonte: Ferrara, Gerber e Lecounter (2003) modificado.

2.6.2 Inibidores da angiogênese

Estudos sobre inibidores da angiogênese seguem duas correntes distintas. Alguns objetivam identificar os inibidores teciduais do crescimento vascular e outros buscam purificar substâncias sintéticas ou naturais com função antiangiogênica (IRUELA-ARISPE; DVORAK, 1997).

Os inibidores de angiogênese e sua relação com os tumores foram originalmente estudados por Folkman há mais de três décadas (FOLKMAN; SHING, 1992).

Desde 2004 os inibidores de angiogênese (TAB.1) vêm sendo liberados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos e em mais 28 países para tratamento de tumores e doenças, como artrite reumatóide. A aplicação clínica dessa nova classe de drogas visa a impedir o crescimento tumoral, por inibição de angiogênese, com menos efeitos colaterais que alguns quimioterápicos (FOLKMAN, 2006).

TABELA 1 Inibidores séricos endógenos e da matrix extracelular

Inibidores

1. 3. Angiostatina
2. 4. Antitrombina III
3. 5. Endostatina
4. 6. Fragmentos da histidina
5. 7. Interferon- β
6. 8. 2- methoxestradiol
7. 9. Fator plaquetário 4
8. 10. sFlt-1

Ensaio Clínico

Fase II

11. Tetrahydrocortisol	Fase III	Fase II
12. Trombospondina 1e2		Fase III
13. Vasostatina		Fase II

Fonte: Folkman (2006) modificado.

2.6.3 Angiogênese fisiológica e patológica

A angiogênese já é reconhecida no organismo em muitos processos fisiológicos e patológicos. Fisiologicamente, o *turnover* das células endoteliais é medido em anos; e nos tecidos que não requerem formação de vasos periodicamente, a

proliferação é muito lenta ou inibida (CARMELET, 2003; FOLKMAN; SHING, 1992).

Nos processos reparativos, como na cicatrização de feridas, os novos vasos formados contribuem para o suprimento de oxigênio e de nutrientes, bem como para a remoção de excreções. Depois de reparado o tecido, cessam os sinais de angiogênese (PELED; CHIN; LIU, 2000).

A angiogênese ocorre também com finalidade de suprimento nutricional adequado aos tecidos hipertrofiados dos músculos esqueléticos e cardíacos submetidos ao exercício crônico (FOLKMAN, 2006).

Todo ciclo reprodutivo feminino exhibe angiogênese. A alteração cíclica do endométrio com crescimento de vascularização na fase proliferativa prepara o endométrio para a implantação (JAFFER, 2000). O crescimento folicular e subsequente formação do corpo lúteo exibem intensa angiogênese. Os hormônios progesterona e estrógenos induzem a expressão de VEGF no estroma das células uterinas (HYDER; STANCEL, 1999).

Para a formação placentária, é necessária intensa vasculogênese e angiogênese, que irão determinar o padrão dos vilos placentários (GEVA *et al.*, 2002; KINGDOM *et al.*, 2000; SHORE *et al.*, 1997).

A invasão da decídua materna pelo trofoblasto e a adaptação da vasculatura uterina são dependentes de fatores de angiogênese (LASH *et al.*, 1999).

Distúrbios na rede vascular embrionária e placentária associam-se a processos patogênicos (CHARNOCK-JONES; KAUFMANNP; MAYHEN, 2003; MAYHEW *et al.*, 2004; ONG; LASH; BAKER, 2000; SHERER; ABULAFIA, 2001; WHEELER; ELCOCK; ANTHONY, 1995; ZYGMUNT *et al.*, 2003).

O abortamento precoce tem sido freqüentemente associado a cromossomopatias, alterações metabólicas e endócrinas. Estudos em angiogênese demonstraram rede vascular empobrecida tanto nos vilos coriônicos quanto nos embriões (CARMELIET *et al.*, 1996; SHERER; ABULAFIA, 2001).

A análise das estruturas vasculares dos cotilédones placentários na restrição de crescimento fetal intra-uterino (CIUR) revela: presença de baixa vascularização com vasos curtos, poucas alças (*loops*) e ramificações. Esses padrões vasculares podem levar a alterações patogênicas, como: vilosite crônica, infartos e hemorragias endovasculares, com subseqüente insuficiência placentária (MAYHEW *et al.*, 2004).

Nas mulheres gestantes diabéticas, os estudos com microscopia eletrônica e histoquímicos têm mostrado padrão de vascularização anormal nos vilos placentários. Os vasos sanguíneos são curtos, muito ramificados e imaturos,

levando ao aumento da superfície do leito capilar e à redução da área de trocas metabólicas (MALY *et al.*, 2005).

Na pré-eclâmpsia há desequilíbrio na expressão (KUMAZAKI *et al.*, 2002) e produção de fatores angiogênicos placentários (HELKSKE *et al.*, 2001), provavelmente em resposta à concentração de oxigênio local no espaço intervilo (AHMED *et al.*, 2000). A concentração elevada do receptor solúvel na corrente sanguínea materna (BANKS *et al.*, 1998; CLARK *et al.*, 1998) pode induzir a disfunção endotelial sistêmica encontrada nessas gestantes (KOGA *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 2003; TSATSARIS *et al.*, 2003).

Outras enfermidades envolvendo formações vasculares excessivas e persistentes são as chamadas doenças angiogênicas. Nas retinopatias do prematuro e dos diabéticos, os capilares invadem o humor vítreo levando a sangramentos e, inclusive, à cegueira. Algumas doenças imunológicas e inflamatórias exibem intensa angiogênese, como psoríase e artrite reumatóide, nas quais os vasos neoformados invadem e destroem a cartilagem induzindo o processo inflamatório (CARMIELET, 2003; FOLKMAN, 1995; 2006).

Em geral, todas as especialidades médicas lidam com doenças nas quais algum grau de alteração angiogênica está presente (CARMELIET, 2003; ONG; LASH; BAKER, 2000). A formação tumoral e as metástases são angiogênese-dependentes. O tumor continuamente libera substâncias angiogênicas induzindo ramificação e crescimento de vasos teciduais. Os vasos formados invadem o

interior do tumor, proporcionando seu crescimento próprio e viabilizando o transporte de células metastáticas (FOLKMAN, 2006; HICKLIN; ELLIS, 2005).

2.7 Vasculogênese e angiogênese no desenvolvimento placentário

A rede vascular uterina passa por mudanças adaptativas no processo gestacional, como vasodilatação, aumento da permeabilidade, crescimento e desenvolvimento de novos vasos no processo de placentação, objetivando suprir o feto de suas necessidades metabólicas e adequar seu crescimento (WHEELER; ELCOCK; ANTHONY, 1995; ZYGMUNT *et al.*, 2003).

O crescimento dos vilos placentários começa bem cedo, quando o blastocisto entra em contato com a decídua materna, em torno de 21 dias pós-concepção ou cinco semanas de gestação cronológica. Nesse estágio inicial, as vilosidades primárias, compostas de uma massa de citotrofoblasto revestida por espessa camada de sinciotrofoblasto, invadem a decídua materna. Em seguida, as células do tecido conectivo reorganizam-se dentro dessa massa de citotrofoblasto/sinciotrofoblasto formando protusões chamadas vilosidades secundárias. A vasculogênese já pode ser observada no estágio dos vilos terciários, quando surgem cordões de células hemangiopoéticas iniciando a formação de tubos. Após 38 dias da concepção, um lúmen vascular com eritrócitos no seu interior pode ser

visualizado com clareza. Depois de seis semanas de gravidez, a lâmina basal organiza-se em torno dos vasos e, junto com os pericitos, iniciam o processo de estabilização e maturação. O desenvolvimento de capilares nos vilos placentários estende-se durante todo o primeiro trimestre até 10-12 semanas, quando cessam os sinais de vasculogênese. Os vasos então formados aumentam de volume e comprimento, enovelam, ramificam-se e protendem através do trofoblasto, iniciando o processo de angiogênese (CHARNOK-JONES; KAUFMANNP; MAYHEN, 2003; KINGDOM *et al.*, 2000).

A angiogênese que se processa inicialmente até o segundo trimestre forma uma rede vascular primitiva muito ramificada e imatura, com vasos de tamanhos e espessuras diferentes (angiogênese por brotamento). No terceiro trimestre, essa rede vascular mostra-se mais diferenciada e madura, pela requisição dos pericitos e células musculares lisas - são as vilosidades terminais. Predomina, nesse período, o crescimento dos vasos por alongamento (angiogênese sem brotamento) - (CHARNOCK-JONES; KAUFMANNP; MAYHEN, 2003; WHEELER; ELCOCK; ANTHONY, 1995).

O trofoblasto vascularizado assume caráter invasivo, com perda do fenótipo de células epiteliais para células de adesão, como as endoteliais, e dentro da camada decidual uterina alcançam as arteríolas espiraladas ali presentes, destruindo sua camada muscular (REGNAULT *et al.*, 2002). Esse processo se completa em torno de 20 semanas de gravidez, numa segunda onda de invasão, que ocorre na

porção miometrial dessas arteríolas. Como consequência, o fluxo sanguíneo aumenta devido à queda da resistência vascular e as arteríolas espiraladas, sem a camada muscular, deixam de reagir a substâncias vasoativas (PIJNEBORG *et al.*, 1983).

A maior mudança celular que caracteriza a transformação do endotélio de fase secretora em tecido decidual é a abundância de células inflamatórias. Células *natural-killer* provavelmente oriundas do sangue materno acumulam-se num denso infiltrado em torno do trofoblasto durante o movimento de invasão. Esse processo inicia-se na fase lútea antes mesmo da implantação do blastocisto. Na metade da gestação, essas células desaparecem, coincidentemente quando se finaliza a invasão trofoblástica (LI *et al.*, 2000). As células *natural-killer* influenciam na invasão trofoblástica e em mudanças no leito placentário materno. Elas produzem as principais citocinas implicadas na angiogênese e estabilidade vascular, incluindo VEGF e PlGF e angiopoetinas (MOFFETT-KING, 2002).

Vários fatores de crescimento, principalmente o VEGF/ PlGF e seus receptores, exercem função parácrina, modulando e regulando a angiogênese placentária, e autócrina, influenciando a função do trofoblasto e a sobrevivência embrionária (BREIER, 2000; CARMELIET *et al.*, 1996; FLAMME; FROLICH; RISAU, 1997; SHERER e ABULAFIA, 2001).

O VEGF e PlGF são encontrados em abundância na decídua materna e trofoblasto (HELSKE *et al.*, 2001; SHORE *et al.*, 1997) e estão presentes na

circulação materna (BAKER *et al.*, 1995; CLARK *et al.*, 1998; KUMAZAKI *et al.*, 2002; LEVINE *et al.*, 2004; POLLIOTTI *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2003). O VEGF já pode ser detectado no plasma materno na sexta semana de gravidez, com pico de concentração no final do primeiro trimestre (EVANS *et al.*, 1998), em paralelo com o aumento dos níveis séricos do hormônio gonadotrófico coriônico (HCG) - (BARTHA *et al.*, 2003).

Mudanças fisiológicas na circulação uterina são também reguladas pelo HCG produzido pelo trofoblasto. Esse hormônio exerce ação direta, induzindo a angiogênese pela ligação ao receptor HCG/LH das células endoteliais uterinas e em alguns tumores ovarianos, testiculares e adenocarcinoma de endométrio. É provável que exerça também ação indireta na angiogênese, estimulando a expressão do VEGF (ZGYMUND *et al.*, 2002).

Na placenta humana, o VEGF tem sua ação mediada pela ligação aos receptores VEGFR1(flt-1) e VEGFR2 (KDR) -(SHORE *et al.*, 1997). A ligação VEGF/VEGFR1 estimula a proliferação celular, enquanto o VEGF/VEGFR2 induz formação de tubos (SHYBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2005).

O PIGF mostra 53% de seqüência de aminoácido homóloga ao VEGF e liga-se somente ao receptor VEGFR2, resultando na formação de tubos e levando ao alongamento e enovelamento dos vasos. Secretado nos vilos e extravilos placentários, tem sua concentração gradativamente aumentada, com pico em

torno de 28 a 32 semanas de gravidez (TAYLOR *et al.*, 2003).

O balanço gradual de concentração entre VEGF/PIGF pode explicar as mudanças na angiogênese nos vilos placentários, como descrito antes, com predominância inicial no primeiro e segundo trimestres, angiogênese por brotamento e finalizando com angiogênese por alongamento no terceiro trimestre (CHARNOCK; KAUFMANNP; MAYHEN, 2003; KINGDOM *et al.*, 2000; WHEELER; ELCOCK; ANTHONY, 1995).

A angiogênese placentária está sob influência da concentração local de oxigênio, que muda nos espaços intervilosos durante a gravidez (AHMED *et al.*, 2000).

Tem sido estabelecido que a pressão de oxigênio (pO_2) antes de oito semanas está em torno de 20mmHg, após 12 semanas é maior que 50mmHg, atinge 60mmHg na 16ª semana de gravidez e após esse período declina gradualmente até o termo, com cifras aproximadas de 45mmHg. A “hipóxia” relativa inicial da decídua materna estimula a invasão trofoblástica (JAUNIAUX; WATSON; BURTON, 2001; LASH *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2005).

Culturas de tecido trofoblástico em diferentes tensões de oxigênio (hipóxia, normóxia e hiperóxia) mostram movimento diferenciado do trofoblasto quanto à migração e proliferação e também produção diferenciada dos fatores de angiogênese (VEGF e PIGF) e expressão de seus receptores (FILDLER *et al.*,

2005; GENBACEVO *et al.*, 1995; LASH *et.al.*, 1999).

Embora o VEGF e PlGF sejam estruturalmente semelhantes e se liguem aos mesmos receptores; exibem mecanismo de ação distinto sob variadas condições de oxigênio. Em situações de hipóxia, ocorre aumento do VEGF; e na hiperóxia há aumento de PlGF (AHMED; KILBY, 1997). Estudos mostram que a hipóxia induz alteração nas expressões gênicas dos fatores de angiogênese nas células trofoblásticas (AHMED *et al.*, 2000), o que pode resultar em condições patogênicas, como na pré-eclâmpsia (LASH *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2005; ZYGMUNT *et al.*, 2003).

Além disso, o trofoblasto de primeiro trimestre não responde à hipóxia/ hiperóxia da mesma forma que o de terceiro trimestre. Estudos *in vitro* mostram que a amostra de trofoblasto de primeiro trimestre responde mais ao VEGF com característica de sincício, motilidade e invasão do que tecido placentário a termo, que responde mais ao PlGF (KUMAZAKI *et al.*, 2002).

A concentração de oxigênio nos espaços intervilosos influencia o padrão morfológico das vilosidades placentárias (GENBACEVO *et al.*, 1995; ONG; LASH; BAKER, 2000). Estudos de fluxo da artéria uterina mostram que a oxigenação no início da gestação é mais importante para o desenvolvimento placentário; e o feto consome somente 25% do oxigênio requerido nessa fase (MOLINA; MESCHIA; WILKENING, 1990).

Kingdom e Kaufmann (1997) propuseram um modelo diferenciado de origem da hipóxia fetal: pré-placentária, útero-placentária e pós-placentária, a exemplo dos encontrados na anemia materna, gravidez em altas altitudes, pré-eclâmpsia e restrição de crescimento fetal com fluxo diastólico ausente na artéria umbilical, respectivamente. Na gravidez, na qual há redução pré e intraplacentária da concentração de oxigênio, predominam angiogênese por brotamento e conseqüente redução da impedância vascular. Em contraste, aumento na concentração de oxigênio intraplacentário - hiperóxia - levaria à conseqüente angiogênese por alongamento e aumento da impedância vascular, a exemplo do CIUR grave. Na gravidez normal, o balanço de oxigênio é equilibrado, levando à formação de vilos maduros (AHMED; KILBY, 1997).

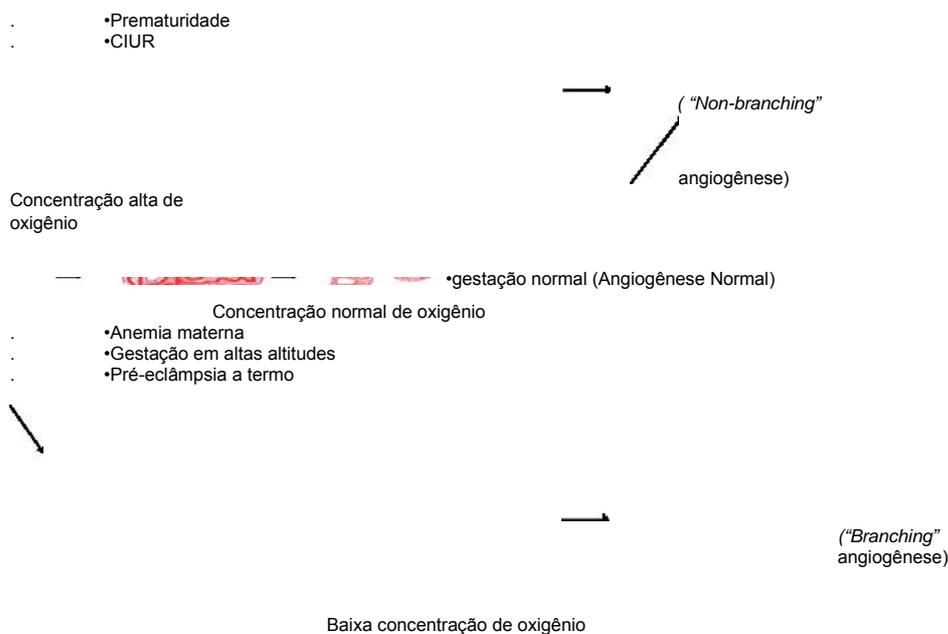


FIGURA 4 -Angiogênese placentária e desenvolvimento de vilos placentários em diferentes concentrações de oxigênio.

Fonte: Kingdom (2000), modificado.

Em pacientes anêmicas, nas gestantes em altas altitudes e na pré-eclâmpsia, a baixa PO₂ no espaço interviloso favorece a angiogênese através de grandes ramificações dos vasos (*branching* angiogênese). Esses quadros se enquadram no modelo de hipóxia pré-placentária e placentária. Por outro lado, a concentração aumentada de oxigênio na fase inicial placentária, "hiperóxia relativa", não estimularia a ramificação dos vasos e esses cresceriam somente em comprimento (*non-branching* angiogênese). Esse padrão viloso é encontrado no CIUR, com fluxo diastólico ausente ou reverso na artéria umbilical em hipóxia pós-placentária. Padrão semelhante de imaturidade de vilos é encontrado na placenta de parto prematuro.

Portanto, o trofoblasto placentário, além de exercer função de barreira estrutural e favorecer trocas bioquímicas entre os compartimentos mãe/feto, desempenha importante função endócrina e parácrina, pela produção de hormônio e de vários fatores angiogênicos, cruciais ao desenvolvimento placentário e bem-estar da gravidez (ZYGMENT *et al.*, 2003).

Na busca por marcadores plasmáticos na pré-eclâmpsia, que possam ser de valor em programas de detecção precoce, de predição e gravidade, os fatores angiogênicos têm sido descritos como de grande importância por estarem envolvidos nas etapas cruciais da fisiopatogenia dessa síndrome. Apesar das amplas evidências clínicas e experimentais, os estudos ainda são inconsistentes e às vezes discordantes quanto ao perfil sérico desses marcadores.

3 OBJETIVOS

- . • Avaliar o perfil do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do fator de crescimento placentário (PIGF) no plasma das gestantes com pré-eclâmpsia e comparar com as gestantes normotensas.
- . • Correlacionar a concentração plasmática do fator de crescimento endotelial (VEGF) e do fator de crescimento placentário (PIGF) com os níveis da pressão arterial média (PAM) em gestações complicadas pela pré-eclâmpsia.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Participaram deste estudo gestantes da comunidade, atendidas na Maternidade do Hospital das Clínicas da UFMG e que se encontravam nas unidades de admissão, pré-parto e na enfermaria de alto risco, no período de outubro de 2004 a janeiro de 2006. Para comporem as amostras, elas foram selecionadas segundo critérios de inclusão e exclusão, após concordarem em participar da pesquisa, na forma verbal e escrita (APÊNDICE A).

A pesquisa de fatores de angiogênicos na pré-eclâmpsia teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: ETIC 078/05 (ANEXO A).

4.1.1 Critérios de inclusão

- Grupo com pré-eclâmpsia

Esse grupo foi formado por 23 grávidas com elevação da pressão arterial (PA >

140/90mmHg) em pelo menos duas medidas, após período de repouso e presença de proteinúria após 20 semanas de idade gestacional. Todas as gestantes com pressão arterial elevada tiveram proteinúria qualificada pela fita medidora, no momento da admissão hospitalar. Para esclarecimento diagnóstico ou classificação da pré-eclâmpsia, quando o quadro clínico permitia a investigação quantitativa da proteinúria, uma amostra de urina de 24 horas era colhida, com supervisão da enfermagem. O diagnóstico foi baseado nos critérios do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure In Pregnancy* (2000), adotado no protocolo de pré-eclâmpsia da Maternidade.

- Grupo-controle

O controle foi formado por nove grávidas saudáveis, com gestação única, de evolução normal até o momento de inclusão no estudo, em trabalho de parto inicial e admitidas no mesmo setor da Maternidade. A formação do grupo-controle se deu sem ligação direta a um caso específico de pré-eclâmpsia e sim baseado na idade gestacional do grupo, de forma que, na totalidade, os grupos fossem parecidos.

4.1.2 Critérios de exclusão Foram considerados critérios de exclusão outros fatores que pudessem interferir no processo de angiogênese:

- . • Doenças maternas, como diabetes e anemia (ZYGMUNT *et al.*, 2003).
- . • Tabagismo (BELGORE; LIP; BLANN, 2000).

. • Gestação múltipla e fetos com anomalias estruturais (SHERER; ABULAFIA, 2001).

4.1.3 Características do grupo de estudo

As características gerais das gestantes, como idade materna, paridade, idade gestacional no momento da coleta dos dados, bem como a presença de fatores de risco de pré-eclâmpsia, são detalhadas a seguir:

a) Idade materna

A primeira variável analisada foi a idade materna das gestantes do grupo de estudo, distribuídas em intervalos de cinco anos a partir de 19 anos (TAB. 2).

TABELA 2 Distribuição das gestantes por idade materna nos grupos estudados

Idade (anos)	Absoluta	Frequências Relativa (%)	Acumulada (%)
≥19	1	3,13	3,13
20-24	12	37,5	40,63
25-29	8	25	65,63
30-34	9	28,12	93,75
35-42	2	6,25	100

Total

A idade materna do grupo de estudo variou entre 19 e 41 anos, concentrando-se a maioria das gestantes em dois intervalos de distribuição de idade, como mostra a frequência acumulada da TAB. 2, entre 20 e 34 anos.

A distribuição das gestantes por idade materna no grupo de pré-eclâmpsia em comparação às normotensas (controle) não apresentou diferença dessa variável nos dois grupos ($p=0,74$).

Para a análise de significância da diferença entre a idade materna nos dois grupos, empregou-se o teste não paramétrico da mediana (*Kruskal-wallis*), tendo em vista a distribuição desigual desse parâmetro dentro dos grupos (TAB. 3).

TABELA 3

Características das gestantes do grupo de pré-eclâmpsia em relação ao controle, segundo a idade e paridade materna e idade gestacional

	PRÉ-ECLÂMPسيا n = 23	CONTROLE n =9	p
IDADE MATERNA (anos) Mediana	28,00	24,00	0,74
PARIDADE MATERNA Mediana	2,00	2,00	0,25
	33,00		

35,00

0,220
IDADE GESTACIONAL
(semanas) Mediana

b) Paridade

As gestantes do estudo foram avaliadas quanto à paridade. A TAB. 4 mostra a análise estatística desse parâmetro, pelas frequências de distribuição dessa variável.

TABELA 4 Distribuição das gestantes do grupo estudado, segundo o número de gestações

Paridade	Frequências		
	Absoluta	Relativa (%)	Acumulada (%)
1	14	43,75	43,75
2	10	31,25	75,00
3	6	18,75	93,75
≥4	2	6,25	100
Total	32	100	

Observou-se que a maioria das gestantes do grupo era primigesta ou estava grávida pela segunda vez. Esses dois eventos agrupados acumularam 75% das grávidas.

A análise comparativa dos grupos mostrou homogeneidade quanto a essa

variável, portanto, não há diferença significativa no número de gestações entre as gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas. A TAB. 3 apresentou a análise do teste não paramétrico das medianas.

c) Idade gestacional na coleta dos dados

Para análise comparativa entre as idades gestacionais, foi considerado o momento da coleta do sangue materno quando da admissão da gestante e depois de confirmado o diagnóstico clínico e laboratorial de pré-eclâmpsia, conforme protocolo da Maternidade baseado na classificação de NHBPEPWG (2000). A distribuição dessa variável no grupo de estudo mostrou-se homogênea, na análise de significância da diferença entre os grupos, com medianas semelhantes (TAB. 3).

4.2 Métodos

4.2.1 Medida da pressão arterial

A pressão arterial foi mensurada segundo protocolo da Maternidade: paciente assentada por pelo menos cinco minutos, emprego do esfignomanômetro tipo coluna de mercúrio (marca BD®) colocado no braço esquerdo, com utilização do

método auscultatório.

A determinação do limite superior e inferior da pressão sanguínea foi obtida pela identificação do I e V sons de Korotkoff. A pressão arterial sistólica teve marco no surgimento do primeiro som e a diastólica no desaparecimento do som, durante a desinsuflação do manguito de pressão (NHBPEPWG, 2000).

Para compor uma das bases do diagnóstico de pré-eclâmpsia, foi considerada a presença de pressão arterial elevada acima de 140/90mmHg, após 20 semanas de gestação. Nas gestantes previamente hipertensas, considerou-se o agravamento dos níveis pressóricos ou anormalidades laboratoriais características da síndrome.

Para cálculo da pressão arterial média, utilizou-se a pressão arterial no momento da internação, determinada depois de duas mensurações com intervalo de trinta minutos, pela equipe médica de plantão. Empregou-se a fórmula $PAM = \frac{1}{3}(PS + 2PD)$, segundo Roberts (1999).

4.2.2 Mensuração da proteinúria

Nas avaliações qualitativas, quando a gravidade do caso não permitiu a coleta

quantitativa em 24 horas, uma amostra de urina foi colhida no momento da admissão e testada quanto à presença de proteinúria, pela fita medidora. Considerou-se positiva a leitura superior a uma cruz ($\geq 30\text{mg/dl}$).

Nas avaliações quantitativas, uma amostra de urina foi colhida por 24 horas, sob orientação da enfermagem, segundo protocolo da Maternidade, considerando-se para diagnóstico de proteinúria na pré-eclâmpsia valores acima de 0,3 gramas.

4.2.3 Coleta do sangue materno

Todas as pacientes incluídas no estudo tiveram amostra de sangue periférico colhido na região cubital de um dos membros superiores, após termo de consentimento pós-informado.

Foi feita anti-sepsia prévia do local a ser puncionado com álcool a 70% e uma amostra de 5ml em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 5ml sem anticoagulante foi colhida em sistema de *VACUTAINER*® estéril.

As amostras foram transferidas para tubos de polietileno do tipo *EPPENDORF*®, com capacidade para 2ml devidamente identificados.

Seguiram-se, então, o processo de centrifugação com duração de 10 minutos, a 4.000 rotações por minuto (rpm) e armazenagem em sistema refrigerado a -4° .

O plasma e o soro decorrentes desse processo foram pipetados empregando-se ponteiros descartáveis e novamente colocados em tubos de polietileno, identificados pela letra alfa e número em ordem crescente. Esses tubos foram armazenados em nitrogênio líquido a -80° no Laboratório do Centro de Medicina Fetal.

4.2.4 Técnica de dosagem dos fatores de angiogênese - ensaio de ELISA

Do material estocado em gelo seco, foram selecionadas aleatoriamente as amostras identificadas com a sigla alfa/número e colocadas em gelo seco para transporte até o Laboratório de Angiogênese no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Foi utilizada uma placa de *enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ELISA) para cada fator de angiogênese e na mesma amostra foram dosados simultaneamente o fator de crescimento placentário (PIGF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), *kits* R&D Systems.

Antes do ensaio, as amostras foram descongeladas e processadas num sistema de resfriamento. O ensaio foi realizado com supervisão técnica, conforme protocolo de ELISA, que é baseado no princípio do “sanduíche” de anticorpos.

Inicia-se o ensaio adicionando-se um anticorpo específico numa microplaca de

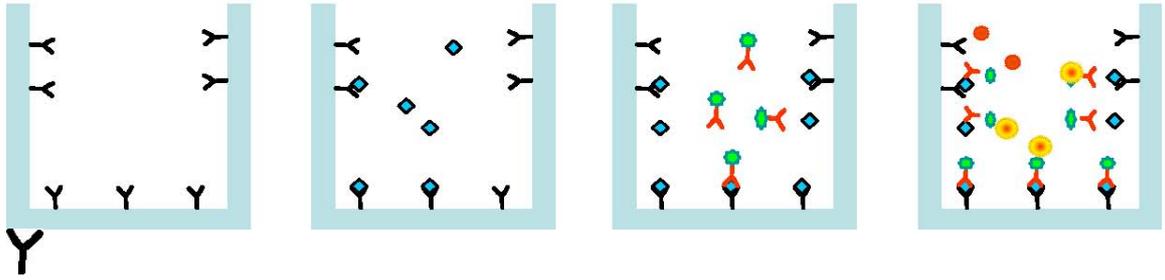
ELISA para criar-se uma superfície sólida de anticorpos. Essa é a fase de sensibilização da placa com anticorpos específicos. O excesso de anticorpo é removido por lavagem e um reagente bloqueador é adicionado à placa.

Em seguida, adiciona-se o material (sobrenadante celular, soro ou plasma), onde está presente o antígeno que se deseja quantificar. Ocorre então ligação dos antígenos com os anticorpos aderidos previamente à placa.

Após novas lavagens para retirar o excesso da reação, um outro anticorpo ligado a uma enzima, ou com receptor enzimático, e capaz de detectar a reação anterior entre anticorpo/antígeno é adicionado, completando-se o “sanduíche” de ELISA. O substrato dessa enzima é adicionado aos poços da placa e a reação enzimática que se processa emite coloração, com intensidade proporcional à quantidade da reação.

Finalmente, uma solução paralisante da reação, à base de ácido, é adicionada, ocorre novamente mudança na coloração e a intensidade dessa cor é mensurada em leitor de ELISA.

Todas as etapas necessárias à reação de ELISA, como diluição, processo de lavagem e tempo de espera entre cada reação, são determinantes do processo.



Anticorpo de captura Antígeno





Anticorpo de detecção

Substrato -Substrato após ação enzimática

FIGURA 5 - Representação esquemática das etapas do ensaio enzimático da

reação de ELISA.

- . • A primeira etapa mostra os anticorpos aderidos ao poço, na fase chamada de sensibilização.
- . • A segunda etapa mostra a reação anticorpo/antígeno específica.
- . • A terceira etapa representa a adição de um anticorpo de detecção da reação anterior, ligado a uma enzima conhecida (“sanduíche” de ELISA).
- . • Por último, o substrato dessa enzima é adicionado e a reação enzimática que se processa pode ser visualizada pela formação de cor, com intensidade proporcional à quantidade de reação.

Para a dosagem dos marcadores de angiogênese, foram empregados os *kits DuoSet ELISA Development System* (R&D Systems: Elisa/ Assays), que contêm os componentes básicos necessários ao desenvolvimento do “sanduíche” de ELISA para mensurar VEGF e PlGF livres:

- . • *Human VEGF DY 293B* (sensibilidade de detecção da forma livre do VEGF: 77%).
- . • *Human PlGF DY 264* (sensibilidade de detecção da forma livre do PlGF: 85%).

Os ensaios de ELISA foram padronizados segundo o protocolo do Laboratório de Angiogênese do ICB e realizado de maneira semelhante e simultânea, na mesma amostra de plasma materno para os dois marcadores de angiogênese, PlGF e VEGF.

a) Primeira etapa do ensaio: sensibilização da placa de ELISA

No primeiro dia foi selecionada placa padronizada, estéril, com 96 poços para ensaio de ELISA, sensibilizada com 100µl por poço de solução contendo anticorpo de captura do VEGF ou PlGF. A placa foi vedada, colocada em caixa escura e úmida a 4 ° C (geladeira) e incubada *overnight*.

Para o preparo do anticorpo de captura foi usada a solução de estoque do *kit* - 180mg/ml de *mouse anti-human VEGF* e 720mg/dl de *mouse anti-human PIGF* reconstituída em solução de PBS (1,0ml), conforme protocolo do *kit*, para atingir a concentração de 1,0mg/ml de VEGF e 4,0mg/ml PIGF em 10ml de solução salina tamponada PBS - NaCL a 137mM; KCL a 2,7mM; Na₂HPO₄ a 8,1mM; KH₂PO₄ a 1,5mM; água deionizada 1000ml.

b) Segunda etapa do ensaio: bloqueio/ adição das amostras, do padrão e do branco

No dia seguinte, todo o conteúdo dos poços foi desprezado e, em seguida, iniciado o processo de lavagem com 100ml/poço de *tween 20*. O processo de lavagem foi padronizado nesse ensaio (lavagem repetida por cinco vezes, usando-se pipeta de multicanal).

Depois, foram colocados em cada poço 300µl de tampão de bloqueio. A placa foi vedada e incubada por uma hora em temperatura ambiente. Após esse tempo, o conteúdo da placa foi retirado e novas lavagens foram realizadas.

As amostras foram descongeladas e usadas sem processo de centrifugação ou diluição. À placa foram adicionados o branco, a curva-padrão e as amostras em duplicata, nesta ordem; e incubada *overnight* a 4°C.

Tween 20 (Polioxietilensorbitano monolaurato_ *Synth_* cód.T1038). Tampão de

bloqueio (solução de PBS estéril com BSA 1% - albumina *serum* bovina).

c) Terceira etapa do ensaio: detecção e revelação

A última fase do ensaio teve início desprezando-se o conteúdo das placas e repetindo-se o processo de lavagem (cinco vezes). Posteriormente, adicionou-se em cada placa o anticorpo de detecção da reação, já ocorrida entre o antígeno da amostra e o anticorpo da placa, finalizando o chamado “sanduíche” de ELISA. Esse processo ficou em incubação por aproximadamente uma hora. Em seguida, o conteúdo dos poços das placas foi aspirado e seguido de novas lavagens, com solução de *Tween* 20. A enzima usada foi a estreptovidina e o substrato o OPD (o-fenilenodiamina, Sigma), que dá a reação cor amarelada num período não superior a 20 minutos. A reação foi paralisada com o tampão ácido de citrato/fosfato e mudou a coloração da placa para alaranjado. Foi realizada leitura em leitor de microplaca de ELISA, em absorbância, num comprimento de onda de 492nm. A conversão de absorbância para pg/ml foi obtida por meio da média aritmética da somatória das absorbâncias.

A curva padrão do ensaio do VEGF e a do PIGF tiveram correlação de 0,997 e 0,98, respectivamente, com a curva padrão do *kit*.

4.3 Análise estatística

a) Cálculo amostral

Trata-se de estudo transversal, do tipo caso-controle, com relação 4:1, cuja amostragem foi estimada em 24 casos de gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia, segundo critério do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure In Pregnancy* (2000) para seis controles constituídos de gestantes normotensas. Empregou-se o programa EpiInfo Versão 2002, modelo *Statcalc.Exe*, com os seguintes parâmetros: erro α - 5%, erro β - 20%, *odds ratio* de 15,4; semelhantemente ao estudo realizado por Pollioty *et al.* (2003).

b) Análise das variáveis A análise dos dados foi executada empregando-se o programa MINITAB® *Release14-statistical software*, versão 14.20 de 2005.

Para a comparação entre os grupos para variável de mesma distribuição normal, empregou-se o teste t-*Student*. O nível de significância aceitável foi de $p < 0,05$.

Para análise de significância da diferença entre os grupos para variável sem distribuição normal, empregou-se o teste não paramétrico da mediana (*Kruskal-Wallis test*).

A relação de dependência entre as variáveis contínuas, níveis plasmáticos do PIGF e pressão arterial média foi verificada por meio da regressão dos mínimos quadrados e análise de variância, função MINITAB *Fitted Line Plot* com intervalo de confiança de 95%,

5 RESULTADOS

5.1 Presença de fatores de risco de pré-eclâmpsia As gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia foram analisadas quanto à presença de fatores de risco da doença. A TAB. 5 mostra que a maior parte delas era primigesta ou não apresentava qualquer fator de risco.

TABELA 5 Distribuição das pacientes com pré-eclâmpsia segundo presença de fator de risco anterior

FATORES DE RISCO	FREQUÊNCIAS		
	ABSOLUTAS	RELATIVA S (%)	ACUMULADA (%)
Primigestas	11	47,82	47,82

Pré-eclâmpsia anterior	3	13,04	60,86
Hipertensão arterial crônica	2	8,69	69,56
Sem fator de risco	7	30,44	100
Total	23	100	

Uma das gestantes com pré-eclâmpsia era ao mesmo tempo primigesta e hipertensa crônica em uso de medicamento. Foi considerado o risco individual da hipertensão crônica para análise dos dados, uma vez que o risco para essa variável é sete vezes maior em relação à recorrência da doença (DUCKITT; HARRINGTON, 2005). Outra gestante era hipertensa crônica em uso de medicamento, com história de pré-eclâmpsia anterior. Para análise do risco foi considerada a história pregressa de pré-eclâmpsia (DUCKITT; HARRINGTON, 2005).

5.2 Classificação das gestantes com pré-eclâmpsia, conforme gravidade do quadro clínico

As gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia foram classificadas como forma leve e grave, baseado nos critérios NHBPEPWG (2000) e no valor da PAM (CABRAL; SILVA PEREIRA, 1984).

A TAB. 6 mostra a distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo a PAM em mmHg e os critérios de gravidade baseados na classificação do NHBPEPWG (2000).

No grupo das gestantes que desenvolveram a forma grave da doença, a ocorrência de pressão arterial elevada foi o evento mais freqüente (35%), seguido da presença de sintomas maternos (9%), eclâmpsia (4%), síndrome HELLP (4%) e plaquetopenia (4%).

TABELA 6 Distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo a forma clínica, de acordo com os critérios de gravidade

CLASSIFICAÇÃO DA PRÉ-ECLÂMPسيا		Freqüência Absoluta	Freqüência Relativa (%)
Pré-eclâmpsia grave	PAM \geq 126mmHg Eclâmpsia HELLP Plaquetopenia Sintomas Maternos	8 1 1 1 2	35 4 4 4 9
Pré-eclâmpsia leve		10	44
Total		23	100

5.3 Avaliação da proteinúria nas gestantes com diagnóstico de pré-eclâmpsia

Todas as gestantes com pressão elevada no momento da primeira avaliação

tiveram a proteinúria qualificada pela fita medidora. Quando as condições clínicas da gestante permitiam, ou para fins de esclarecimento diagnóstico, a proteinúria era avaliada em coleta urinária de 24 horas. As TAB. 7 e 8 mostram a distribuição e a freqüência dessa variável

TABELA 7 Distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo a proteinúria

Proteinúria quantitativa

Concentração em g/dl n = 9

Menor que 2,0 g

Maior que 2,0 g n = 4

n = 5

TABELA 8 Distribuição das gestantes com pré-eclâmpsia segundo o grau da proteinúria qualitativa

Proteinúria

Freqüência Absoluta

Relativa

qualitativa:

+	6	26
++	5	22
+++	12	52
Total	23	100

A concentração dos níveis dos marcadores de angiogênese - VEGF e PlGF - foi dosada no plasma materno e a análise dos resultados entre as gestantes que

desenvolveram pré-eclâmpsia e as normotensas, em idades gestacionais semelhantes, está representada nas TAB. 9 e 10 e GRÁF. 1-5.

5.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O GRÁF. 1 exibe a concentração individual do marcador de angiogênese VEGF no sangue materno em todas as gestantes do estudo - nas que desenvolveram pré-eclâmpsia e nas normotensas.

Houve grande variação quantitativa na concentração de VEGF nos grupo da pré-eclâmpsia e nas normotensas. A amplitude da variação foi maior entre as hipertensas. A distribuição mostrou-se assimétrica, com médias e medianas distantes.

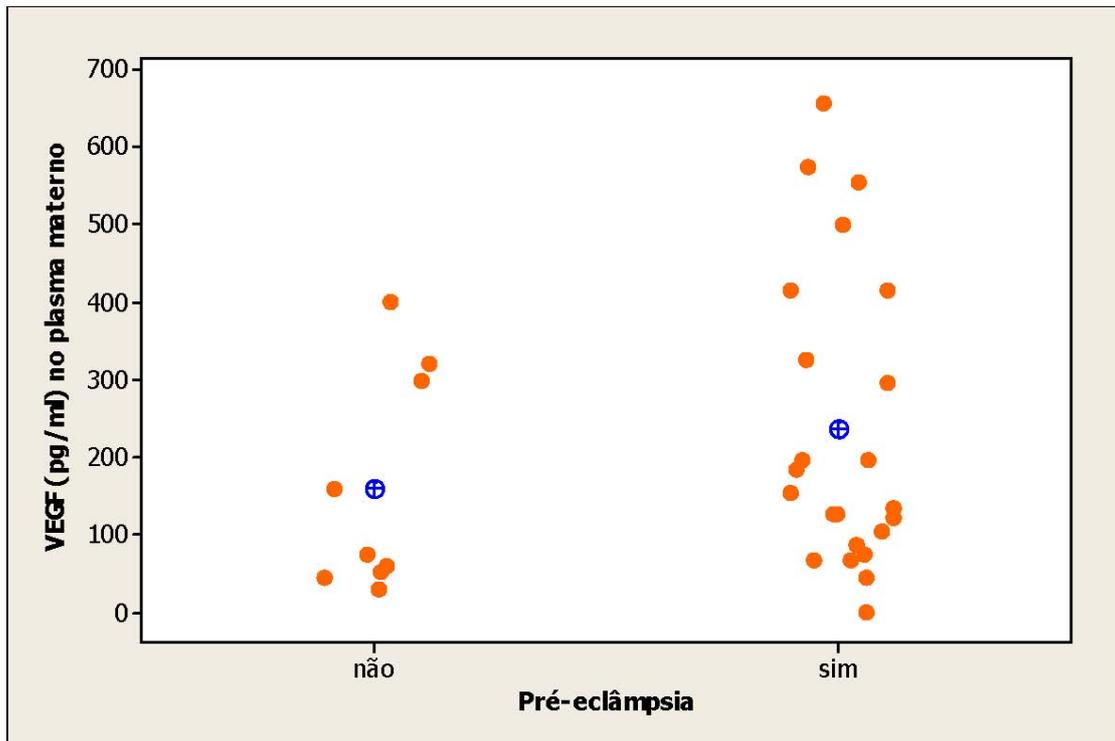


GRÁFICO 1 - Representação individual do VEGF (pg/ml) nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia e nas normotensas.

A concentração média do fator de crescimento endotelial não foi significativamente diferente no grupo de gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia e as normotensas, embora os níveis do VEGF tenham alcançado valores mais altos na pré-eclâmpsia.

TABELA 9 Características da concentração plasmática do VEGF nos grupos

estudados			
VEGF (pg/ml)	PRÉ-ECLÂMPسيا n= 23	CONTROLE n= 9	p
Media ± DP IC (- 206,38; 54,48)	243,33 ± 193	160,65 ± 143	0,238
Mediana	155,99	74,97	0,187
Q1	96,96	48,74	-
Q3	416	310,20	-
Valor máximo	659,00	402,64	-
Valor mínimo	0	29,99	-

Dp = desvio-padrão.

O resultado da média, mediana, o primeiro e terceiro quartis nas gestantes com pré-eclâmpsia e nas normotensas, bem como a significância da diferença da variável VEGF entre os grupos, estão representados na TAB. 9.

As concentrações séricas do fator de crescimento vascular endotelial foram analisadas em relação à pressão arterial média (PAM).

A análise de regressão mostra a relação entre a concentração de VEGF no plasma das gestantes com pré-eclâmpsia e os níveis da pressão arterial média (PAM). A probabilidade de haver relação entre essas variáveis é muito baixa, em

torno de 1,8% (GRÁF. 2).

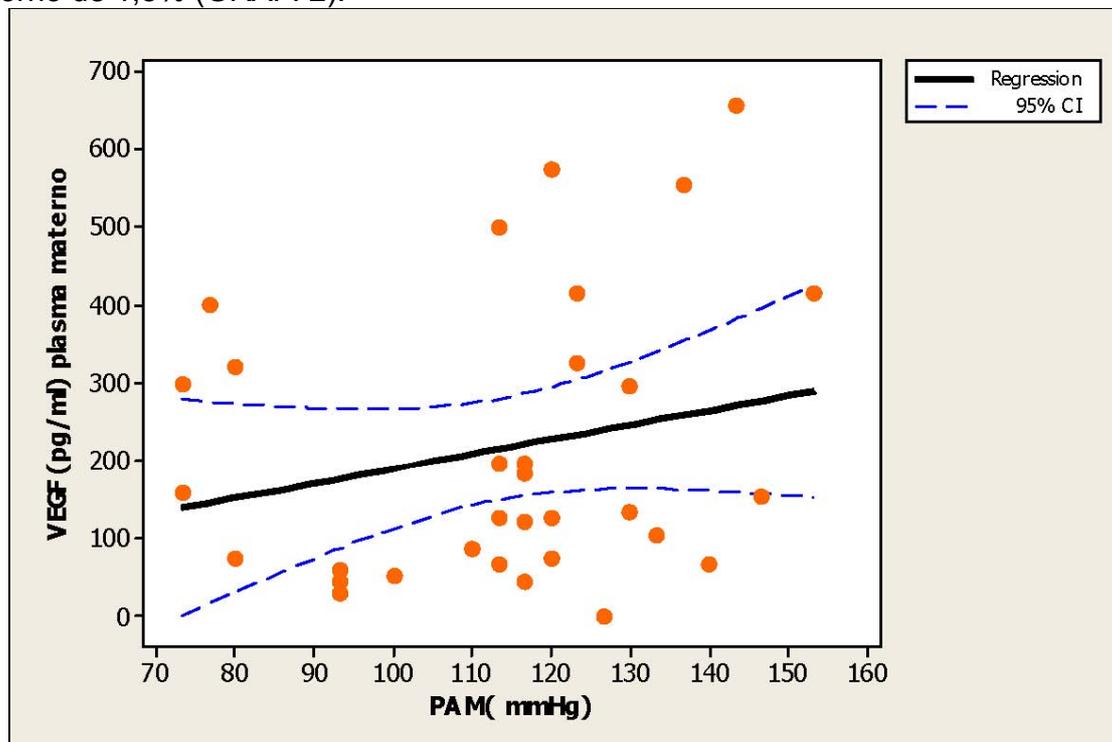


GRÁFICO 2 - Regressão do VEGF em relação à pressão arterial média (PAM) no grupo de estudo.

Equação da regressão: $\text{VEGF pg/ml} = 2,3 \pm 1,872 \text{ PAM}$.

S - 179,64

R - sq -5,0%

R - sq (adj) -1,8%

P = 0,219

5.5 Fator de crescimento placentário (PIGF)

As concentrações no plasma materno dos níveis do marcador de angiogênese PIGF foram dosadas entre as gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia e entre as normotensas.

O GRAF. 3 representa a concentração média do PIGF no grupo geral do estudo,

nas gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia e nas gestantes normotensas.

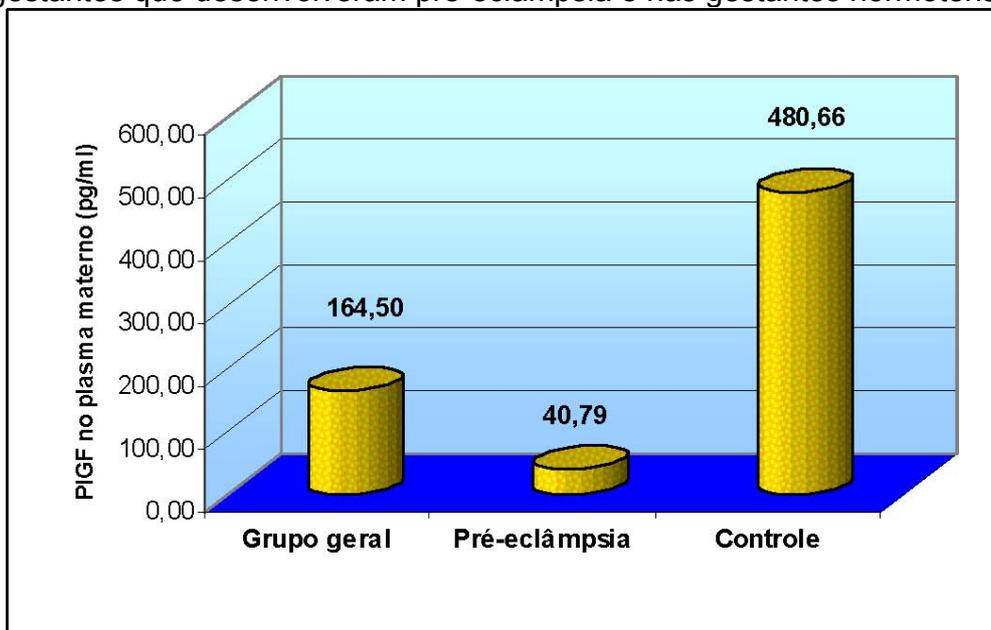


GRÁFICO 3 – Representação da distribuição das concentrações média do PIGF (pg/ml) nos grupos estudados.

O GRÁF. 4 mostra a distribuição dos níveis de PIGF nos grupos das gestantes com pré-eclâmpsia e nas normotensas. Os intervalos interquartílicos estão representados nas caixas do gráfico, bem como a média, a mediana, o valor máximo e o mínimo. Detalhes numéricos na TAB. 10.

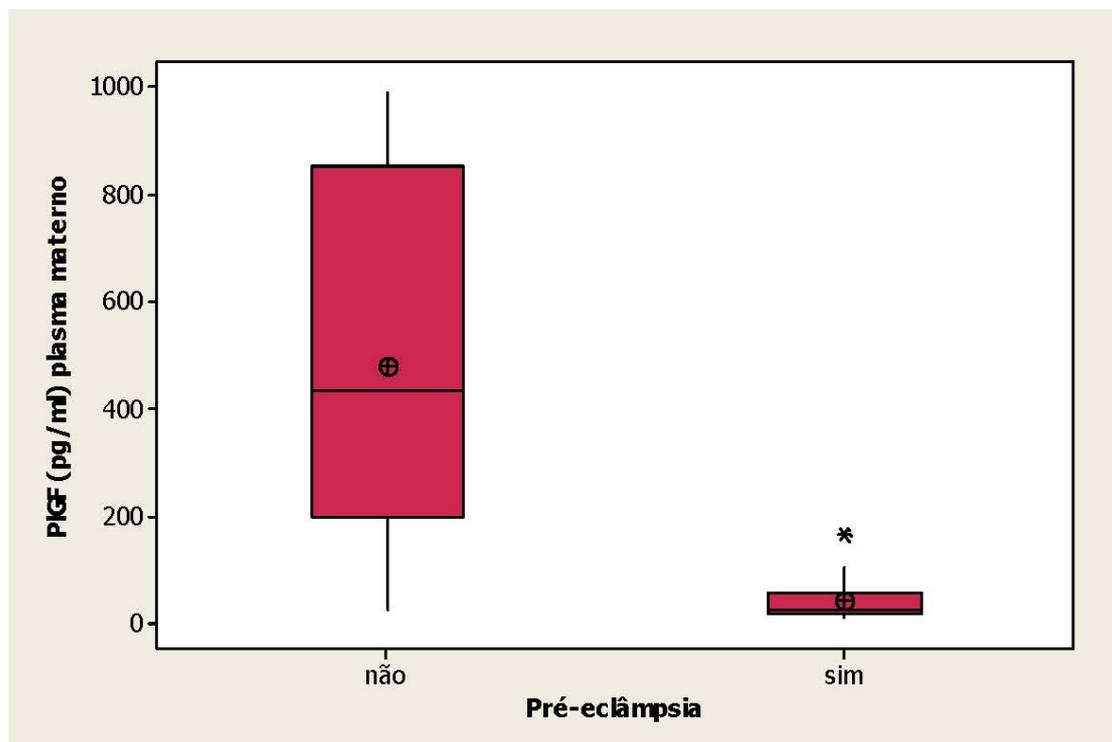


GRÁFICO 4 - Representação por caixas do PIGF (pg/ml) nas gestantes que apresentaram pré-eclâmpsia e nas normotensas.

O ponto externo no grupo das gestantes com pré-eclâmpsia representa uma grávida que desenvolveu a forma leve da síndrome com 36 semanas de gestação e não necessitou de terapia para tratamento de sinais e/ou sintomas. Embora o nível de PIGF, nesse caso, fosse o maior no grupo da pré-eclâmpsia (PIGF= 165,65pg/ml), não atingiu o nível inferior do intervalo interquartilico (Q1) do grupo das normotensas.

A concentração sérica dos níveis de PIGF está diminuída no grupo das gestantes

que apresentaram pré-eclâmpsia em relação às normotensas e essa diferença é estatisticamente significativa ($p=0,005$).

TABELA 10 Características da concentração plasmática do PIGF nos grupos estudados PIGF (pg/ml)	PRÉ-ECLÂMPسيا n= 23	CONTROLE n= 9	p
Media ± DP			
IC (172,39; 707,343)	40,80 ± 37,50	480,65 ± 347	0,005
Mediana	25,9	432,2	0,002
Q1	17,6	196,7	-
Q3	56,9	854,5	-
Valor máximo	165,65	989,00	-
Valor mínimo	10,60	25,90	-

A concentração média do fator de crescimento placentário no plasma materno foi avaliada em relação aos níveis da pressão arterial média (PAM), no grupo de estudo.

A curva de regressão mostra a relação entre a concentração de PIGF no sangue das gestantes com pré-eclâmpsia e o nível da pressão arterial média (PAM).

A equação da regressão informa que para cada queda de 1pg/ml na concentração do PIGF houve aumento correspondente de 6,58mmHg na pressão arterial média (PAM). A probabilidade dessa correlação inversa entre as variáveis, concentração

fisiopatologia dessa síndrome e da possível relação com essas substâncias. Na pré-eclâmpsia existem dois momentos cruciais relacionados com o sistema endotelial: o que se refere às alterações no leito placentário, seguido mais tarde de alterações vasculares generalizadas no organismo materno. Os fatores de angiogênese estão envolvidos nesses dois momentos, com contribuição provavelmente direta do VEGF e PlGF (BROCKESBY *et al.*, 2000; CHAIWORAPONGA *et al.*, 2003; SHARON *et al.*, 2003).

A presença de hipertensão e proteinúria é o critério principal no diagnóstico da pré-eclâmpsia e pode ser atribuída à disfunção endotelial sistêmica (SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005). A vasoconstrição generalizada, a perda de proteína glomerular para o interstício, a endoteliose glomerular e o depósito de fibrina intravascular são reflexos do dano endotelial encontrado nessas gestantes (DEKKER; SIBAI, 1998; FERRIS, 1991). O endotélio lesado libera citocinas vasopressoras e inflamatórias e ativa o sistema de coagulação, com intensidade variável concordante com as várias formas clínicas apresentadas na pré-eclâmpsia (ROBERTS, 1999). O verdadeiro mecanismo do desenvolvimento dessa disfunção endotelial não está totalmente esclarecido, mas alguns estudos têm apontado os fatores de angiogênese produzidos pela placenta e lançadas na circulação materna como responsáveis por essa disfunção endotelial (CLARCK *et al.*, 1998; HAYMAN *et al.*, 1999). No entanto, o comportamento preciso dessa toxicidade está sob investigação e o presente estudo está inserido nesse contexto.

A placenta é um órgão formado basicamente por ramificação e alongamento de vasos sanguíneos e os fatores de crescimento, principalmente o VEGF/ PIGF e seus receptores, exercem função parácrina modulando e regulando essa vasculogênese e angiogênese, como mostram os estudos de Kingdom *et al.* (2000) e Shore *et al.* (1997).

O balanço equilibrado entre a ligação do VEGF e do PIGF ao receptor celular VEGFR-1 com ação promotora de angiogênese e ao receptor livre (sFlt-1), com ação inibidora, modula a angiogênese placentária (GEVA *et al.*, 2002; SHYBUYA; CLAESSION-WELSH, 2005; TAYLOR *et al.*, 2003).

Muitos estudos sobre angiogênese são experimentos laboratoriais, no entanto, o processo de placentação caracteriza-se pela intensa formação de uma rede vascular num curto período de tempo, com um balanço equilibrado entre inibidores e estimuladores de angiogênese. Compreender todos os mecanismos que controlam a angiogênese placentária e as alterações desse processo na pré-eclâmpsia pode contribuir também para outras áreas da Medicina que de alguma forma lidam com doenças angiogênicas (CARMELIET, 2003; WHEELER; ELCOCK; ANTHONY, 1995).

Antes mesmo da formação placentária, o VEGF e o PIGF são apontados como atuantes no processo da gravidez. O endométrio materno, anterior à implantação do blastocisto, mostra aumento no número de células *natural-killer*, caracterizando o processo de decidualização (LI *et al.*, 2000). Essas células influenciam na

invasão trofoblástica necessária à queda da resistência vascular no leito placentário materno que ocorre durante o desenvolvimento de gestação normal (REGNAULT *et al.*, 2002). Os estudos de Moffett-King em 2002 mostraram que as células *natural-killer* desaparecem quando se completa a invasão do trofoblasto. Essas células produzem as principais citocinas implicadas na angiogênese e na estabilidade vascular: VEGF, PlGF e angiopoetinas.

LASH *et al.* (1999) demonstraram com tecido placentário que na presença de VEGF as células do trofoblasto exibem movimento de migração e invasão.

Na placenta de gestantes com pré-eclâmpsia há desequilíbrio na produção (KUMAZAKI *et al.*, 2002) dos reguladores de angiogênese, provavelmente em resposta à baixa concentração de oxigênio local no espaço interviloso (AHMED *et al.*, 2000; KINGDOM *et al.*, 2000), decorrente da ausência de uma segunda onda de invasão trofoblástica nas arteríolas espiraladas (PIJNEBORG *et al.*, 1983; REGNALT, 2002). Em consequência, há aumento do receptor livre no espaço interviloso, cuja função antagonista bloqueia a ação endotelial ao VEGF e PlGF (KOGA *et al.*, 2003).

Os reguladores da angiogênese placentária estão presentes no sangue materno, como demonstram vários estudos na última década. O VEGF já pode ser detectado no plasma materno na sexta semana de gravidez, com pico de concentração no final do primeiro trimestre (EVANS *et al.*, 1998). Uma vez na

circulação materna, atuam no endotélio vascular e esclarecem os achados da baixa reatividade vascular sistêmica encontrada durante a gravidez e que foi, nas décadas passadas, objeto de estudos em práticas anestésicas (ROBERTS *et al.*, 1989) e em teste clínicos de reatividade à angiotensina II e *roll-over test* (DEKKER; SIBAI, 1991; SIBAI; DEKKER; KUPLERMINC, 2005).

Outra evidência desses fatores angiogênicos no sangue materno e atuando no endotélio são os experimentos com biópsia de leito vascular subcutâneo, que mostram reatividade vascular aumentada na pré-eclâmpsia diante de fatores de angiogênese. Células endoteliais de biópsia vascular mostram atividade mitogênica na presença de soro de gestantes com pré-eclâmpsia (BROCKELSBY *et al.*, 2000).

Os recentes estudos em angiogênese na pré-eclâmpsia vêm apontando a ligação do VEGF e PlGF ao receptor livre do VEGF, presente em maior quantidade no sangue dessas gestantes em relação às normotensas, como antagonista da ação desses fatores angiogênicos (ZHOU *et al.*, 2002). As baixas concentrações da forma livre do VEGF e do PlGF encontradas no sangue das gestantes com pré-eclâmpsia, como relatam alguns estudos, podem ser explicadas pela ligação a essa glicoproteína (CHAIWORAPONGSA *et al.*, 2003; KOGA *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 2004; POWERS *et al.*, 2004; STAFF; BRAEKKE; HARSEM, 2005; TSATSARIS *et al.*, 2003).

O bloqueio da ação do VEGF pelo receptor livre tem sido apontado na

fisiopatologia da pré-eclâmpsia em estudos em modelos animal. Conforme Sharon *et al.* (2003), a administração desse antiVEGF em animais, fora da gestação, resultou em hipertensão e proteinúria. A administração isolada do receptor solúvel do VEGF (s-Ftl-1) em animais, durante a prenhez, reproduziu os achados de hipertensão sustentável e proteinúria, inclusive com endoteliose glomerular, achado patognomônico da pré-eclâmpsia.

Portanto, há fortes indícios de que a concentração aumentada do receptor solúvel na corrente sanguínea materna causa disfunção endotelial sistêmica encontrada nessas gestantes que desenvolvem pré-eclâmpsia (KOGA *et al.*, 2003; LEVINE *et al.*, 2004; POWER *et al.*, 2004; SHARON *et al.*, 2003, STAFF; BRAEKKE; HARSEM, 2005; TSATSARIS *et al.*, 2003).

Os marcadores VEGF e seu homólogo PlGF foram escolhidos para este estudo comparativo entre as gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas, pela sua estreita relação com a angiogênese placentária, entre as outras substâncias descritas com ação angiogênica (FOLKMAN; SHING, 1992).

As gestantes selecionadas para ingresso no estudo tanto do grupo da pré-eclâmpsia quanto do controle obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão que garantiram a qualidade sem interferir na evolução normal dos casos clínicos. As recomendações éticas com concordância verbal e escrita foram cumpridas e a coleta de sangue seguiu as rotinas rigorosas de anti-sepsia, não acarretando

riscos adicionais à gestante e seu concepto.

As gestantes com pré-eclâmpsia originaram-se da demanda espontânea do Ambulatório de Alto Risco do Hospital das Clínicas da UFMG e referenciadas da comunidade, pelo fato de a Maternidade ser centro de referência em alto risco obstétrico. As gestantes normotensas originaram-se da mesma fonte.

A análise comparativa entre as variáveis que caracterizam as gestantes com pré-eclâmpsia e normotensas, como idade materna, idade gestacional, paridade e níveis de hemoglobina, não mostraram diferença significativa entre os dois grupos. Portanto, essas variáveis provavelmente não influenciaram os resultados encontrados nos níveis séricos dos fatores de angiogênese.

A maioria das gestantes estava grávida pela primeira vez ou não apresentava fatores de risco da doença. Foram classificadas como forma grave 56% das gestantes com pré-eclâmpsia, sendo a PAM ≥ 126 mmHg o evento mais freqüente.

Outro aspecto que merece ser discutido refere-se à metodologia de coleta, armazenamento e dosagem dos fatores de angiogênese. Todas as etapas foram padronizadas segundo os trabalhos consultados na literatura e a orientação do Laboratório de Angiogênese e da Medicina Fetal, que tem vasta experiência com marcadores séricos na pré-eclâmpsia. Os fatores de angiogênese são dosados de rotina em estudos experimentais no Laboratório de Angiogênese do ICB.

A escolha da técnica de dosagem por ensaio de ELISA foi baseada também na experiência do Laboratório de Angiogênese com essa técnica e na possibilidade de comparabilidade dos resultados do presente estudo com as mais recentes pesquisas sobre angiogênese na pré-eclâmpsia. Os *kits* (R&D Systems) usados nesses ensaios têm alta sensibilidade em detectar a forma livre dos fatores de angiogênese.

Em relação aos presentes resultados, encontrou-se diferença significativa na concentração plasmática do fator de crescimento placentário nas gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas. A concentração plasmática do PIGF estava significativamente diminuída nas gestantes com pré-eclâmpsia.

Estes resultados estão de acordo com os achados de Livingston *et al.* (2000) e Lyall, Greer e Fleming (1997), que encontraram os níveis de PIGF diminuídos nas gestantes com pré-eclâmpsia. Segundo Livingston *et al.* (2000), essa diminuição poderia ser devida à produção diminuída pela placenta ou perda renal; para Lyall, Greer e Fleming (1997), deve-se à ligação ao receptor livre do VEGF aumentado no plasma das gestantes com pré-eclâmpsia.

A relação entre a concentração dos níveis plasmáticos do PIGF e a pressão arterial média mostrou valores ascendentes da pressão arterial que variaram de níveis normais a patogênicos em relação inversamente proporcional à concentração do PIGF. As pacientes do grupo estão representadas por pontos no

gráfico e se distribuem de forma diferente conforme os valores da pressão arterial e níveis de PIGF. Quanto mais alta a pressão arterial, mais baixos foram os níveis plasmáticos do PIGF.

No entanto, nesse grupo de pacientes não houve diferença na concentração do VEGF nas gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas e nem relação com os níveis pressóricos individuais.

Os estudos iniciais sobre os marcadores de angiogênese na pré-eclâmpsia mostraram resultados conflitantes. Baker *et al.* (1995) e depois Hunter *et al.* (2000) encontraram concentração plasmática de VEGF e PIGF aumentada nas gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas. Livingston *et al.* (2000) encontraram resultado diferente, com redução nos níveis séricos de VEGF e PIGF, pelo método de radioimunoensaio nas gestantes com pré-eclâmpsia. Na análise de regressão logística verificaram também independência de associação entre a concentração do VEGF e do PIGF.

Lyall, Greer e Fleming (1997) observaram níveis séricos mais elevados do VEGF em mulheres não grávidas do que nas grávidas. No seu estudo, o VEGF foi dosado pela técnica de captura de anticorpos por ELISA e o nível sérico elevado do VEGF fora da gravidez não pôde ser explicado pela variação no ciclo menstrual dessas mulheres (fase lútea ou proliferativa) nem por outras variáveis. Inferiu-se, então, que os marcadores VEGF e PIGF poderiam estar ligados a proteínas plasmáticas no período da gravidez, porque essa “aparente ausência” de VEGF no

sangue das gestantes não condizia com a intensa angiogênese que ocorre no trofoblasto, na placenta e na embriogênese.

Anthony *et al.* (1997) estudaram as possíveis influências dos métodos de dosagens dos níveis do VEGF e a ligação às proteínas no sangue materno e demonstraram, em dois diferentes ensaios, pela técnica de ELISA e radioimunoensaio, resultados conflitantes na concentração do VEGF no sangue materno na pré-eclâmpsia. Concluíram, então, que pela técnica de ELISA poderia haver influência das proteínas séricas.

Outro fato a ser considerado é a profunda distribuição do VEGF nos órgãos e tecidos em relação ao PlGF, que está restrito ao tecido placentário, células do coriocarcinoma e culturas de células endoteliais (WELCH *et al.*, 2006).

Aparentemente, não houve influência de quadros infecciosos durante o pré-natal na concentração dos fatores de angiogênese nos dois grupos estudados (APÊNDICE B). Portanto, não se conseguiu encontrar, neste estudo em especial, uma variável ou relação direta que explicasse o comportamento da concentração do VEGF nessas pacientes. Ressalte-se também que os ensaios dos dois marcadores de angiogênese foram feitos de forma padronizada, nas mesmas amostras de plasma e no mesmo período de tempo.

Livington *et al.* (2000) registraram concentração sérica diminuída de VEGF nas

gestantes que desenvolveram pré-eclâmpsia, mas no grupo de gestantes onde houve mais danos endoteliais (HELLP síndrome e eclâmpsia), a concentração do VEGF não foi detectada e esse achado não pôde ser explicado no seu estudo.

A presente pesquisa iniciou uma série de investigações a respeito dos marcadores de angiogênese nas gestações humanas em nossa instituição e uma delas se refere ao comportamento do VEGF e do PIGF nas nossas paciente. Há grandes perspectivas quanto a novas investigações para esclarecimento do comportamento dos fatores de angiogênese na pré-eclâmpsia.

A motivação para continuar nessa linha de pesquisa se dá pelo fato desses marcadores refletirem diretamente os dois momentos relacionados à fisiopatologia da pré-eclâmpsia - as alterações placentárias e o dano endotelial - e da possibilidade de detecção no plasma materno por técnicas simples, como o ensaio de ELISA. A busca por preditores de pré-eclâmpsia para uso clínico no pré-natal e seleção de pacientes candidatas à profilaxia atual da pré-eclâmpsia tem sido objeto de muitos estudos. Os fatores de angiogênese são promissores nesse aspecto e também como marcadores da forma grave. Há grandes perspectivas futuras no seu emprego terapêutico na pré-eclâmpsia, considerandose já ser realidade a adoção terapêutica dos inibidores da angiogênese na oncologia (FOLKMAN, 2006).

7 CONCLUSÕES

- . • A concentração plasmática do fator de crescimento placentário está diminuída nas gestantes com pré-eclâmpsia em relação às gestantes normotensas.
- . • Em relação à pressão arterial média, houve correlação inversa com o nível plasmático do PIGF. Quanto mais baixos os níveis plasmáticos do PIGF, mais altos foram os valores da PAM.
- . • A concentração plasmática do fator de crescimento endotelial (VEGF) não foi diferente no grupo das gestantes com pré-eclâmpsia em relação às normotensas e não houve correlação com os níveis da PAM.
- . • Este estudo confirma e amplia dados da literatura mostrando a participação do fator de crescimento placentário como potencial marcador determinante do aumento da pressão arterial média na pré-eclâmpsia.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, M.F.; HARRINGTON, K.F. Prediction and prevention of preeclampsia and IUGR. **Early Human Development**, Amsterdam, v.81, p.865-76, September, 2005.

AHMED, A.; KILBY, M.B. Hypoxia or hyperoxia in placental insufficiency? **Lancet** , London, 350 (9081): 826-827, September, 1997.

AHMED, A. *et al.* Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen. **Placenta**, London, v. 21, Supp A, n.14, s16-24, Marc-Apr, 2000.

ALMEIDA, K.R. *et al.* **Abordagem interdisciplinar do pré-natal e puerpério**, Monografia (Biblioteca da Faculdade de Medicina). p.1- 35. Belo Horizonte, 2003.

AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Diagnosis and management of pré-eclâmpsia and eclâmpsia. ACOG practice Bulletin nº: 33. **Int J Gynaecol Obstet** , New York, v.77: p.67-75, Washington, 2002.

ANTHONY, F. *et al.* Variation in detection of serum by immunoassay and the possible influence of binding proteins. **Ann Clin Biochem**; London, v.34: p.276-280, May, 1997.

BAIRD, A.; KLAGSBRUN, M. (1991) The Fibroblast Growth Factor family. **Cancer cells**, New York, v.3(6): p.239-243, june

BAKER, N.P. *et al.* Elevated Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients With Preeclampsia. **Obstet Gynecol**, New York, v.86, n.5: p.815-821, November, 1995.

BANKS, R.E. *et al.* Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor, sFlt-1. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v. 4, n. 4: p. 377-386, February, 1998.

BATES, D.O.; HARPER, S.J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors **Vascular Pharmacology**, Bristol, v.39:p.225-237, Issues 4-5, November, 2002.

BARTHA, J.L. *et al.* Human chorionic gonadotropin and vascular endothelial growth factor in normal and complicated pregnancies. **Obstetr Gynecol**, New York, v.102, n.5: p. 995-99, November, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde -**Mortalidade maternal**. 2000. (On-line) Available: <http://www.saude.gov.br> (Set.29, 2006).

BELGORE, F.M.; LIP, G.Y; BLANN, A.D. Vascular endothelial Growth Factor and its receptor, Flt-1, in smokers and non-smokers. **Br J Biomed Sci**, London, v.57: p.207-213, 2000.

BOBIK, A.; CAMPBELL, J. Vascular derived growth factor: cell biology, pathophysiology and pharmacology. **Am Soc Pharm Therap**, Bethesda, v.45, n.1: p.1-42, 1993.

BREIER, G. Angiogenesis in Embryonic Development – A Review. **Placenta**, London, v 21, Supplement A, Trophoblast Research, v.14: p.11-15, December, 2000.

BROCKELSBY, J. *et al.* The effects of vascular endothelial growth factor on endothelial cells: A potential role in preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, Saint Louis, v.182, n.1: p.176-183, July, 2000.

CABRAL, A.C.V.; SILVA PEREIRA, T.F. Pressão arterial média no segundo trimestre e o prognóstico da gestação de hipertensas. **J Br Ginecol**, São Paulo, v.94: p. 389-390, 1984.

CABRAL, A.C.V. **Intercorrências clínicas**: doenças hipertensivas. Obstetrícia. p.363-378, Coopmed [Belo Horizonte], 1998.

CARMIELIET, P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele **Nature**, London, v.380: p.435-439, April, 1996.

CARMIELIET, P. Angiogenesis in Health and Disease. **Nat Med**, New York, v. 9, n.6: p.653-660, June, 2003.

CHAIWORAPONGSA, T. *et al.* Evidence supporting a role for the vascular endothelial growth factor in the pathophysiology of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, Saint Louis, v.190:p. 1541-50, October, 2003.

CHARNOK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEN, T.M. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular Regulation. **Placenta**, London, v. 00, p. 1-11, October, 2003.

CHESLEY, L.C. History and epidemiology of pre-eclampsia - eclampsia. **Clin Obstet Gynecol**, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. 801-20, December, 1984.

CLARK, D.E. *et al.* A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the placenta and released into the maternal circulation. **Biol Reprod**; Madison, v.59:p.1540-48, 1998.

CONNOLLY, D.T. *et al.* Human vascular permeability factor: isolations from U937 Cells. **J Biol Chem**, Baltimore, v.264: p.20017-20024, November, 1989.

D'AMORE, P.A.; THOMPSON, R.N. Mechanism of angiogenesis **Ann Rev Physiol**, Palo-Alto, v.49: p.453-464, 1987.

DAVID, M. *et al.* Can antenatal clinical and biochemical markers predict the development of severe preeclampsia? **Am J Obstet Gynecol**, Saint Louis, v. 182, n.3: p. 589-93, October, 2000.

DEKKER, G.A, SIBAI, B.M. Early detection of preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v. 65, n.1, p.160-72, July, 1991.

DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M. Etiology and pathogenesis of preeclampsia: Current concepts. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v.179, n. 5: p. 1359-1375, Nov., 1998.

DEKKER, G.A.; SIBAI, B.M. Primary, secondary, and tertiary prevention of preeclampsia. **The Lancet**, London, v. 357, n. 20, p. 209-15, January, 2001.

DUCKITT, K.; HARRINGTON, D. Risk factor for pre-eclampsia at antenatal booking: Systematic review of controlled studies. **BMJ**, London, p.1-7, March, 2005.

DVORAK, H.F. *et al.* Vascular Permeability Factor/ Vascular Endothelial Factor, Microvascular Hyperpermeability, and Angiogenesis. **Am J Pathol**, Galveston, v.146, n.5: p.1029-1039, May, 1995.

DVORAK, H.F. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy **J Clin Oncol**, Toronto, v. 20: p.4368-4380, Issue (21) November, 2002.

EVANS, P.W. *et al.* A longitudinal study of maternal serum vascular endothelial growth factor in early pregnancy **Hum Reprod**, Oxford, v.13:p. 1057-62, 1998.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor **J Mol Med**, Berlin, v. 77: p. 527-543, July, 1999.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis **Recent Prog Horm Res**, California, USA, v. 55: p.15-36, 2000.

FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LECOUNTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, New York, v.9, n.6: p.660-676, June, 2003.

FERRIS, T.F. Preeclampsia, and the endothelial cell. **The New Eng J Med**, Seattle, v.325, n.20: p.1439-1442, November, 1991.

FIEDLER, F. *et al.* VEGF-A and PLGF-1 Stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. **Bioch Bioph Res Com**, Germany, v.334: p.561-568, July, 2005.

FLAMME, T.F.; FROLICH, T.; RISAU, W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. **J Cell Physiol**, Philadelphia, v.173: p. 206-210,1997.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**, Baltimore, v.267, n.16: p.10931-10934, June, 1992.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat Med**, New York, v. 1, n.1: p. 27-31, December, 1995.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annu Rev Med**, Palo-Alto, v.57: p.1-18, june, 2006.

FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. Belo Horizonte: UFMG, 7ed, 2004, p.241.

GENBACEVO, O. *et al.* Regulation of human placental development by oxygen tension. **Science**, Washington, v.277:p.1669-1672, 1995.

GEVA, E. *et al.* Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (Branching and Nonbranching) transformation Is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v.87, n.9: p.4213-4224, September, 2002.

HARLOW, F.H.; BROWN, M.A. The diversity of diagnoses of preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, Los Angeles, v.20:p.57-67, 2001.

HAYES, A.J. *et al.* Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. **Microvasc Res**, New York, v.58:p.224-237, February 1999.

HAYMAN, R. *et al.* Preeclampsia: The Endothelium, Circulating Factor(s) and Vascular Endothelial Growth Factor. **J Soc Gynecol Invest**, New York, v.6, n.1: p.1-10, February, 1999.

HELSKE, S. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2,

and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v. 7, n. 2: p. 205-10, February, 2001.

HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. **J Clin Oncol**, Toronto, v.23, n.5: p.1011-1027, February, 2005.

HUNTER, A. *et al.* Serum level of vascular endothelial growth factor in preeclamptic and normotensive pregnancy. **Hypertension**, Dallas, v. 36, p. 965-69, December, 2000.

HYDER, S.M.; STANCEL, G.M. Regulation of Angiogenic Growth Factors in Female Reproductive Tract by Estrogens and Progestins. **Mol Endocrinol**, Washington, v.13, n.6: p.806-811, August, 1999.

IRUELA-ARISPE, M.L.; DVORAK, F.H. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. **Thrombosis and Haemostasis**, Boston, v.78, n.1: p.672-77, July, 1997.

JAFFER, R.B. Importance of angiogenesis in reproductive physiology. **Semin Perinatol**, London, v. 24 n.1: p.79-81, February, 2000.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A.; BURTON, G. Evaluation of respiratory gases and acid-base gradients in human fetal fluids and uteroplacental tissue between 7 and 16 weeks gestational **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v.184: p.998-1003, April, 2001.

KAUFMANN, P.; BLACK, S.; HUPPERTZ, B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardations and pré-eclâmpsia. **Biol Reprod**, Madison, v.69: p,1-7, March, 2003.

KINGDOM, J.C; KAUFMANN, P. Oxygen and placental villous development: origins fetal hypoxia **Placenta**, London, v.18, p.613-621, Issue 8, November, 1997.

KINGDOM, J.C. *et al.* Development of placental villous tree and its consequences for fetal growth. **Eur J Obst Gynecol**, Limerick, v. 92: p.35-43, Sept, 2000.

KOGA, K. *et al.* Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) level in women with preeclampsia. **J Clin End Met**, Philadelphia, v. 88, n.5: p. 2348-351, May, 2003.

KUMAZAKI, K. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 33, n.11: p.1069-77, November, 2002.

LASH G.E. *et al.* The effects of angiogenic growth factor on extravillous trophoblast invasion and motility. **Placenta**, London, v.21:p.593-595, November, 1999.

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

LI, F.X. *et al.* Angiogenic Growth Factor Messenger Ribonucleic Acids in Uterine Natural Killer Cells. **J Clin Endoc Metabol**, Philadelphia, v.86, n.4: p.1823-1834, December, 2000.

LI, H. *et al.* Hypoxia-induced increase soluble production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. **Placenta**, London, v.26: p. 210-217, May, 2005.

LIVINGSTON, J.C. *et al.* Reductions of vascular endothelial growth factor and placental growth factor concentrations in severe preeclampsia. , v. 183, n. 6, p. 1554- **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, 557, December, 2000.

LÓPEZ, M. Pressão Arterial. *In*: LÓPEZ, M.; LAURENTYS-MEDEIROS, J. **Semiologia médica: as bases do diagnóstico clínico**. 5ed., Rio de Janeiro: Revinter, p.278-285, 2004.

LYALL, F.; GREER, L.A.; FLEMING, R. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immunoreactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, v.104: p. 223-28, February, 1997.

MALY, A. *et al.* Histomorphometric study of placental villi vascular volume in toxemia and diabetes. **Human Pathology**, Philadelphia, v.36: p. 1074-1079, July, 2005.

MATSUBARA, K. *et al.* Lymphokine-activated killer cells induced from decidual lymphocytes reduce the angiogenic activity of trophoblasts by enhancing the release of soluble fms-like tyrosine Kinase-1 from trophoblasts: An implication for the pathophysiology of preeclampsia. **J Reprod Immunol**, Galveston, v 68: p. 27-37, July, 2005.

MAYHEW, M.T. *et al.* Morphometric evidence that villous development and fetoplacental angiogenesis are compromised by intrauterine growth restriction but not by pre-eclampsia. **Placenta**, London, v. 25: p. 829-833, April, 2004.

MOFFETT-KING Natural Killer cells and pregnancy **Nat Rev Immunol**, London, v.2,p.656-663, September, 2002.

MOLINA, R.D.; MESCHIA, G.; WILKENING, R.B. Uterine blood flow, oxygen and glucose uptakes at mid-gestation in sheep, experimental biology and medicine-proceedings. **Society for Experiment Biology and Medicine**, Washington v.195:p.379-385, 1990.

NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION WORKING GROUP ON HIGH BLOOD PRESSURE IN PREGNANCY. Report of the national High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in

Pregnancy. v. 1 **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v.83, n.1: p.1689-1712, July, 2000.

ONG, S; LASH, G; BAKER, PN. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies **Clin Obstet Gynaecol**, Philadelphia, v.14, n.6: p. 969-980, December, 2000.

PELED, Z.M.; CHIN, G.S.; LIU, W. Response to tissue injury **Clin Plast Surg**, USA, v. 27, n. 4: p. 489-500, October, 2000.

PIJNENBORG, R. *et al.* Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early pregnancy **Placenta**, London, v.4:p.397-413, Oct-Dec, 1983.

PIRES DO RIO, S.M. **Caracterização clínica da pré-eclampsia e as alterações ultra-estruturais do glomérulo renal**. Tese de Doutorado, Obstetrícia. Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, 2000.

POLLIOTTI, B.M. *et al.* Second-trimestre maternal serum placental growth factor vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. **Obstet Gynecol**, New York, v. 101, n.6: p. 1266-74, June, 2003.

POWERS, R.W. *et al.* Maternal serum soluble fms-like tyrosine kinase 1 concentrations are not increased in early pregnancy and decrease more slowly postpartum in women who develop preeclampsia. **Am J Obstet Gynecol**, Saint Louis, v.193: p.185-91, November, 2004.

RAJAKUMAR, A. *et al.* Evidence for the Funcional Activity of Hypoxia Factors Overexpressed in Preeclamptic Placentae. **Placenta**, London, v.11: p. 1-7, February, 2004.

REGNAULT, T.R. *et al.* Placental Development in Normal and Compromised Pregnancies. **Placenta**, London, v.23: p.119-129, November, 2002.

RISAU, W.; FLAMMER, I. Vasculogenesis. **Ann Rev Cell Dev Biol**, Germany v.11: p.73-91, January, 1995.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, London, v. 386: p.671-674, April, 1997.

ROBERTS, C.R.; WALKER, D.C.; SHELLENBERG. Extracellular matrix. **Clin Allergy Immunol**, Chicago, v.16: p.143-78, 2002.

ROBERTS, J.M. *et al.* Preeclampsia: an endothelial cell disorder. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v.161: p.1200-4, November, 1989.

ROBERTS, J.M. Pregnancy-related hypertension. *In*: CREASY, R.K.; RESNIK, R.

Maternal-Fetal Medicine. 4. ed. Philadelphia: Saunders, cap. 48: p.833-872. 1999.

ROBERTS, J.M; LAIN, K.Y. Recent insights into the pathogenesis of pré-eclâmpsia. **Placenta**, London, v.23: p.359-72, May, 2002.

SENGER, D.R.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, Washington, v. 219: p. 983- 985, February, 1983.

SHARON, E.M. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFLT1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **J Clin Invest**, Thorofare, v.111, n. 5: p. 649-658, March, 2003.

SHERER, D.M.; ABULAFIA, O. Angiogenesis during Implantation, and Placental and Early Embryonic Development. **Placenta**, London, v. 22, n.1: p. 1-13, January, 2001.

SHIBUYA, M.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp Cell Res**, Berlin, v. 312: p. 549-560, December, 2005.

SHORE, V.H. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor, Placenta Growth Factor and Their Receptor in Isolated Human Trofophoblast. **Placenta**, London, v. 18: p. 657-665, June, 1997.

SIBAI, B.M. Prevention of preeclampsia: a big disappointment. **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.179(5): p.1275-78, November, 1998.

SIBAI, B.M. Diagnosis and management of gestational hypertension and pré-eclâmpsia. **Obstet Gynecol**, New York, v.102: p.181-192, 2003.

SIBAI, B.M; DEKKER, G.A; KUPLERMINC, M. Pre-eclampsia. **Lancet**, London, v.365, n.26, p. 785-99, february, 2005.

STAFF, A.C.; BRAEKKE, K.; HARSEM, K.N. Circulating concentrations of sFLT-1 (soluble fms-like tyrosine kinase 1) in fetal and maternal serum during pre-eclampsia. **Eur J Obstet Gynecol**, Limerick, v.122: p.33-39, November, 2005.

STAMILIO, D.M *et al.* Can antenatal clinical and biochemical markers predict the development of a severe pré-eclâmpsia? **Am J Obstet Gynecol**, St. Louis, v.182, n.3 p.589-594,mar., 2000

SVEDAS, E. *et al.* Vascular endothelial growth factor induced functional and morphologic signs of endothelial dysfunction in isolated arteries from normal pregnant women **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v.188, n.1: p.168-176, January, 2003.

TAKAHASHI, T. *et al.* Ischemia-and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nat Med**, New York, v.5, n.4: p. 434-438, April, 1999.

TAYLOR, N.R. *et al.* Preeclamptic sera stimulate increased platelet-derived growth factor mRNA and protein expression by culture human endothelial cells. **Am J Reprod Immunol**, Osaka, v.25: p.105-8, 1991.

TAYLOR, N.R. *et al.* Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v. 188, n.1:p.177-82, July, 2003.

TOBELEM, G. Endothelial cell growth: biology and pharmacology in relation to angiogenesis. **Blood Coag Fibrinol**, Oslo, v.1: p.703-705, 1999.

TRANQUILLI, A.L *et al.* Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent pré-eclâmpsia. **Eur J Obstet Gynecol**, Limerick, v.113: p. 17-20, May, 2004.

TSATSARIS, V. *et al.* Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclampsia patients: pathophysiological consequences. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v. 88, n.11: p.5555-63, November, 2003.

VATTEN, L.J; SKJAERVEN, R. Is preeclampsia more than one disease? **BJOG**, Commonw, v.111: p.298-302, April, 2004.

VUORELA, P. *et al.* Amniotic Fluid-Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 in Preeclampsia. **Obstetric Gynecol**, New York, v.95, n.3: p.353-357, mar ,2000.

WELCH, P.C. *et al.* Correlations of placental perfusion and PIGF protein expression in early human pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v.194: p.1625-31, January, 2006.

WHEELER, T.; ELCOCK, C.L.; ANTHONY, F.W. Angiogenesis and Placental Environment. **Placenta**, London, v. 16 p. 289-296, December ,1995.

WOLF, M. *et al.* Circulating level of antiangiogenic marker sFlt-1 are increased in first versus second pregnancies. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, v. 193: p. 16-22, March, 2005.

ZACHARY, I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. **A J P Cell Physiology**, Pomona, Issue 6, v.280: p.1375-1386, June, 2001.

ZHOU, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor ligands and receptor that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. **Am J Pathol**,

Galveston, v.160, n.4: p. 1405-1423, January, 2002.

ZYGMUNT, M. *et al.* Characterization of human chorionic gonadotropin as novel angiogenic factor. **J Clin Endocrinol Metab**, Philadelphia, v. 87, n.11: p. 5290296, November, 2002.

ZYGMUNT, M. *et al.* Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. **Eur J Obst Gynecol Rep Biol**, Limerick, v.110, n. 1: p.10-18, September, 2003.

Site: [http:// www.gene.com](http://www.gene.com) -
30/10/2006.

APÊNDICES E ANEXO

APÊNDICE A – Termo de Consentimento APÊNDICE B

a) Nível sérico da hemoglobina materna

A anemia materna enquadra-se no modelo de hipóxia pré-placentária, onde a placenta se desenvolve em baixas concentrações de oxigênio e a estruturas dos vilos mostram intensa ramificação dos vasos. Os níveis séricos dos fatores de angiogênese VEGF e PlGF alteram-se em relação às gestantes com anemia (KINGDOM; KAUFMANN, 1997).

Neste estudo foi avaliada a presença de anemia materna na gravidez pela concentração de hemoglobina presente no sangue materno no momento de internação. Nenhuma gestante da amostra apresentou níveis de hemoglobina abaixo do considerado normal no período da gravidez.

O nível médio geral da hemoglobina no sangue materno encontrava-se acima de 12g/dl. figurão GRÁF. 6 mostra a média da hemoglobina no grupo geral, nos grupos da pré-eclâmpsia e no controle.

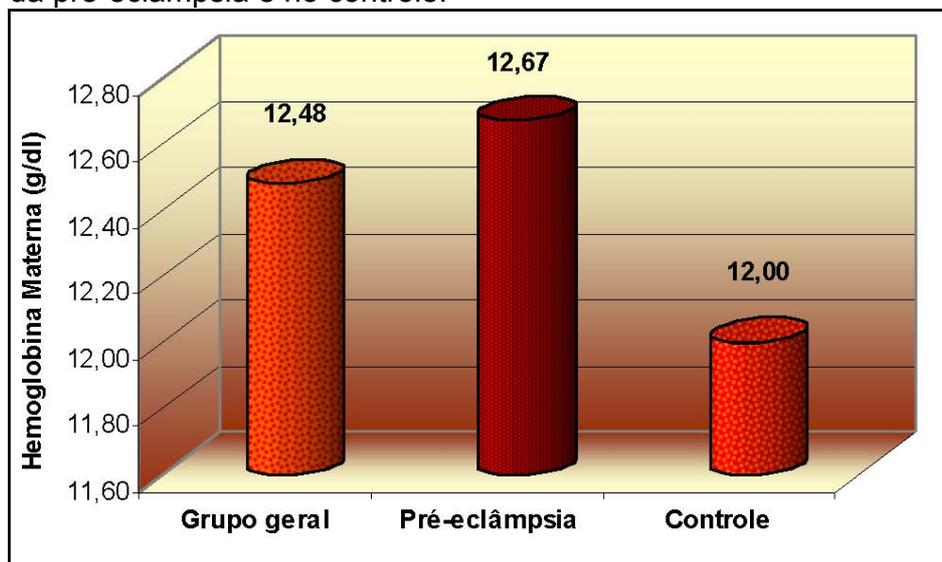


GRÁFICO 6 - Representação do nível médio da hemoglobina em g/dl nos grupos estudados.

TABELA 11 Características do nível de hemoglobina nos grupos estudados Hb						
Grupos	Valor mínimo	Valor máximo	Média ± DP	Mediana	Q1	Q3
Pré-eclâmpsia n = 23	11,1	15,2	12,67 ± 1,09	12,7	11,8	13,4
Controle n = 9	11,7	12,9	12,00 ± 0,53	11,9	11,6	12,5

$p=0,028$ IC = (-1,26; - 0,078).

Os intervalos interquartílicos Q1 e Q3 nos dois grupos estão representados na TAB. 9 e mostraram, pelos valores das médias e a medianas, distribuição simétrica dessa variável em torno das medidas de tendência central.

A análise comparativa da diferença entre os grupos em relação ao nível médio da hemoglobina relataram que as gestantes do grupo com pré-eclâmpsia apresentaram nível médio significativamente mais elevado de hemoglobina, consistente com a hemoconcentração esperada nesse grupo (TAB. 11)

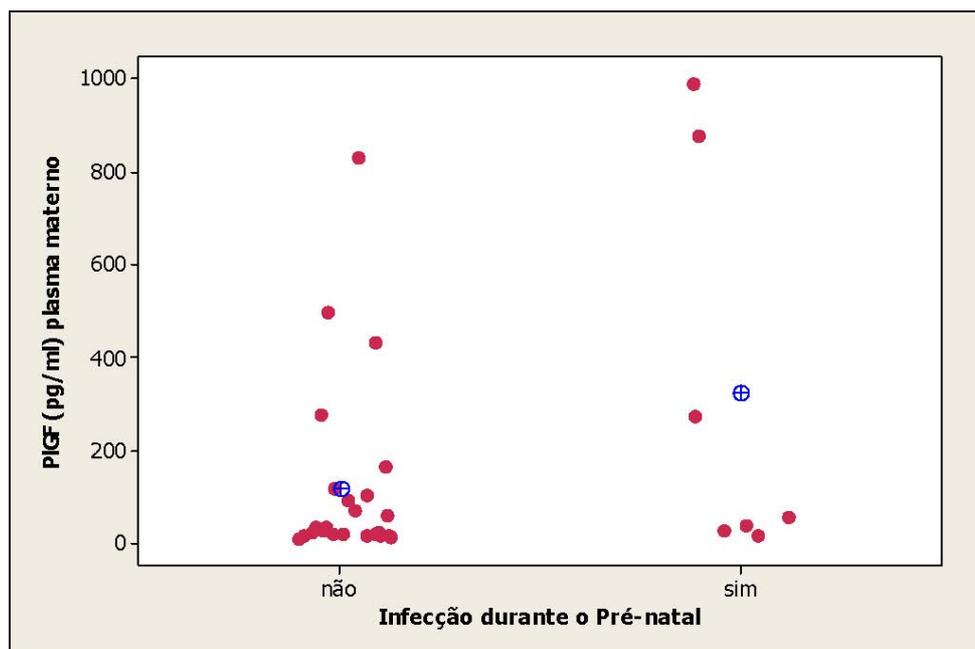
b) Infecções durante o pré-natal

A presença de infecções, como a do trato urinário e vaginose, foi pesquisada durante o pré-natal nas gestantes do grupo estudado, tendo em vista sua possível influência sobre os fatores de angiogênese.

Os GRÁF. 7 e 8 representam a distribuição individual das gestantes quanto à presença ou não de infecção durante o pré-natal e a relação entre os marcadores de angiogênese VEGF e PlGF.

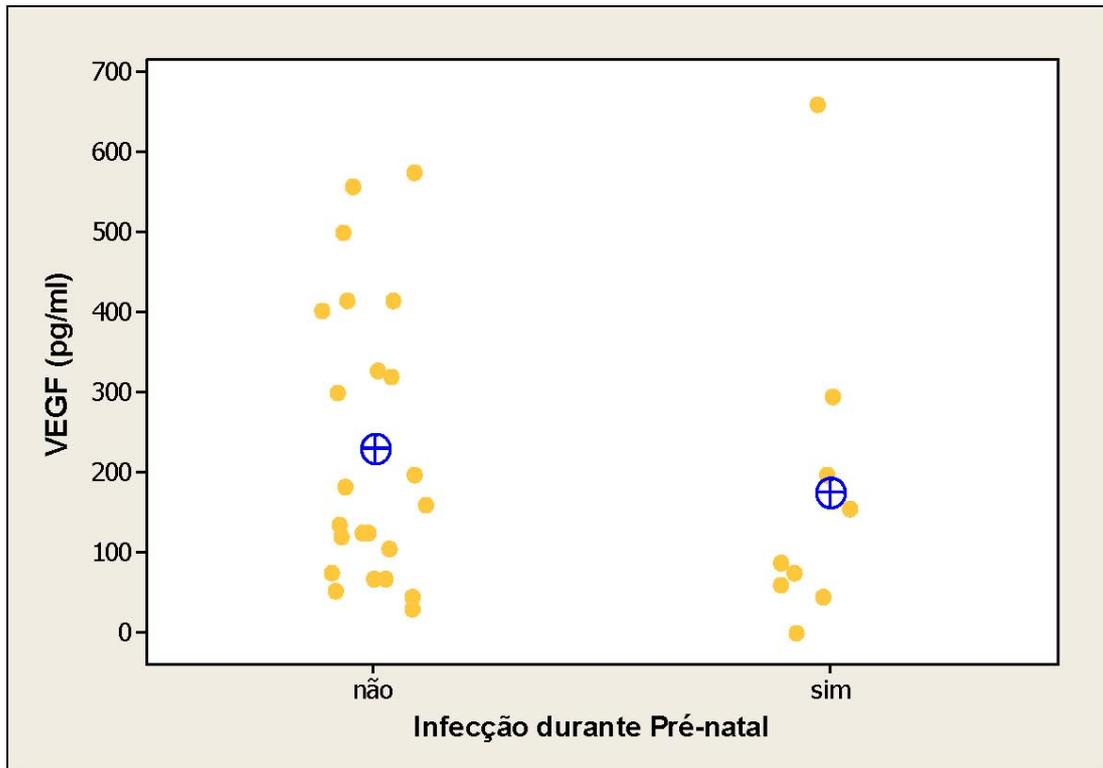
(pg/ml)		AUSENTE n= 23	PRESENTE n= 9	p
VEGF	Media ± DP IC (-111,68; 222,68)			
	Mediana	231 ± 175 160,00	175 ± 203 88,50	0,483 0,285
PIGF	Media ± DP	116 ± 190	289 ± 397	0,242
	Mediana	29,40	56,90	0,228

A análise dos dados não encontrou diferença nos grupos de pré-eclâmpsia em relação ao controle e os níveis plasmáticos dos fatores de angiogênese.



p=0,242 - 0- Representação da concentração Média do PIGF.

GRÁFICO 7 - Distribuição da concentração plasmática individual do PIGF quanto à presença ou não de infecção no pré-natal.



p=0,483 - 0- Representação da concentração Média do VEGF.

GRÁFICO 9 - Distribuição da concentração plasmática individual do VEGF das gestantes do estudo quanto à presença ou não de infecção no pré-natal.
ANEXO A – Parecer ético