



INGRID CRISTINA WEEL

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E EXPRESSÃO
DE CITOCINAS E DE FATORES ANGIOGÊNICOS
EM PLACENTA DE GESTANTES PORTADORAS DE
PRÉ-ECLÂMPSIA**

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

MESTRADO

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

UNESP

2013

INGRID CRISTINA WEEL

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E EXPRESSÃO
DE CITOCINAS E DE FATORES ANGIOGÊNICOS
EM PLACENTA DE GESTANTES PORTADORAS DE
PRÉ-ECLÂMPsia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de Concentração - Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Co-orientador: José Carlos Peraçoli

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

UNESP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Weel, Ingrid Cristina.

Alterações histopatológicas e expressão de citocinas e de fatores angiogênicos em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia / Ingrid Cristina Weel. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Co-orientador: José Carlos Peraçoli

Capes: 21104000

1. Pré-eclâmpsia. 2. Placenta. 3. Citocinas. 4. Neovascularização.
5. Histopatologia. 6. Útero – Crescimento. 7. Gravidez – Complicações.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia; placenta; citocinas; fatores angiogênicos; histopatologia..

Trabalho realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP e no laboratório de Immunology and Microbiology Testing Unit da Weill Cornell Medical College – NY, com auxílio da Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processos n° 2010/12892-5, 2010/20207-0 e 2012/08476-1.



Ao meu primo, Eloy (in memoriam), pela vontade incansável de viver sendo sempre tão amável e carinhoso, ensinando a todos o verdadeiro valor da vida.

“Viver é construir as rimas da luta de cada dia para afinar o canto e compor a vida.”

-Ivone Boechat-



Agradecimientos

Agradecimento especial

À minha querida orientadora, Maria Terezinha Serrão Peraçoli e ao meu co-orientador, José Carlos Peraçoli, pelos conselhos, dedicação, carinho, acolhimento e pelos ensinamentos acadêmicos e da vida. O meu muito obrigada por terem me orientado e por serem pessoas tão especiais que me fizeram chegar onde cheguei. Minhas conquistas não teriam ocorrido sem o carinho e dedicação de vocês. Muito obrigada!!!

Agradecimentos

A Deus, por me lembrar do poder que possuo, por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada pela sua presença divina no mais íntimo do meu ser.

Aos meus pais que com tanto amor, compreensão, carinho, dedicação, incentivo e auxílios financeiros fizeram com que os meus estudos, sonhos e desejos se concretizassem. Sem o empenho, luta, trabalho e perseverança de vocês minhas conquistas não teriam êxito. A vocês, meus grandes inspiradores e exemplos, o meu muito obrigada! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Michael e Patrick, pelos conselhos, apoio, carinho, “brincas” e por me proporcionarem uma inigualável e inesquecível convivência por todos estes anos.

Ao meu namorado, Farid (Tuco), que em tão pouco tempo trouxe amor, carinho, dedicação, compreensão, aconchego, conselhos e companheirismo. Muito obrigada por estar sempre ao meu lado me ouvindo, apoiando e proporcionando momentos tão maravilhosos com muito amor e ternura, tornando cada segundo em momentos especiais.

Às minhas grandes amigas, Camila (kaka), Juliana (Elma Chips), Mariana (Strabik) e Vanessa (Pink), pela amizade verdadeira, consolos, diversão, carinho e compreensão vividos nesses anos que estivemos juntas. Muito obrigada por terem se tornado a minha família de Botucatu me proporcionando momentos incríveis.

Aos meus amigos do Laboratório da Imunologia da Reprodução: Célio, Mariana Letícia, Priscila, Thaís, Vanessa (Van morena), pelos auxílios em experimentos, e por fazerem com que o ambiente de trabalho fosse animado e produtivo.

Aos meus grandes amigos e companheiros de tantos anos Gisele, Daniel, Everton, Lucas, Marcos, Mariana, Marília, Sofia, Suzane e Vanessa, pela amizade maravilhosa que cultivamos desde criança e que sempre me apoiaram em minhas decisões, me dando conselhos e proporcionando descontração.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por fornecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Alexandrina Sartori e José Maurício Sforcin e seus alunos, pela disponibilidade e compreensão na utilização do laboratório para a realização deste trabalho.

Aos professores Steven Sol Witkin e Rebecca Baergen, pela oportunidade de desenvolver projetos na Weill Cornell Medical College, New York Presbyterian Hospital, USA.

Aos funcionários do Departamento de Pós-graduação, pela ajuda e disponibilidade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela oportunidade da realização deste trabalho de Mestrado.

Às gestantes, que participaram deste trabalho, fazendo com que este estudo se tornasse possível.

Às maternidades da Santa Casa de Misericórdia de Botucatu, SP e maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP pela disponibilidade na execução deste trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho. Processos nº 2010/12892-5, 2010/20207-0 e 2012/08476-1.

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	12
Resumo.....	13
Abstract.....	14
1. Introdução.....	15
2. Objetivo.....	18
3. Sujeitos e métodos.....	18
3.1. Sujeitos.....	18
3.2. Critérios de inclusão.....	19
3.3. Critérios de exclusão.....	19
3.4. Dosagem de proteinúria.....	19
3.5. Colheita e processamento das amostras de tecido placentário	19
3.6. Análise histopatológica da placenta.....	19
3.7. Avaliação do peso dos recém-nascidos.....	20
3.8. Análise estatística.....	20
4. Resultados.....	20
4.1. Características das gestantes.....	20
4.2. Análise histopatológica da placenta de gestantes normotensas	21
e de portadoras de PE.....	
5. Discussão.....	26
6. Referências.....	30
Capítulo 2.....	37
Resumo.....	38
Abstract.....	40
1. Introdução.....	42
2. Objetivo.....	46
3. Sujeitos e métodos.....	46
3.1. Sujeitos.....	46
3.2. Critérios de inclusão.....	47
3.3. Critérios de exclusão.....	47
3.4. Dosagem de proteinúria.....	47

3.5.	Colheita e processamento das amostras de tecido placentário	48
3.6.	Análise imunoistoquímica	48
3.7.	Análise estatística.....	49
4.	Resultados.....	50
4.1.	Características das gestantes.....	50
4.2.	Local da expressão de citocinas e fatores angiogênicos.....	50
4.3.	Análise da expressão quantitativa de citocinas e fatores angiogênicos em cortes histológicos de placenta.....	54
5.	Discussão.....	56
6.	Referências.....	60
7.	Anexos.....	67

*“Há pessoas que choram por saber que as rosas têm espinho,
Há outras que sorriem por saber que os espinhos têm rosas!”*

-Machado de Assis-



ANÁLISE COMPARATIVA DE LESÕES PLACENTÁRIAS EM GESTANTES COM PRÉ- ECLÂMPSIA PRECOCE E TARDIA

COMPARATIVE ANALYSIS OF PLACENTAL LESIONS IN PREGNANT WOMEN WITH EARLY AND LATE-ONSET PREECLAMPSIA

Ingrid Cristina Weel¹; Mariana Romão¹; Vera Therezinha Medeiros Borges¹;
Steven Sol Witkin³; José Carlos Peraçoli¹; Rebecca Baergen⁴; Maria Terezinha
Serrão Peraçoli²

¹Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP 18618-970

²Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP 18618-970

³Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College – New York Presbyterian Hospital, New York, USA.

⁴Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College – New York Presbyterian Hospital, New York, USA.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gestação humana, caracterizada pelo aparecimento de hipertensão arterial e proteinúria após a 20ª semana de gestação. É aceito que esta patologia tem origem na placenta, provavelmente em decorrência de fatores envolvidos na sua formação e desenvolvimento. O presente projeto teve como objetivo: 1) Avaliar comparativamente a histopatologia de lesões placentárias em gestantes portadoras de PE e gestantes normotensas; 2) Comparar a frequência de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino entre os grupos de gestantes estudados. Foram avaliadas 140 gestantes, sendo 20 normotensas e 120 com PE. As gestantes com PE foram classificadas de acordo com o aparecimento das manifestações clínicas em PE precoce (< 34 semanas de gestação - n=40) e PE tardia (≥ 34 semanas de gestação - n= 80). Um fragmento de placenta foi obtido imediatamente após o parto e preparado para análise histopatológica, sendo os cortes histológicos de 4µm de espessura colocados sobre lâmina histológica para coloração pelo método de Hematoxilina - Eosina (HE). O exame histológico das placentas mostrou que as patologias mais frequentemente encontradas em gestantes com PE foram aumento de vilos com nós sinciciais, infarto, aumento de depósito de fibrina e hipoplasia de vilos distais. Placentas de gestantes portadoras de PE precoce apresentaram maior percentagem de vilos com aumento de nós sinciciais para a idade gestacional em comparação a gestantes normotensas e com PE tardia. O infarto placentário e a hipoplasia de vilos distais foram mais frequentes em gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas, enquanto o depósito de fibrina foi maior em gestantes com PE precoce do que nas com PE tardia. Além disso, a percentagem de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino foi significativamente maior (37,8%) em gestantes com PE precoce do que nas com PE tardia (14,3%). Em conjunto, os resultados mostram que gestantes portadoras de PE precoce apresentam placentas com maior número de lesões e de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino em relação às com PE tardia, confirmando que a PE precoce pode ser considerada uma patologia com manifestações mais graves do que a PE tardia.

Palavras chave: pré-eclâmpsia, placenta, nós sinciciais, restrição de crescimento intrauterino

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a specific syndrome of human pregnancy, characterized by the onset of hypertension and proteinuria after the 20th week of gestation. It is accepted that this disease originates in the placenta, probably due to factors involved in its formation and development. The objectives of the present study were: 1) To evaluate the histopathology of placental lesions in pregnant women with PE and in normotensive pregnant women; 2) To compare the frequency of newborns with intrauterine growth restriction among the groups of pregnant women studied. One hundred and forty pregnant women were evaluated, of whom 20 were normotensive and 120 were preeclamptic. Pregnant women with PE were classified according to the appearance of clinical manifestations in early-onset PE (<34 weeks of gestation - n = 40) and late-onset PE (\geq 34 weeks gestation - n = 80). A fragment of placenta was obtained immediately after delivery and prepared for histopathological analysis. Placental sections of 4 μ m were placed on a slide for hematoxylin - eosin (HE) staining. Histological examination of placentas showed that the most frequently alterations found in patients with PE were increase villous with syncytial knots, infarction, increased fibrin deposits and distal villi hypoplasia. Placenta of pregnant women with early-onset PE showed higher percentage of villous with syncytial knots for gestation age compared with late-onset PE and normotensive pregnant women. Infarct and distal villi hypoplasia were more frequent in placenta of pregnant women with PE, whereas fibrin deposits were significantly increased in women with early-onset PE than in late-onset PE. Moreover, the percentage of newborns with intrauterine growth restriction was higher (37.8%) in patients with early-onset PE than in late-onset PE (14.3%). Together the results show that pregnant women with early-onset PE showed placentas with higher percentage of lesions and newborns with intrauterine growth restriction compared with the late-onset PE, confirming that early-onset PE can be considered a pathology with more severe manifestations than the late-onset PE.

Keywords: preeclampsia, placenta, syncytial knots, intrauterine growth restriction

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome que incide entre 5% e 7% das gestações humanas, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade, tanto materna como perinatal (Sibai et al., 2005; Saito et al., 2007; Unal et al., 2007). É uma doença sistêmica, caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno e clinicamente identificada por hipertensão arterial e proteinúria, que se manifestam após a 20^a. semana de gestação (Rein et al., 2003; Paternoster et al., 2004).

Classicamente, a PE é classificada em leve e grave, de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais, e a presença de comprometimento fetal (ACOG, 2002; Ogge et al., 2011). Um conceito recente classifica a PE em precoce e tardia, considerando a idade gestacional no momento do aparecimento das manifestações clínicas da doença, isto é, antes da 34^a. ou a partir da 34^a. semana de gestação, respectivamente (von Dadelszen et al., 2003; Huppertz, 2008).

Acredita-se que essas duas entidades diferem quanto suas etiologias e quanto às formas de manifestação da doença (von Dadelszen et al., 2003; Huppertz, 2008). A PE de início precoce está geralmente associada com Doppler anormal da artéria uterina, fetos com restrição de crescimento intrauterino (RCIU) e resultados maternos e neonatais ruins (Murphy & Stirrat, 2000; Ness & Sibai, 2006). Por outro lado, a PE de início tardio está frequentemente associada com índice de resistência uterina normal ou discretamente aumentado, baixa taxa de comprometimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis (Sibai et al., 2005; Ness & Sibai, 2006).

Dados da literatura indicam que, quando a PE tem início precoce pode ser uma doença qualitativamente diferente, o que é reforçado por observações de que a fisiopatologia da PE de início precoce difere da de início tardio, em termos de função neutrofílica (von Dadelszen et al., 2003), níveis de citocinas (Vince et al., 1995; Peraçoli et al., 2007; 2008) e maior prevalência de lesões placentárias (Moldenhauer et al., 2003). Também existe evidência epidemiológica que a PE de início precoce (<28 sem) está associada com maior risco de recorrência em gestações posteriores (Sibai, 1992; Redman & Sargent, 2005) e aumento do risco

de desenvolver doença cardiovascular e morte (Sibai, 1992; Irgens et al., 2001; Smith et al., 2001).

Durante a placentação normal, as arteríolas espiraladas maternas são invadidas pelas células trofoblásticas, resultando em remodelação desses vasos que assegura o suprimento sanguíneo adequado para a unidade fetoplacentária. Por outro lado, em gestantes com PE a invasão trofoblástica é inadequada, gerando defeitos na remodelação da arteríola espiralada e resultando em má perfusão e isquemia (George & Granger, 2011).

Roberts & Hubel (1999) sugerem que a PE tem como fator inicial a hipóxia placentária, decorrente do baixo fluxo sanguíneo útero-placentário. Assim, a placenta desempenha papel essencial nessa doença, pois problemas na implantação e no processo de placentação culminam em redução da perfusão sanguínea e, portanto, em hipóxia/isquemia placentária (Amash et al., 2007; Gilbert et al., 2008; Ogge et al., 2011), que determina a liberação de fatores citotóxicos na circulação materna.

Na PE, as alterações placentárias encontradas com maior frequência são infarto, trombose intervilosa, aumento de nós sinciciais, presença de necrose fibrinóide (Vinnars et al., 2008; Souza et al., 2011), aumento no depósito de fibrina e hipoplasia dos vilos distais (Akhlaq et al., 2012).

Os nós sinciciais são definidos como agregados de núcleos do sinciciotrofoblasto, localizados na superfície das vilosidades terminais e que estão associados com condições de má perfusão útero-placentária (Loukeris et al., 2010). Fazem parte da estrutura da placenta e são considerados indicadores de maturação placentária. Não se conhece como os nós sinciciais são formados e qual sua função. Entretanto, são interpretados como um fenômeno degenerativo (Spanos et al., 2002), um processo de envelhecimento (Huppertz, 2010) e de hiperplasia sincicial, e como resposta à isquemia ou hipóxia trofoblástica (Sankar et al., 2012). A aceleração da maturação dos vilos placentários é considerada um marcador histológico de insuficiência placentária e responsável pelo parto prematuro (Morgan et al., 2012).

O infarto placentário, causado pelo baixo fluxo sanguíneo, caracteriza-se por área de necrose isquêmica dos vilos (Souza et al., 2011; Vinnars et al., 2011). A deposição de material fibrinóide entre os vilos ocorre em todas as placentas, como resultado da cascata de coagulação, da degeneração sinciciotrofoblástica

ou da secreção trofoblástica (Souza et al., 2011). A hipoplasia de vilos distais caracteriza-se pela diminuição do diâmetro das vilosidades distais, que resulta em aumento do espaço interviloso (Edline et al., 2004).

A isquemia placentária, presente na PE, é a causa mais comum da restrição de crescimento fetal associada a essa patologia (Redman & Sargent, 2005; Sibai et al., 2005; Ophir et al., 2006; Kinzler & Vintzileos, 2008; Roberts & Post, 2008).

Ananth et al. (2007) definiram como síndrome da doença isquêmica placentária o processo que pode se manifestar clinicamente como PE, restrição de crescimento fetal e descolamento prematuro de placenta. Embora a manifestação clínica da doença isquêmica placentária ocorra na segunda metade da gestação, a sua fisiopatologia tem origem na primeira metade da mesma (Kinzler & Vintzileos, 2008). Tanto na PE como na restrição de crescimento fetal a angiogênese e o desenvolvimento da placenta estão alterados, sugerindo a ocorrência de desbalanço entre fatores pró e anti-angiogênicos nessas intercorrências.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento placentário (PIGF) são importantes proteínas angiogênicas relacionadas com o desenvolvimento vascular durante a invasão trofoblástica (Tsatsaris et al., 2003) e responsáveis pelo desenvolvimento placentário normal (Masuyama et al., 2006). Por outro lado, o fator solúvel *fms-like tyrosine kinase 1* (sFlt1), ao se ligar ao VEGF e PIGF, age como inibidor da angiogênese, reduzindo os níveis dos mesmos e conseqüentemente, atuando como inibidor direto da invasão citotrofoblástica (Zhou et al., 2002) e determinando quebra da homeostase endotelial sistêmica, observados na PE (Silasi et al., 2010). De acordo com Roberts & Post (2008), a avaliação histológica da placenta em gestações complicadas por hipertensão arterial materna ou restrição de crescimento fetal pode trazer informações sobre a fisiopatologia da doença, prever a recorrência da mesma e identificar condutas específicas para o cuidado clínico da mãe e do recém-nascido.

Considerando que a restrição de crescimento é uma manifestação tardia conseqüente ao desenvolvimento placentário anormal e precoce (Kinzler & Vintzileos, 2008), o estudo da associação entre restrição de crescimento fetal e presença de lesões relacionadas com a má perfusão placentária, poderá

contribuir para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas manifestações precoce e tardia da PE.

2. OBJETIVO

Comparar a histopatologia das lesões placentárias e a frequência de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino em gestantes portadoras de PE precoce e tardia.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

No período de março de 2011 a agosto de 2012 foram coletados fragmentos de placenta de 20 gestantes normotensas, 40 portadoras de PE precoce e 80 portadoras de PE tardia, que realizaram assistência ao parto na maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Botucatu, SP e na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e tiveram a resolução da gestação por cesariana.

A idade gestacional dos grupos estudados foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou exame ultrasonográfico precoce (<20 semanas de gestação).

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestaram hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20^a. semana de gestação (NHBPEP, 2000). A PE foi classificada em precoce e tardia segundo o momento do diagnóstico das manifestações clínicas, isto é, antes da 34^a. ou a partir da 34^a. semana de gestação, respectivamente (Hupertz, 2008).

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo no. 278/11-CEP).

3.2. Critérios de Inclusão

Grupo de gestantes saudáveis (normotensas): mulheres com gestação única, sem complicações clínicas ou obstétricas.

Grupo estudo (pré-eclâmpsia): mulheres com gestação única e portadoras de PE, sem outras complicações clínicas ou obstétricas.

3.3. Critérios de Exclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de PE tais como: gestação gemelar, PE anterior, hipertensão crônica, diabetes, doenças renais, má-formação fetal, doenças infecciosas, soropositividade para HIV e uso de drogas e álcool ou não ter a gestação resolvida no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP ou na maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Botucatu, SP.

3.4. Dosagem da Proteinúria

A proteinúria em urina de 24 horas foi quantificada por método colorimétrico, no sistema de automação Technicon RAXT, do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

3.5. Colheita e processamento das amostras de tecido placentário

A amostra de tecido placentário, abrangendo as faces materna e fetal, foi colhida imediatamente após a dequitação. Os fragmentos de placenta, cortados a partir do centro da mesma, em forma de triângulo, com auxílio de um bisturi cirúrgico, foram imediatamente colocados em recipiente estéril, contendo formol tamponado para transporte até o laboratório.

3.6. Análise histopatológica da placenta

Os fragmentos placentários foram fixados em formol tamponado com fosfato a 10% por 48 horas e submetidos a processo de lavagem em água corrente por 24 horas. Em seguida, foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os cortes histológicos de 4 μ m de espessura foram colocados sobre lâmina histológica para coloração pelo método de

Hematoxilina - Eosina (HE). O exame histológico foi realizado pelo pesquisador sem conhecimento prévio do grupo ao qual a gestante pertencia, das informações clínicas e da idade gestacional. As variáveis histológicas avaliadas foram: presença de nós sinciciais, infarto, depósito de fibrina e hipoplasia de vilos distais.

3.7. Classificação dos recém-nascidos

Para identificação de restrição de crescimento intrauterino, os recém-nascidos das gestantes normotensas e das portadoras de PE foram avaliados imediatamente após o parto por neonatologista e classificados segundo a curva de crescimento de Lubchenco et al. (1963). Assim, foram classificados em pequenos para idade gestacional - **PIG** (peso abaixo do percentil 10), adequados para idade gestacional - **AIG** (peso entre os percentis 10 e 90) e grandes para idade gestacional - **GIG** (peso acima do percentil 90).

3.8. Análise estatística

Os resultados referentes às características das gestantes normotensas e portadoras de PE precoce e tardia foram analisados empregando-se testes não paramétricos. Na comparação das proporções obtidas no estudo da histopatologia das lesões e da restrição de crescimento intrauterino utilizou-se o teste de qui-quadrado, com correção de Pearson quando necessário. Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico INSTAT, GraphPad, San Diego, CA, USA (2000), com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Características das gestantes

As características das gestantes estudadas, estratificadas em normotensas e portadoras de PE precoce (<34 semanas) e PE tardia (≥34 semanas), encontram-se na Tabela 1.

A idade materna foi semelhante nos três grupos analisados. A idade gestacional do grupo com PE precoce foi significativamente diferente dos grupos de gestantes normotensas e com PE tardia. As gestantes com PE precoce apresentaram concentração de proteinúria (3.960 mg/24h) significativamente maior que aquelas com PE tardia (720 mg/24 h) e normotensas (<300 mg/24 h).

Tabela 1. Características das gestantes estudadas.

Características	Gestantes		
	Normotensas n=20	PE precoce n=40	PE tardia n=80
Idade (anos)	30 (23 – 40)	24 (13 – 36)	25 (14 – 45)
Idade gestacional (semanas)	38 (36 – 40)	31 * (27 – 33)	37 (34 – 42)
Proteinúria (mg/24 horas)	< 300	3.960 ** (320 – 22.520)	720 (300 – 9.520)

Os valores de idade materna, idade gestacional e proteinúria estão expressos em mediana, com os valores mínimo e máximo entre parênteses.

* (p<0,05) vs PE tardia e NT (teste de Kruskal-Wallis)

** (p<0,01) vs PE tardia e NT (teste de Kruskal-Wallis)

4.2. Análise histopatológica da placenta de gestantes normotensas e portadoras de PE

O exame histopatológico das placentas de gestantes com PE mostrou que as alterações predominantes foram aumento de nós sinciciais, infarto, aumento de depósito de fibrina e hipoplasia de vilos distais (Figura 1).

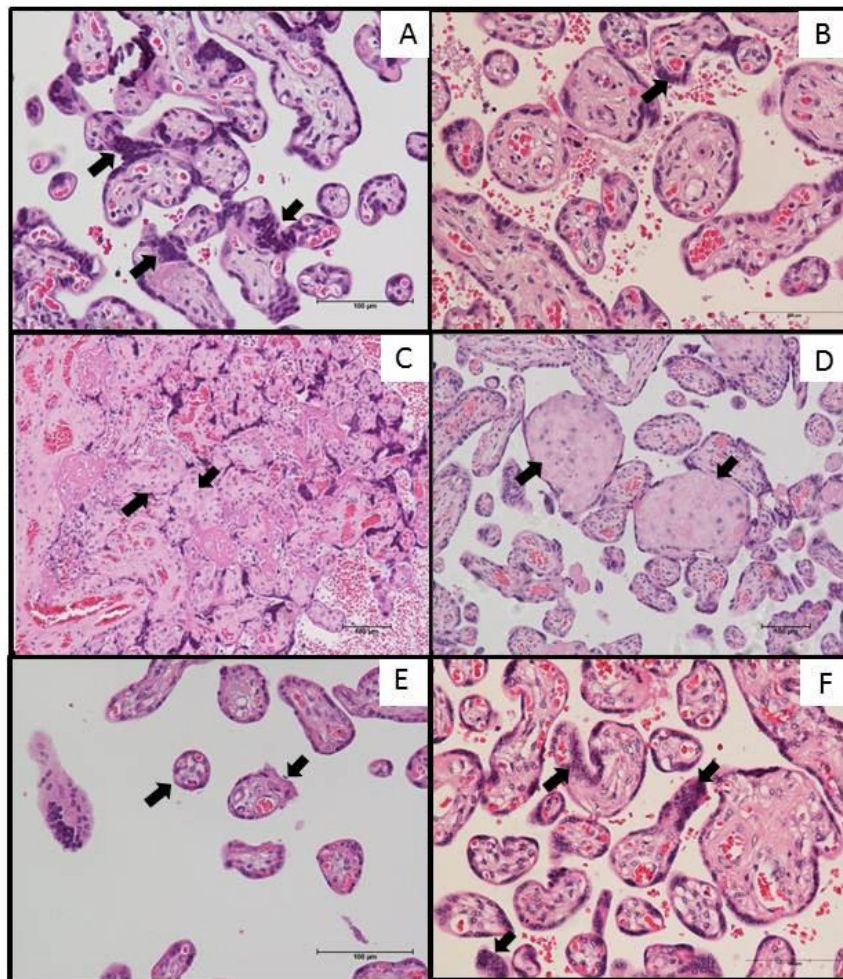


Figura 1. Fotomicrografia representativa da histopatologia placentária de gestantes normotensas e portadoras de PE. **A)** Aumento de nós sinciciais (setas) em placenta de gestante portadora de PE com 29 semanas de gestação (HE – 200x). **B)** Presença de poucos nós sinciciais (seta) em placenta de gestante portadora de PE com 36 semanas de gestação. **C)** Infarto placentário (setas) de gestante com 33 semanas de gestação e portadora de PE (HE – 200x). **D)** Aumento de depósito de fibrina (setas) em placenta de gestante portadora de PE com 30 semanas de gestação (HE – 200x). **E)** Hipoplasia de vilos distais (setas) em placenta de gestante portadora de PE com 36 semanas de gestação (HE – 200 x). **F)** Presença de nós sinciciais (setas) em placenta de gestante normotensa com 38 semanas de gestação.

Na determinação da percentagem de vilos contendo nós sinciciais foram contados os vilos que apresentavam cinco ou mais nós sinciciais em 100 vilos do corte histológico. Os nós sinciciais foram definidos como aglomerados de cinco ou mais núcleos com projeções periféricas dos vilos que não estavam em contato com outro vilo adjacente (Loukeris et al., 2010). O infarto viloso foi definido como a região isquêmica das vilosidades, envolvida por sangue coagulado, e foi classificado quanto a sua presença ou ausência nos cortes histológicos. O depósito de fibrina periviloso foi identificado pela presença de acúmulo de material fibrinóide ao redor das vilosidades e foi considerado aumentado quando mais de um quarto das vilosidades estavam total ou parcialmente envolvidas. Na análise de hipoplasia dos vilos distais foram comparadas as placentas de gestantes normotensas com as das portadoras de PE. Considerou-se hipoplasia quando os vilos se apresentavam pequenos para a idade gestacional.

A percentagem de vilos com nós sinciciais de gestantes portadoras de PE precoce, detectados nos períodos entre 24 e 28 semanas (37,4%) e entre 29 e 33 semanas (35,3%) foi elevada e semelhante à das gestantes normotensas (44,2%) e portadoras de PE tardia com idade gestacional a partir de 37 semanas (37,7%). A ocorrência de nós sinciciais foi maior em gestantes portadoras de PE precoce quando comparada às gestantes portadoras de PE entre 34 e 36 semanas de gestação. Nesse período, a percentagem de vilos com nós sinciciais foi significativamente menor em gestantes com PE tardia (24,7%), quando comparadas às gestantes normotensas (44,2%) e pré-eclâmpticas com idade gestacional a partir de 37 semanas (37,7%). Houve aumento do número de nós sinciciais nas placentas de gestantes com PE tardia a partir de 37 semanas de gestação (40%), semelhante aos valores apresentados por gestantes normotensas avaliadas no mesmo período (Figura 2).

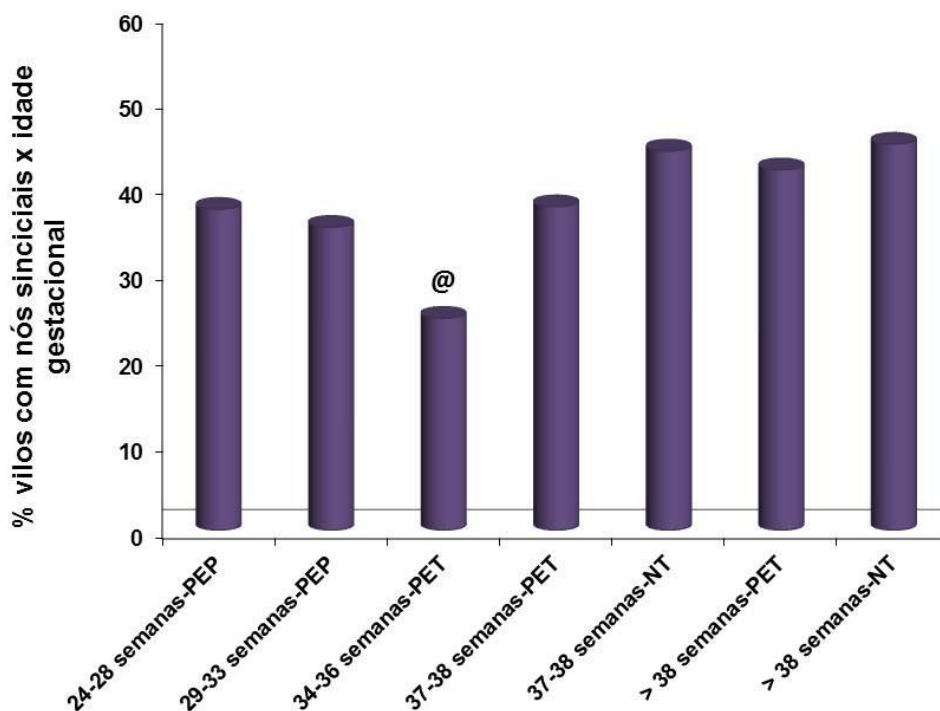


Figura 2. Percentagem de vilos com nós sinciais segundo a idade gestacional de gestantes normotensas e portadoras de PE.

@($p < 0,05$) vs 24-28 semanas PEP, 29-33 semanas PEP, 37-38 semanas PET e NT, >38 semanas PET e NT.

NT- Normotensa; PEP- pré-eclâmpsia precoce; PET- pré-eclâmpsia tardia.

A percentagem de alterações placentárias de gestantes portadoras de PE precoce e tardia em relação às gestantes normotensas está representada na Figura 3. A frequência de infarto placentário foi significativamente maior nos dois grupos de gestantes portadoras de PE quando comparados ao grupo de gestantes normotensas. O depósito de fibrina foi significativamente mais acentuado nas gestantes portadoras de PE precoce quando comparadas às gestantes normotensas e com PE tardia. A percentagem de hipoplasia dos vilos distais apresentou diferença significativa entre as gestantes normotensas e as portadoras de PE precoce e tardia.

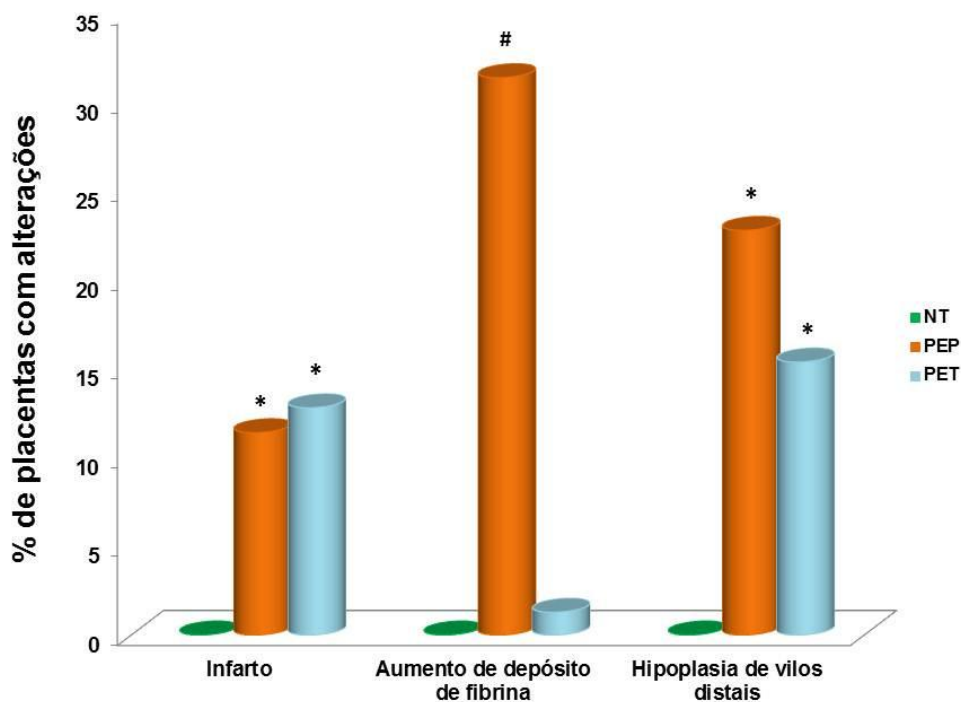


Figura 3. Alterações predominantes em placentas de gestantes portadoras de PE.

*($p < 0,05$) vs NT; # ($p < 0,001$) vs NT e PET.

NT- Normotensa; PEP- pré-eclâmpsia precoce; PET- pré-eclâmpsia tardia.

A análise da presença de restrição de crescimento intrauterino revelou que os recém-nascidos de gestantes portadoras de PE precoce apresentaram percentagem significativamente maior (37,8%) de restrição de crescimento intrauterino quando comparada com a de recém-nascidos de gestantes portadoras de PE tardia (14,3%). Os recém-nascidos de gestantes normotensas não apresentaram restrição de crescimento intrauterino (Figura 4).

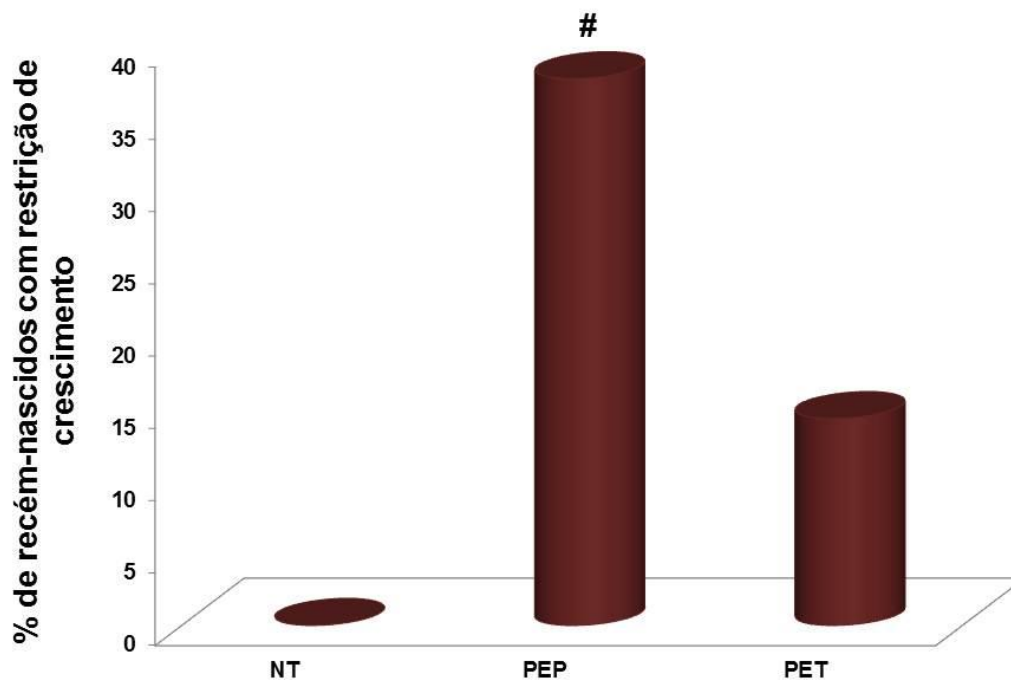


Figura 4. Percentagem de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino em gestantes normotensas e em portadoras de PE precoce e tardia.

($p < 0,01$) vs NT e PET.

NT- Normotensa; PEP- Pré-eclâmpsia precoce; PET- Pré-eclâmpsia tardia.

5. DISCUSSÃO

Embora a etiopatologia da PE ainda não esteja claramente definida, há evidências de que a presença da placenta seja o principal fator responsável pelo aparecimento e a gravidade da doença (Redman & Sargent, 2005; Heazell et al., 2006). A remodelação inadequada das arteríolas espiraladas na PE pode induzir hipóxia placentária e estresse oxidativo, que causam a liberação de fatores placentários, como o receptor de VEGF solúvel (sVEGFR-1 ou Flt1) (Maynard et al., 2003; Makris et al., 2007), a endoglina solúvel (sEng) (Venkatesha et al., 2006), citocinas pró-inflamatórias (Benyo et al., 2001; Hung et al., 2004) e debris do trofoblasto (Knight et al., 1998; Redman & Sargent, 2000; Borzychovski et al., 2006). Esses fatores contribuem para o desencadeamento da resposta inflamatória sistêmica intravascular (Redman et al., 1999; Schiessl et al., 2006), a

ativação de leucócitos (Sacks et al., 1998; Gervasi et al., 2001) e para a disfunção endotelial (Roberts, 1998; Khan et al., 2005), responsáveis pela característica multisistêmica da doença.

O presente estudo mostrou que as principais alterações histopatológicas placentárias nas gestantes portadoras de PE, quando comparadas às gestantes normotensas, foram o aumento da percentagem de número de nós sinciciais, de infarto, de depósito de fibrina e de hipoplasia de vilos distais. Entre as gestantes pré-eclâmpticas, o aumento de nós sinciciais e de depósito de fibrina foi significativamente maior nas gestantes com PE precoce. Essas gestantes, quando avaliadas nos períodos entre 24 e 28 semanas e entre 29 e 33 semanas, apresentaram altas percentagens de nós sinciciais. Essas estruturas estão associadas com condições de má perfusão útero-placentária, sinalizando o aumento de seu número o amadurecimento precoce da placenta (Loukeris et al., 2010). Os nós sinciciais são raramente vistos em vilos de placenta imatura, aumentam gradualmente com a idade gestacional e estão presentes entre 10% e 30% dos vilos terminais na gestação de termo (Jain et al., 2007). De acordo com Corrêa et al. (2008), o aumento de nós sinciciais é observado em placentas de termo e em gestações prematuras, mostrando correlação positiva com a gravidade da hipertensão arterial. Considerando que a PE precoce está geralmente associada aos casos mais graves da doença (Hall et al., 2006), os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as altas percentagens de vilos com aumento de nós sinciciais, observadas nas placentas de gestantes com PE precoce, podem ser decorrentes das formas mais graves da doença associadas às condições de má perfusão útero-placentária, que causam maturação acelerada dos vilos placentários.

Quando os resultados deste trabalho foram comparados com os de Loukeris et al. (2010), que padronizaram valores de referência de nós sinciciais em placenta de gestantes normais com idade gestacional variando entre 20 e 40 semanas de gestação, observou-se um grande contraste entre gestantes normotensas e portadoras de PE. A percentagem média de vilos com nós sinciciais obtida por esses autores em gestantes normais no período de 26 a 34 semanas de gestação variou de 11,4% a 18,1%, enquanto que as gestantes portadoras de PE precoce, do nosso estudo, apresentaram valores de 37,4% e 35,3% nos períodos de 24 a 28 semanas e de 29 a 33 semanas, respectivamente.

As gestantes portadoras de PE tardia com idade gestacional entre 34 e 36 semanas apresentaram percentagem de nós sinciciais significativamente menor em comparação às gestantes portadoras de PE precoce e às gestantes normotensas e com PE tardia, com idade gestacional maior que 37 semanas. Essa menor percentagem de vilos contendo nós sinciciais, verificada nas gestantes com PE tardia (24,7%), poderia estar relacionada a casos mais leves de PE ou ainda por apresentarem idade gestacional menor que 37 semanas, quando a percentagem de nós sinciciais nos vilos de gestantes normais varia entre 12% e 26% (Loukeris et al. (2010). Após 37 semanas de gestação, as gestantes portadoras de PE tardia e as normotensas apresentaram percentagens de nós sinciciais semelhantes, provavelmente por estarem mais próximas do final da gestação.

O infarto placentário ocorre devido ao baixo fluxo sanguíneo que chega à placenta (Souza et al., 2011), produzindo isquemia útero-placentária, sendo comum em placentas de gestantes portadoras de PE grave (Mateus et al., 2008). Os resultados do presente estudo revelaram que as gestantes portadoras de PE precoce e tardia apresentaram percentagens significativamente aumentadas de infarto placentário em relação às normotensas, o que pode estar relacionado à isquemia placentária presente em pacientes com PE devido ao baixo fluxo sanguíneo destinado à placenta (Roberts & Hubel, 1999), resultando em hipóxia placentária. Esse estudo corrobora com o estudo de Vinnars et al. (2011), em que a presença de infarto foi maior em gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas. Em contrapartida, estudo realizado por van der Merwe et al. (2010) mostrou que a presença de infarto aumentou em pacientes com PE precoce quando comparadas com PE tardia e com normotensas. Desta forma, os infartos presentes em placentas de gestantes portadoras de PE podem representar uma placentação inadequada, comprometendo o sucesso da gestação.

O depósito de fibrina apresentou aumento significativo em placenta de gestantes portadoras de PE precoce quando comparado às gestantes normotensas e portadoras de PE tardia. Sikkema et al. (2002) também observaram aumento do depósito de fibrina em gestantes portadoras de PE. O depósito de fibrina é considerado um produto da coagulação sanguínea materna (Frank et al., 1994; Souza et al., 2011) e sua formação ocorre pela degeneração

sinciciotrofoblástica devido à hipóxia resultante do mau suprimento sanguíneo (Castelluci & Kaufmann, 1995). Na PE, a placenta expressa intenso estresse oxidativo (Burton & Jauniaux, 2004; Myatt & Cui, 2004), resultante de lesão causada por hipóxia e reperfusão (Burton & Hung, 2003). Assim, o aumento de depósito de fibrina na PE precoce pode comprometer o desenvolvimento placentário ao dificultar o aporte sanguíneo destinado a esse órgão.

A maior percentagem de placentas com hipoplasia dos vilos distais encontrada nas gestantes com PE precoce quando comparadas às normotensas concorda com os resultados de Akhlaq et al. (2012). A ocorrência dessa alteração placentária está associada com o baixo fluxo sanguíneo destinado ao feto, provavelmente devido à má placentação, que pode dificultar, ainda mais, o suprimento sanguíneo placentário já que os vilos se encontram diminuídos.

Os resultados do presente trabalho mostram que as gestantes com PE precoce apresentaram maior frequência de lesões placentárias relacionadas à má-perfusão materna do que as com PE tardia e concordam com os de Ogge et al. (2011). Esses autores demonstraram que o envolvimento placentário determinado pela análise das lesões histopatológicas diferencia PE precoce da PE tardia e que a prevalência das lesões diminui com o avanço da idade gestacional. Assim, quanto menor a idade gestacional no momento do parto, maior a frequência de lesões placentárias consistentes com a má perfusão materna e a gravidade da PE.

A classificação da PE em precoce e tardia tem um significado prognóstico importante, uma vez que o aparecimento precoce da doença está associado com maior morbidade e mortalidade do que o aparecimento tardio (Ogge et al., 2011). O risco de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional é maior com o desenvolvimento precoce da PE (Yu et al., 2008) e a morbidade e mortalidade neonatais em gestações complicadas por PE estão relacionadas com a idade gestacional no momento do parto (Ganzevoort et al., 2006; Sibai et al., 2008).

A associação entre PE e restrição de crescimento fetal já está bem estabelecida (Ferrazani et al., 2000; Ophir et al., 2006; Krielessi et al., 2012), existindo correlação entre placentação deficiente e recém-nascido pequeno para a idade gestacional (Redman & Sargent, 2005). Neste trabalho a percentagem de recém-nascidos com restrição de crescimento foi significativamente maior em gestantes portadoras de PE precoce e corroboram com os estudos de Kovo et al.

(2012), mostrando maior percentagem de restrição de crescimento fetal associada com lesões placentárias decorrentes de alterações do suprimento sanguíneo fetal e materno. A comparação da percentagem de recém-nascidos com restrição de crescimento com as alterações placentárias em gestantes portadoras de PE precoce mostrou maior ocorrência de alterações como aumento de nós sinciciais e aumento de depósito de fibrina. Esses resultados sugerem que os índices de restrição de crescimento podem ser decorrentes das condições extremas de isquemia placentária, que afetam o fluxo sanguíneo destinado ao feto, evidentes em pacientes portadoras de PE precoce. As condições de isquemia placentária, presentes principalmente nessas gestantes, levam a altos índices de restrição de crescimento fetal estando o aumento da frequência destas alterações envolvido no desenvolvimento do feto. De acordo com Moscuza et al. (2011) e Adams-Chapman et al. (2002), a insuficiência placentária pode causar restrição do crescimento fetal e hipóxia fetal crônica, resultando em um conjunto de patologias que vão desde doenças perinatais menores à paralisia cerebral.

Os resultados do presente estudo mostram que gestantes portadoras de PE precoce apresentam lesões histopatológicas placentárias mais graves e frequentes, que por sua vez estão associadas à maior frequência de recém-nascidos com restrição de crescimento intrauterino em relação às com PE tardia, confirmando que a PE precoce deve ser considerada uma patologia gestacional com manifestações mais graves do que a PE tardia.

6. REFERÊNCIAS

Adams-Chapman I, Vaucher YE, Bejar RF, Benirschke K, Baergen RN, Moore TR. Maternal floor infarction of the placenta: association with central nervous system injury and adverse neurodevelopmental outcome. *J Perinatol* 2002; 22(3):236–241.

Akhlaq M, Nagi AH, Yousaf AW. Placental morphology in pre-eclampsia and eclampsia and the likely role of NK cells. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012; 55(1):17-21.

Amash A, Huleihel M, Sheiner E, Sapir O, Holcberg G. Preeclampsia as a maternal vascular disease. *Harefuah.* 2007; 146(9):707-12.

American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *ACOG Practice Bulletin no. 33.* Washington, DC.: ACOG; 2002.

Ananth CV, Peltier MR, Chavez MR, Kirby RS, Getahun D, Vintzileos AM. Recurrence of ischemic placental disease. *Obstet Gynecol.* 2007; 110(1):128-33.

- Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2505-12.
- Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11(5):309-16.
- Burton GJ, Hung TH. Hypoxia-reoxygenation: a potential source of placental oxidative stress in normal pregnancy and preeclampsia. *Fetal Mat Med Rev* 2003; 14:97-117.
- Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J SocGynecolInvestig.* 2004; 11(6):342-52.
- Castellucci M & Kaufmann P (1995) Basic structure of the villous trees. In *Pathology of the human placenta.* 3rd Edition (Ed.) Bernischke K & Kaufmann P, pp. 94–95. New York: Springer-Verlag.
- Corrêa RRM, Gilio DB, Cavellani CL, et al. Placental morphometrical and histopathology changes in the different clinical presentations of Hypertensive Syndromes in Pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2008; (3):201-206.
- Edline RAWR, Oyd THB, Ampbell VAC, et al. Maternal Vascular Underperfusion : Nosology and Reproducibility of Placental Reaction Patterns. *Pediatr Develop Pathol.* 2004;(3):237-249.
- Ferrazzani S, Merola A, De Carolis S, Carducci B, Paradisi G, Caruso A. Birth weight in pre-eclamptic and normotensive twin pregnancies: an analysis of discordance and growth restriction. *Hum Reprod.* 2000; 15(1):210-7.
- Frank, H-G. et al. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *ActaAnat,* 1994; 150(1):55-68
- Ganzevoort W, Rep A, de Vries JI, Bonsel GJ, Wolf H; PETRA-investigators. Prediction of maternal complications and adverse infant outcome at admission for temporizing management of early-onset severe hypertensive disorders of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195(2):495-503.
- George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 2011;13(4)::269-75.
- Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Pacora P, Naccasha N, Yoon BH, Maymon E, Romero R. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185(4):792-7.
- Gilbert JS, Ryan MJ, La Marca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(2):H541-50.
- Hall DR, G rové D, Carstens E. Early pre-eclampsia: what proportion of women qualify for expectant management and if not, why not? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 128(1-2):169–174.
- Heazell A, Harris L, Forbes K, Crocker I. Placental cell turnover in health and disease. *Rev Gynaecol Perinat Pract* 2006; 6:80-6.

Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol.* 2004; 164(3):1049-61.

Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008; 51(4):970-5.

Huppertz B. IFPA Award in Placentology Lecture: Biology of the placental syncytiotrophoblast--myths and facts. *Placenta.* 2010; 31 Suppl:S75-81.

Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *Brit Med J.* 2001; 323(7323):1213-7

Jain K, Kavi V, Raghuvver CV, Sinha R. Placental pathology in pregnancy-induced hypertension (PIH) with or without intrauterine growth retardation. *Indian J Pathol Microbiol.* 2007; 50(3):533-7.

Khan F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension.* 2005; 46(5):1123-8.

Kinzler WL, Vintzileos AM. Fetal growth restriction: a modern approach. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008; 20(2):125-31.

Knight M, Redman CW, Linton EA, Sargent IL. Shedding of syncytiotrophoblast microvilli into the maternal circulation in pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998; 105(6):632-40.

Kovo M, Schreiber L, Ben-Haroush A, Gold E, Golan A, Bar J. The placental component in early-onset and late-onset preeclampsia in relation to fetal growth restriction. *Prenat Diagn.* 2012 ; 32(7):632-7.

Krielessi V, Papantoniou N, Papageorgiou I, et al. Placental Pathology and Blood Pressure 's Level in Women with Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Hypertension.* 2012, doi: 10.1155/2012/684083.

Loukeris K, Sela R, Baergen RN. Syncytial knots as a reflection of placental maturity: reference values for 20 to 40 weeks' gestational age. *Pediatr Dev Pathol.* 2010; 13(4):305-9.

Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boud E. Intrauterine growth as estimated from liveborn birth weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 1963; 32:793-800.

Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, Waugh R, McKenzie P, Kirwan P, Hennessy A. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int.* 2007; 71(10):977-84.

Masuyama H, Suwaki N, Nakatsukasa H, Masumoto A, Tateishi Y, Hiramatsu Y. Circulating angiogenic factors in preeclampsia, gestational proteinuria, and preeclampsia superimposed on chronic glomerulonephritis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 194(2):551-6.

Mateus J, Goharkhay N, Longo M, Saade GR, Moss J, Sbrana E. Placental histopathology in mild versus severe hypertensive disorders in pregnancy: implications for feto-placental per- fusion. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:S215–S215.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111(5):649-58.

Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189(4):1173-7.

Morgan TK, Tolosa JE, Mele L, Wapner RJ, Spong CY, Sorokin Y, Dudley DJ, Peaceman AM, Mercer BM, Thorp JM, O'Sullivan MJ, Ramin SM, Rouse DJ, Sibai B, Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network FT. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 doi:10.3109/14767058.2012.746297

Moscuzza F, Belcari F, Nardini V, Bartoli A, Domenici C, Cuttano A, Ghirri P, Boldrini A. Placental histopathology. *Gynecological Endocrinology* 2011;27(5):319–323.

Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2000; 19(2):221-31.

Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122(4): 369-82.

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(1):S1-S22.

Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195(1):40-9.

Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, Hussein Y, Kusanovic JP, Yeo L, Kim CJ, Hassan SS. Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med*. 2011; 39(6):641-52.

Ophir E, Dourleshter G, Hirsh Y, Fait V, German L, Bornstein J. Newborns of pre-eclamptic women: a biochemical difference present in utero. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006; 85(10):1172–1178.

Paternoster DM, Fantinato S, Manganeli F, Nicolini U, Milani M, Girolami A. Recent progress in the therapeutic management of pre-eclampsia. *Expert Opin Pharmacother*. 2004; 5(11):2233-9.

Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57(3):177-85.

Peraçoli MT, Menegon FT, Borges VT, de Araújo Costa RA, Thomazini-Santos IA, Peraçoli JC. Platelet aggregation and TGF-beta(1) plasma levels in pregnant women with preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2008;79(1):79-84.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180(2 Pt 1):499-506.

Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta.* 2000; 21(7):597-602.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005; 308(5728):1592-4.

Rein DT, Breidenbach M, Hönsheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Göhring UJ et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine.* 2003; 23(4-5):119-25.

Roberts JM. Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16(1):5-15.

Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999;354(9181):788-9.

Roberts DJ, Post MD. The placenta in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J ClinPathol.* 2008;61(12):1254-60.

Sacks GP, Studena K, Sargent K, Redman CW. Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 179(1):80-6.

Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med.* 2007; 28(2):192-209.

Sankar KD, Bhanu PS, Kiran S, Ramakrishna BA, Shanthi V. Vasculosyncytial membrane in relation to syncytial knots complicates the placenta in preeclampsia: a histomorphometrical study. *Anat Cell Biol.* 2012; 45(2):86-91.

Schiessl B, Kainer F, Oberhoffer R, Jundt K, Friese K. Doppler sonography of the uterine and the cubital arteries in normal pregnancies, preeclampsia and intrauterine growth restriction: evidence for a systemic vessel involvement. *J Perinat Med.* 2006; 34(2):139-44.

Sibai BM. Management and counseling of patients with preeclampsia remote from term. *Clin Obstet Gynecol.* 1992; 35: 426-36.

Sibai BM, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005; 365(9461):785-99.

Sibai BM. Hypertensive disorders of pregnancy: the United States perspective. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008; 20(2):102-6.

Sikkema JM, Franx A, Bruinse HW, et al. Placental Pathology in Early Onset Preeclampsia and Intra-uterine Growth Restriction in Women With and Without Thrombophilia. *Placenta.* 2002;(4):337-342.

Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2010; 37(2):239-53.

Smith GC, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet*. 2001;357(9273):2002-6

Souza DAD, Fernando A, Bezerra DS, et al. Aumento no material fibrinoide perivilositário nas placentas de gestações com pré-eclâmpsia. 2011;(47):71-77.

Spanos S, Rice S, Karagiannis P, Taylor D, Becker DL, Winston RM, Hardy K. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction*. 2002; 124(3):353-63.

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(11):5555-63.

Unal ER, Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY. Second-trimester angiogenic factors as biomarkers for future-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 197(2):211.e1-4.

van der Merwe JLVD, Hall DR, Wright C, Schubert P, Grové D. Are Early and Late Preeclampsia Distinct Subclasses of the Disease — What Does the Placenta Reveal? *Hypertension in Pregnancy*. 2010; 29(4):457-67

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006; 12(6):642-9.

Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with preeclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1995;102(1):20-5.

Vinnars MT, Wijnaendts LC, Westgren M, Bolte AC, Papadogiannakis N, Nasiell J. Severe preeclampsia with and without HELLP differ with regard to placental pathology. *Hypertension*. 2008; 51(5):1295-9.

Vinnars MT, Nasiell J, Ghazi SAM, Westgren M, Papadogiannakis N. The severity of clinical manifestations in preeclampsia correlates with the amount of placental infarction. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90(3):19-25.

von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003; 22(2):143-8.

Yu CK, Khouri O, Onwudiwe N, Spiliopoulos Y, Nicolaidis KH; Fetal Medicine Foundation Second-Trimester Screening Group. Prediction of pre-eclampsia by uterine artery Doppler imaging: relationship to gestational age at delivery and small-for-gestational age. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008; 31(3):310-3.

Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol*. 2002; 160(4):1405-23.



ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE CITOCINAS E FATORES ANGIOGÊNICOS EM PLACENTA DE GESTANTES PORTADORAS DE PRÉ-ECLÂMPسيا

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS OF CYTOKINES AND ANGIOGENIC FACTORS IN PLACENTA OF PREGNANT WOMEN WITH PREECLAMPSIA

Ingrid Cristina Weel¹; Vanessa Rocha Ribeiro²; Mariana Romão¹; Camila Ferreira Bannwart-Castro¹; Vera Therezinha Medeiros Borges¹; Steven Sol Witkin³; José Carlos Peraçoli¹; Maria Terezinha Serrão Peraçoli²

¹ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia – Faculdade de Medicina- UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-970

² Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brazil, CEP 18618-970

³ Department of Obstetrics and Gynecology - Weill Cornell Medical College – New York Presbyterian Hospital, New York, New York, USA.

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome específica da gravidez que incide entre 5% e 7% das gestantes, sendo considerada a principal causa de morbidade e mortalidade materna e perinatal. A placenta tem papel essencial nessa doença, provavelmente em decorrência de fatores envolvidos na sua formação e desenvolvimento. Além disso, o desbalanço entre a produção de citocinas e de fatores angiogênicos parece contribuir para a patogênese da PE. O presente trabalho teve como objetivos: 1) Determinar a expressão de citocinas pró-inflamatórias: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), citocinas anti-inflamatórias: interleucina-10 (IL-10) e fator de crescimento e transformação-beta 1 (TGF- β_1), de fatores pró-angiogênicos: fator de crescimento placentário (PIGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como de fatores anti-angiogênicos: *fms-like tyrosine-kinase-1* (Flt-1) e Endoglina (Eng) em placentas de gestantes normotensas e com PE; 2) Comparar a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e de fatores pró e anti-angiogênicos em tecido placentário de gestantes portadoras de PE precoce e PE tardia. Foram estudadas 48 gestantes, sendo 16 normotensas e 32 portadoras de PE. As gestantes com PE foram classificadas de acordo com o aparecimento das manifestações clínicas em PE precoce (< 34 semanas de gestação) e PE tardia (\geq 34 semanas de gestação). Um fragmento de placenta foi obtido imediatamente após o parto e preparado para análise imunoistoquímica da expressão de GM-CSF, TNF- α , IL-10, TGF- β_1 , PIGF, VEGF, Flt-1 e Eng por células do tecido placentário. A análise imunoistoquímica revelou expressão de TNF- α mais intensa em placenta de gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas. Entre as pré-eclâmpticas, a maior expressão da citocina foi observada na PE precoce. Ao contrário do TNF- α , a expressão de IL-10 foi mais intensa na placenta de gestantes normotensas. A expressão de TGF- β_1 e GM-CSF não apresentou diferença significativa entre os três grupos estudados. Com relação aos fatores angiogênicos, observou-se expressão significativamente aumentada de VEGF e PIGF em cortes de placenta de gestantes normotensas quando comparadas às portadoras de PE. A intensidade de marcação de PIGF foi significativamente menor na PE precoce do que na PE tardia. A expressão de Flt-1 mostrou-se

aumentada em placentas de gestantes portadoras de PE precoce e tardia e diminuída em gestantes normotensas. Não se observou diferença significativa na expressão de Eng entre gestantes normotensas e portadoras de PE. Os resultados mostram que na placenta de gestantes portadoras de PE ocorre desbalanço entre TNF- α e IL-10 e entre PlGF e VEGF com Flt-1 em comparação às gestantes normotensas. A maior intensidade de expressão de TNF- α e menor de PlGF na placenta de gestantes com PE precoce em comparação com a PE tardia, permite diferenciar essas duas formas da doença e sugere maior comprometimento placentário na PE precoce.

Palavras chave: pré-eclâmpsia, placenta, citocinas, fatores angiogênicos

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a pregnancy-specific syndrome that affects 5% to 7% of pregnant women and is considered the leading cause of maternal and perinatal morbidity and mortality. The placenta seems to play an essential role in this disease, probably due to factors involved in its formation and development. In addition, the imbalance between the production of cytokines and angiogenic factors appears to contribute to the pathogenesis of PE. The objectives of the present study were: 1) to determine the expression of the pro-inflammatory cytokines: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and the anti-inflammatory cytokines: interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1), as well as the pro-angiogenic factors: placental growth factor (PlGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), and the anti-angiogenic factors: *fms-like tyrosine-kinase-1* (Flt-1) and Endoglin (Eng) in placentas from normotensive pregnant and pre-eclamptic women; 2) to compare the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as well as pro and anti-angiogenic factors in placental tissue of pregnant women with early and late-onset PE. Forty-eight pregnant women were studied of whom 16 were normotensive and 32 were pre-eclamptic. Pregnant women with PE were classified according to the onset of clinical manifestations in early-onset PE (<34 weeks gestation) and late-onset PE (\geq 34 weeks gestation). A fragment of placenta was obtained immediately after delivery and prepared for immunohistochemical analysis of GM-CSF, TNF- α , IL-10, TGF- β_1 , PlGF, VEGF, Flt-1 and Eng expression in the placental tissue. Immunohistochemical analysis showed significant high expression of TNF- α in placenta of pregnant women with PE than in normotensive pregnant women. Comparison between pre-eclamptic women showed higher expression of this cytokine in placenta of early-onset PE. Unlike TNF- α , the IL-10 expression was more intense in placenta of normotensive pregnant women. The expression of TGF- β_1 and GM-CSF showed no significant difference among the three groups studied. Expression of the angiogenic factors, VEGF and PlGF was increased in placental sections of normotensive pregnant women when compared with women with PE. The intensity marking of PlGF was significantly lower in placenta of early-onset than late-onset PE. Increased expression of Flt-1 was observed in placentas of patients of both forms of PE and

decreased in normotensive pregnant women. No significant differences were detected between PE and normotensive pregnant women in relation to Eng expression. The results demonstrate an imbalance between TNF- α and IL-10 and between PIGF and VEGF when compared with Flt-1, in placental tissue of pregnant women with PE compared with normotensive pregnant women. The higher and the lower intensity of TNF- α and PIGF expression, respectively, in placenta of pregnant women with early-onset PE allow to differentiate early and late-onset PE and suggest the higher placental involvement in early-onset PE.

Keywords: preeclampsia, placenta, cytokines, angiogenic factors

1. INTRODUÇÃO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma síndrome que incide entre 5% e 7% das gestações, sendo caracterizada por múltiplas alterações no organismo materno e clinicamente identificada por hipertensão arterial e proteinúria, que se manifestam após a 20^a. semana de gestação (Rein et al., 2003; Paternoster et al., 2004; Sibai et al., 2005; Saito et al., 2007; Unal et al., 2007). A PE é classificada em leve e grave, de acordo com sinais e sintomas apresentados pelas gestantes (ACOG, 2002) e, recentemente em PE precoce ou tardia, na dependência do aparecimento das manifestações clínicas antes da 34^a. ou a partir da 34^a. semana de gestação, respectivamente (von Dadelszen et al., 2003; Huppertz, 2008).

Embora a etiologia da PE ainda não esteja claramente definida, acredita-se que sua fisiopatologia é influenciada diretamente pela placenta (Robillard, 2002; Redman & Sargent, 2005). Fundamentada nesse conceito, a literatura sugere a interação de vários mecanismos responsáveis pela característica multisistêmica da doença, tais como: placentação inadequada (Pijnenborg et al., 1983; Royle et al., 2009), disfunção endotelial (Khan et al., 2005), angiogênese insuficiente (Levine et al., 2006), má adaptação imunológica (Dekker & Sibai, 1999), estresse oxidativo (Gupta et al., 2005; Redman & Sargent, 2000; 2005) e resposta inflamatória excessiva (Redman et al., 1999; Redman & Sargent, 2003). Essa inflamação exacerbada contribui significativamente para a fisiopatologia da PE, incluindo disfunção endotelial e placentária (Redman & Sargent, 2005).

Durante a placentação normal, as arteríolas espiraladas maternas são invadidas por células trofoblásticas, resultando em remodelação das mesmas, o que assegura o suprimento sanguíneo adequado para a placenta e o feto. No entanto, em placentas de gestantes com PE essa invasão é inadequada, (Meekins et al., 1994), gerando defeitos na remodelação das arteríolas espiraladas e resultando em má perfusão e isquemia placentária (George & Granger, 2011). Roberts e Hubel (1999) sugerem que a PE se inicia como consequência do baixo fluxo sanguíneo uteroplacentário que resulta em hipóxia placentária. Assim, a placenta tem papel essencial nessa doença, pois problemas na implantação e no processo de placentação culminam em redução da perfusão sanguínea e, portanto, em hipóxia/isquemia placentária (Amash et al., 2007; Gilbert et al., 2008), que também pode causar restrição de crescimento fetal

intrauterino (Hung et al., 2004). Segundo Silasi et al. (2010) a placentação deficiente é seguida da secreção de fatores citotóxicos, que por sua vez induzem disfunção endotelial generalizada.

Assim, na PE, as alterações que causam isquemia/hipoxia placentária estimulam a produção de citocinas inflamatórias que induzem ativação e disfunção endotelial, resultando nos sinais clínicos característicos dessa doença (Royle et al., 2009). A síntese de citocinas pró-inflamatórias decorre da resposta inflamatória sistêmica excessiva com ativação da imunidade inata e adaptativa (Redman et al., 1999; Szarka et al., 2010).

As citocinas são polipeptídeos de 8 - 80kDa, secretados por células da imunidade inata e adaptativa, que atuam de maneira autócrina ou parácrina sobre as diferentes células do organismo. Agem através da sua ligação a receptores específicos na membrana da célula, estabelecendo uma cascata de reações metabólicas que induzem ou inibem inúmeros genes, provocando as mudanças necessárias para o desenvolvimento da resposta imune. Esses mediadores podem facilitar ou prejudicar a implantação e a evolução da gravidez normal, pois estão envolvidos no controle da resposta imune materna e no desenvolvimento fetal (Raghupathy & Kalinka, 2008). Entretanto, quando alteradas podem determinar complicações como abortamento, pré-eclâmpsia e parto prematuro (Orsi & Tribe, 2008).

A interleucina 10 (IL-10) é uma molécula imunossupressora, produzida por células T, monócitos ou macrófagos e células B. É secretada principalmente pelos macrófagos da decídua (Heikkinen et al., 2003) e também por um amplo conjunto de células, incluindo células que não pertencem ao sistema imune (Saraiva & O'Garra, 2010). A IL-10 é uma citocina característica de perfil Th2 com atividade anti-inflamatória e reguladora, que protege a gestação (Saito et al., 2007).

O fator de transformação do crescimento beta ($TGF-\beta_1$) tem importante papel na manutenção da gestação, regulando a diferenciação do trofoblasto e a transformação das arteríolas espiraladas (Ayatollahi et al., 2005). A superfamília do $TGF-\beta_1$ expressa-se acentuadamente no endométrio, associando-se com a proliferação celular, diferenciação, apoptose e remodelação de tecidos, exercendo, assim, papel imunomodulador em eventos celulares envolvidos com a decidualização e desenvolvimento embrionário (Jones et al., 2006).

Os tecidos placentários também expressam citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), potente ativador do endotélio vascular e provável mediador da disfunção endotelial na PE (Rein et al., 2003). Na gestação normal a expressão de TNF- α é baixa e modula a proliferação e invasão trofoblástica das arteríolas espiraladas, mantendo as funções normais da placenta. Porém, quando em excesso, pode restringir essa invasão, associar-se com a gravidade da doença, contribuindo para a fisiopatologia da PE (Knackstedt et al., 2001; Feng et al., 2011).

O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) é uma citocina hematopoiética, potente mediadora da proliferação e diferenciação celular. A presença de GM-CSF é detectada em endométrio e células epiteliais de humanos (Sharpe-Timms et al., 1994). O epitélio uterino é importante fonte de GM-CSF, fato observado em cultura de células placentárias de ratas, onde essa citocina apresenta capacidade de estimular a proliferação celular. Porém, quando presente em concentrações elevadas contribui para a ocorrência de hipóxia placentária, que precede o desenvolvimento da PE (Hayashi et al., 2003).

Embora várias moléculas estejam envolvidas na angiogênese e homeostase vascular da gestação, alguns fatores são mais pesquisados, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento placentário (PIGF), a Endoglina (Eng) e o receptor de VEGF (VEGFR-1) ou *fms-like tyrosine-kinase-1* (Flt-1), todos associados à patogênese da PE (Silasi et al., 2010).

VEGF e PIGF são glicoproteínas envolvidas tanto na angiogênese como na vasculogênese, ou seja, crescimento e formação de novos vasos sanguíneos (Nagy et al., 2003). O VEGF é expresso principalmente no sinciciotrofoblasto e nas células endoteliais dos vasos e capilares do tecido placentário (Lyll et al., 1997; Maynard et al., 2003), enquanto o PIGF é produzido por vários tipos de células e tecidos, entre eles o trofoblasto placentário e o endotélio materno (Vatten et al., 2007). O déficit de produção de PIGF pode resultar em vascularização deficiente, uma vez que essa glicoproteína exerce papel importante no desenvolvimento vascular durante a invasão trofoblástica (Tsatsaris et al., 2003) e durante o desenvolvimento do embrião (Taylor et al., 2003; Dimitrakova et al., 2004; Silasi et al., 2010). Assim, a diminuição de PIGF

circulante pode estar relacionada com menor produção de fatores de crescimento angiogênicos e representar desenvolvimento placentário anormal (Masuyama et al., 2006).

PlGF e VEGF exercem seus efeitos por meio de ligação a receptores específicos VEGFR-1 ou Flt-1, que são receptores do tipo tirosina-quinase. Esse receptor é constituído por um domínio extracelular, uma região transmembrânica e um componente intracelular que contém um domínio de tirosina-quinase. A forma solúvel desse receptor (sFlt-1 ou sVEGFR1) é detectada na circulação, ligando-se tanto ao VEGF como ao PlGF. Assim, quando o sFlt-1 é produzido em altas concentrações, liga-se às moléculas de VEGF e PlGF, impedindo que esses fatores angiogênicos façam interação com seus receptores na membrana celular e desempenhem suas funções fisiológicas, determinando quebra da homeostase endotelial sistêmica, observada na PE (Kendall et al., 1996; Wang et al., 2009; Silasi et al., 2010). Além disso, os níveis de sVEGFR-1 se correlacionam com a gravidade e o tempo de aparecimento da doença (Maynard et al., 2003; Ahmed et al., 2004).

A Endoglina (Eng) ou CD105 é um co-receptor de superfície celular para membros da família do TGF- β_1 (TGF- β_1 e TGF- β_3), que na forma solúvel, exerce efeito inibidor da migração e diferenciação do trofoblasto na placenta (Jones et al., 2006). A concentração da forma solúvel desse co-receptor (sEng) está aumentada no plasma de gestantes com PE, enquanto o nível de TGF- β_1 está diminuído em comparação às gestantes normais (Venkatesha et al., 2006). A interação de sEng com TGF- β_1 pode prejudicar a ligação do TGF- β_1 aos receptores endoteliais, diminuindo a vasodilatação endotelial ativada pela enzima óxido nítrico sintase e comprometendo a ação angiogênica dessa citocina (Venkatesha et al., 2006; Lim et al., 2008).

Uma das hipóteses para o desenvolvimento e patogênese da PE é o desbalanço entre fatores angiogênicos circulantes, caracterizado por elevadas concentrações de sFlt-1 e sEng e baixos níveis de PlGF e VEGF, resultando na disfunção endotelial que determina o aparecimento dos sinais clínicos da doença (Romero et al., 2008; Wang et al., 2009).

Enquanto a determinação plasmática de fatores pró e anti-angiogênicos é amplamente utilizada para avaliar o risco de desenvolvimento de PE (Levine et al., 2006), ou sua associação com complicações da doença (Signore et al., 2006),

pouco se conhece sobre o papel do Flt-1 e da Eng no desenvolvimento da placenta (Gu et al., 2008; Silasi et al., 2010; Munaut et al., 2012).

Apesar dos avanços no estudo do envolvimento de fatores angiogênicos na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, várias questões permanecem sem resposta. Portanto, a análise da expressão de fatores pró e anti-angiogênicos, bem como de citocinas pró e anti-inflamatórias nos tecidos placentários de gestantes com PE poderá trazer importante contribuição ao conhecimento dos mecanismos envolvidos no aparecimento das manifestações clínicas, precoce ou tardia, da pré-eclâmpsia.

2. OBJETIVO

Determinar a expressão de citocinas e de fatores angiogênicos em tecido placentário de gestantes portadoras de PE, e comparar a expressão destes fatores entre PE precoce e tardia.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

Foram coletados, no período de março de 2011 a agosto de 2012, fragmentos de placenta de 16 gestantes normotensas, 16 portadoras de PE precoce e 16 portadoras de PE tardia, que realizaram assistência ao parto na maternidade do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e na maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Botucatu, SP e tiveram a resolução da gestação por cesareana.

A idade gestacional dos grupos estudados foi estabelecida pela data da última menstruação e/ou exame ultrasonográfico precoce (<20 semanas de gestação).

As gestantes foram consideradas portadoras de PE quando, sem antecedente de hipertensão arterial, manifestaram hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) associada à proteinúria (≥ 300 mg em urina coletada durante 24 horas), após a 20^a. semana de gestação (NHBPEP, 2000). A PE foi classificada em precoce ou tardia segundo o momento do diagnóstico das manifestações clínicas,

isto é, antes da 34^a. ou a partir da 34^a. semana de gestação, respectivamente (Hupertz, 2008).

O tamanho amostral calculado considerou a diferença de pelo menos um desvio padrão, com significância de 5% e poder de 80%, entre os resultados obtidos dos grupos de gestantes normotensas, gestantes portadoras de PE precoce e PE tardia com relação à expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores pró e anti-angiogênicos nos tecidos placentários. Assim, foram necessárias, pelo menos, 16 amostras por grupo estudado.

Todas as mulheres envolvidas no estudo foram previamente informadas quanto à finalidade da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo no. 278/11-CEP) (Anexos).

3.2. Critérios de Inclusão

Grupo de gestantes saudáveis (normotensas): Mulheres com gestação única, sem complicações clínicas ou obstétricas;

Grupo estudo (pré-eclâmpsia): Mulheres com gestação única e portadoras de PE, sem outras complicações clínicas ou obstétricas.

3.3. Critérios de Exclusão

Apresentar qualquer intercorrência obstétrica ou clínica, com exceção de PE tais como: gestação gemelar, PE anterior, hipertensão crônica, diabetes, doenças renais, má-formação fetal, doenças infecciosas, soropositividade para HIV e uso de drogas e álcool ou não ter a gestação resolvida no Serviço de Obstetrícia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e/ou na maternidade da Santa Casa de Misericórdia de Botucatu, SP.

3.4. Dosagem da Proteinúria

A proteinúria em urina de 24 horas foi quantificada por método colorimétrico, no sistema de automação Technicon RAXT, do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

3.5. Colheita e processamento das amostras de tecido placentário

A amostra de tecido placentário, abrangendo as faces materna e fetal, foi colhida imediatamente após o parto. Os fragmentos (1 a 2 g) de placenta foram cortados a partir do centro da placenta, em forma de triângulo, com auxílio de um bisturi cirúrgico, logo após a extração da mesma, e foram imediatamente colocados em recipiente estéril, contendo formol tamponado com fosfato a 10% e fixados por 48h. A seguir foram submetidos a processo de lavagem em água corrente por 24h, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina.

3.6. Análise imunoistoquímica

Nas amostras de placenta analisou-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias (GM-CSF e TNF- α), anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β_1), fatores pró-angiogênicos (PIGF e VEGF) e fatores anti-angiogênicos (Eng e Flt-1) por células do tecido placentário. Os cortes do material, incluídos em parafina, com 4 μ m de espessura, foram colocados sobre lâmina histológica, previamente tratada com Vectabond (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Para a desparafinização, hidratação e recuperação antigênica dos cortes foi utilizado solução tampão *Trilogy* (Cell Marque Co, Rocklin, CA, USA) em panela de pressão elétrica (Cell Marque) por 15 min. Em seguida, os cortes foram lavados com salina tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS) e tratados com *Peroxide Block* (Cell Marque) por 10 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena, sendo posteriormente lavados por sucessivos banhos de água destilada e PBS. Em seguida foi realizado o bloqueio de fundo com *Background Block* (Cell Marque) por 10 min seguido por lavagens de água destilada e PBS. Após os bloqueios, os cortes foram incubados por 60 min a 37°C, com anticorpos primários antígeno-específicos: monoclonal murino anti-TNF- α , anti-VEGF, anti-Eng e anti-Flt-1 humanos (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA), policlonal de coelho anti-PIGF, anti-TGF- β_1 e anti-IL-10 humanos (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e monoclonal murino anti-GM-CSF humano (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) diluídos em *Antibody Diluent* (Cell Marque). Após a incubação os cortes foram lavados com banhos de PBS e em seguida submetidos à ação do amplificador de sinal, *Amplifier* para anticorpos murino e de coelho (Cell Marque) por 10 min à 37°C. Para a detecção do anticorpo primário foi utilizado um polímero, o *Polymer Detector* para anticorpo murino e de coelho (Cell Marque) por 10 min a 37°C. Em

seguida os cortes foram lavados com banhos de PBS e incubados por 5 min com a solução reveladora, contendo 10mg de diaminobenzidina (DAB), 0,2 % de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Trizma - base 20mM, HCL 1N (Sigma). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris (Cell Marque) por 20 seg, com posterior banho em água corrente. A desidratação foi feita em banhos de álcool etílico absoluto, álcool 90%, 80% e 70%, clareados em xilol (4 banhos) e montados com lamínulas contendo Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Para a realização do controle negativo da reação o anticorpo primário foi substituído por soro controle negativo de camundongo ou coelho (Cell Marque), contendo o isotipo de imunoglobulina semelhante ao do anticorpo primário empregado.

A expressão das citocinas e fatores angiogênicos foi identificada nos cortes placentários com auxílio de microscópio óptico (Olympus CX-31) com ocular 10X e objetivas de 10, 20 e 40X. Foram fotografados cinco campos aleatórios de cada corte placentário, com objetiva de 20x, que foram analisados empregando-se o software Image J, que quantificou a marcação de citocinas e fatores angiogênicos na unidade de pixels/ μm de área.

3.7. Análise Estatística

Os resultados referentes às características das gestantes normotensas e portadoras de PE precoce e tardia e da análise da expressão de citocinas e fatores angiogênicos em cortes placentários dessas gestantes foram analisados empregando-se testes não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis). Para todas as análises empregou-se o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, CA, USA (2000), com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Características das gestantes

As características das gestantes estudadas estratificadas em normotensas e portadoras de PE precoce e PE tardia encontram-se na Tabela 1.

A idade materna foi semelhante entre os grupos analisados. A idade gestacional do grupo PE precoce foi significativamente diferente dos grupos de gestantes normotensas e com PE tardia. As gestantes com PE precoce apresentaram concentração de proteinúria (4.450 mg/24h) significativamente maior que aquelas com PE tardia (680 mg/24 h) e normotensas (<300 mg/24h).

Tabela 1. Características das gestantes estudadas, estratificadas em PE precoce e tardia.

Características	Gestantes		
	Normotensas n=16	PE precoce < 34 semanas n=16	PE tardia ≥ 34 semanas n=16
Idade materna (anos)	30 (23 – 40)	28 (18 – 39)	29 (17 – 38)
Idade gestacional (semanas)	38 (36 – 40)	32 * (24 – 33)	36 (35 – 40)
Proteinúria (mg/24 horas)	<300	4.450** (330 – 16.500)	680 (310 – 1.400)

Os valores de idade materna, idade gestacional e proteinúria estão expressos em mediana, com os valores mínimo e máximo entre parênteses.

* (p<0,05) vs gestantes normotensas e com PE tardia; ** (p<0,01) vs PE tardia e normotensas (teste de Kruskal-Wallis)

4.2. Local da expressão de citocinas e fatores angiogênicos

A expressão das citocinas e dos fatores angiogênicos em cortes de placenta de gestantes normotensas e de portadoras de PE está representada nas figuras 1 e 2. A concentração dos anticorpos específicos para detecção das

citocinas e fatores angiogênicos por imunistoquímica foi previamente padronizada em cortes placentários de gestantes normotensas e com PE, utilizando-se diferentes concentrações e diluições dos anticorpos. Assim, após a padronização, as concentrações dos anticorpos primários utilizadas foram: monoclonal murino anti-TNF- α [1/1600], anti-VEGF [2,5 ug/mL], anti-Eng [1/2000] e anti-Flt-1 [1,25 ug/mL] humanos (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA); policlonal de coelho anti-PlGF [1/50], anti-TGF- β_1 [1/1000] e anti-IL-10 humanos [1/800] (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) e monoclonal murino anti-GM-CSF humano [1/2000] (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A análise da localização placentária das citocinas mostrou expressão de TNF- α , GM-CSF, IL-10 e TGF- β_1 no citoplasma do sinciciotrofoblasto. TNF- α e GM-CSF foram também detectados no citoplasma do citotrofoblasto, enquanto IL-10 foi expressa no citoplasma de células mesenquimais e TGF- β_1 no endotélio do capilar fetal.

Os fatores pró-angiogênicos VEGF e PlGF apresentaram expressão positiva no citoplasma do sinciciotrofoblasto e endotélio do capilar fetal. VEGF também se mostrou presente no citoplasma de células mesenquimais. Entre os fatores anti-angiogênicos a expressão de Flt-1 ocorreu nas mesmas estruturas que apresentavam VEGF. A marcação para Eng só foi detectada no citoplasma do sinciciotrofoblasto.

A localização das citocinas e dos fatores angiogênicos foi semelhante entre gestantes normotensas e portadoras de PE. A diferença entre os grupos foi evidenciada pela maior ou menor intensidade de expressão desses fatores nas gestantes pré-eclâmpticas.

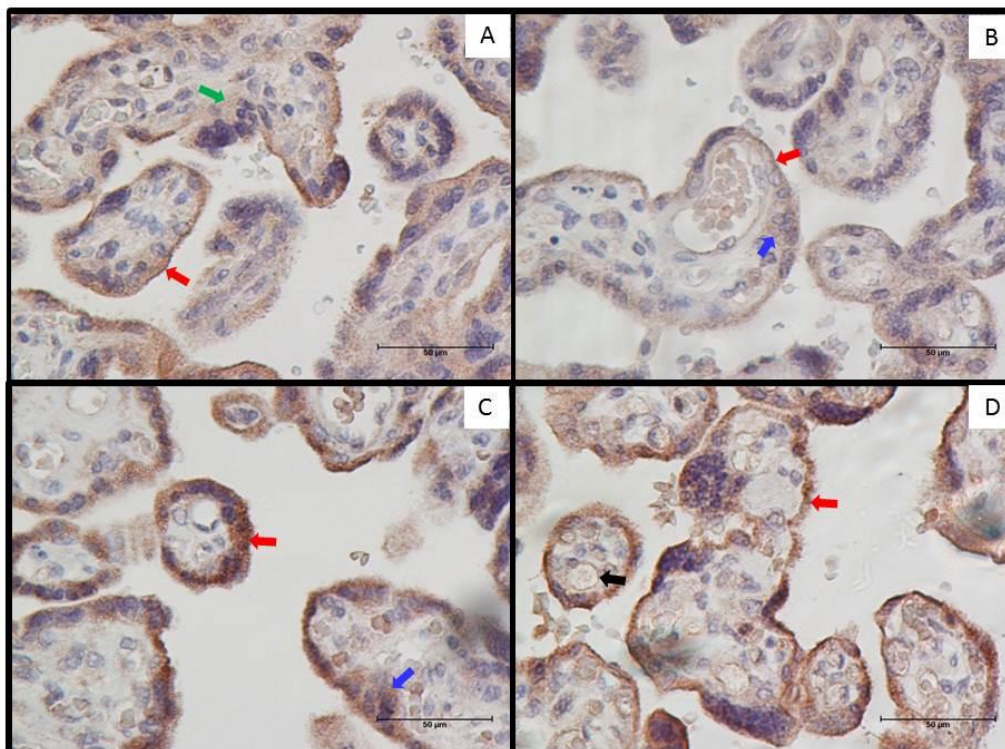


Figura 1. Fotomicrografia representativa da expressão de citocinas em cortes de placenta de gestantes portadoras de PE. A) Vilos de 32 semanas com IL-10 positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha) e citoplasma de células mesenquimais (seta verde). B) Vilos de 37 semanas com GM-CSF positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha) e citoplasma do citotrofoblasto (seta azul). C) Vilos de 37 semanas com TNF- α positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha) e citoplasma do citotrofoblasto (seta azul). D) Vilos de 37 semanas com TGF- β_1 positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha) e endotélio do capilar fetal (seta preta).

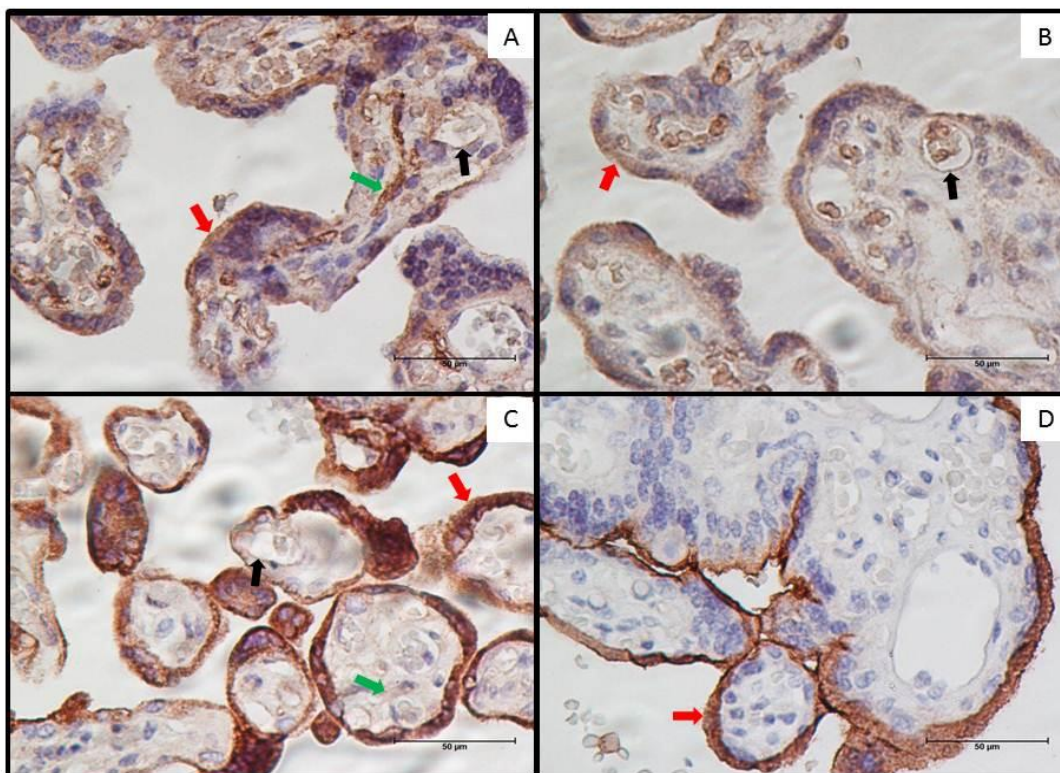


Figura 2. Fotomicrografia representativa da expressão de fatores angiogênicos em cortes de placenta com 37 semanas de gestantes portadoras de PE. A) Vilos com VEGF positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha), endotélio do capilar fetal (seta preta) e citoplasma de células mesenquimais (seta verde). B) Vilos com PlGF positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha) e endotélio do capilar fetal (seta preta). C) Vilos com Flt-1 positivo no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha), endotélio do capilar fetal (seta preta) e citoplasma de células mesenquimais (seta verde). D) Vilos com Endoglina positiva no citoplasma do sinciciotrofoblasto (seta vermelha).

4.3. Análise da expressão quantitativa de citocinas e fatores angiogênicos em cortes histológicos de placenta

A expressão de citocinas e fatores angiogênicos foi avaliada quantitativamente, com base na sua intensidade de marcação nos tecidos placentários, detectada pelo software Image J. A expressão de TNF- α mostrou-se significativamente mais intensa em placenta de gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas, enquanto que a expressão de IL-10 foi maior em gestantes normotensas do que nos dois grupos de gestantes pré-eclâmpticas (Figura 3). Em cortes placentários de pacientes portadoras de PE precoce a marcação do TNF- α foi mais acentuada em comparação com as de PE tardia. A expressão de TGF- β_1 e de GM-CSF em tecido placentário não apresentou diferenças na comparação dos três grupos estudados.

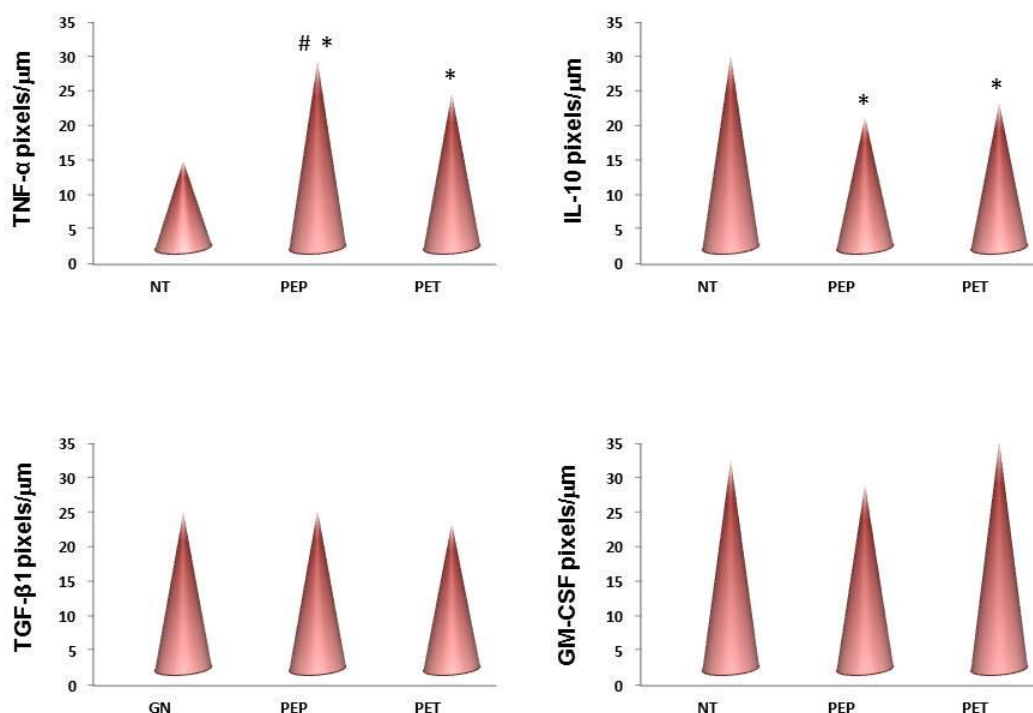


Figura 3. Expressão de citocinas inflamatórias (TNF- α e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β_1) em placenta de gestantes normotensas e de portadoras de PE precoce e de PE tardia. Os resultados são representados em pixels/ μm .

*($p < 0,05$) vs gestantes NT; # ($p < 0,05$) vs PET (teste de Kruskal-Wallis).

NT- Normotensa; PEP- pré-eclâmpsia precoce; PET- pré-eclâmpsia tardia.

A expressão dos fatores angiogênicos VEGF e PlGF mostrou-se significativamente diminuída em placenta de gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas, e o PlGF apresentou diferença significativa entre PE precoce e PE tardia. A expressão de Eng não apresentou diferença significativa entre os grupos. O Flt-1 apresentou aumento de expressão em placenta de gestantes com PE quando comparada às normotensas (figura 4).

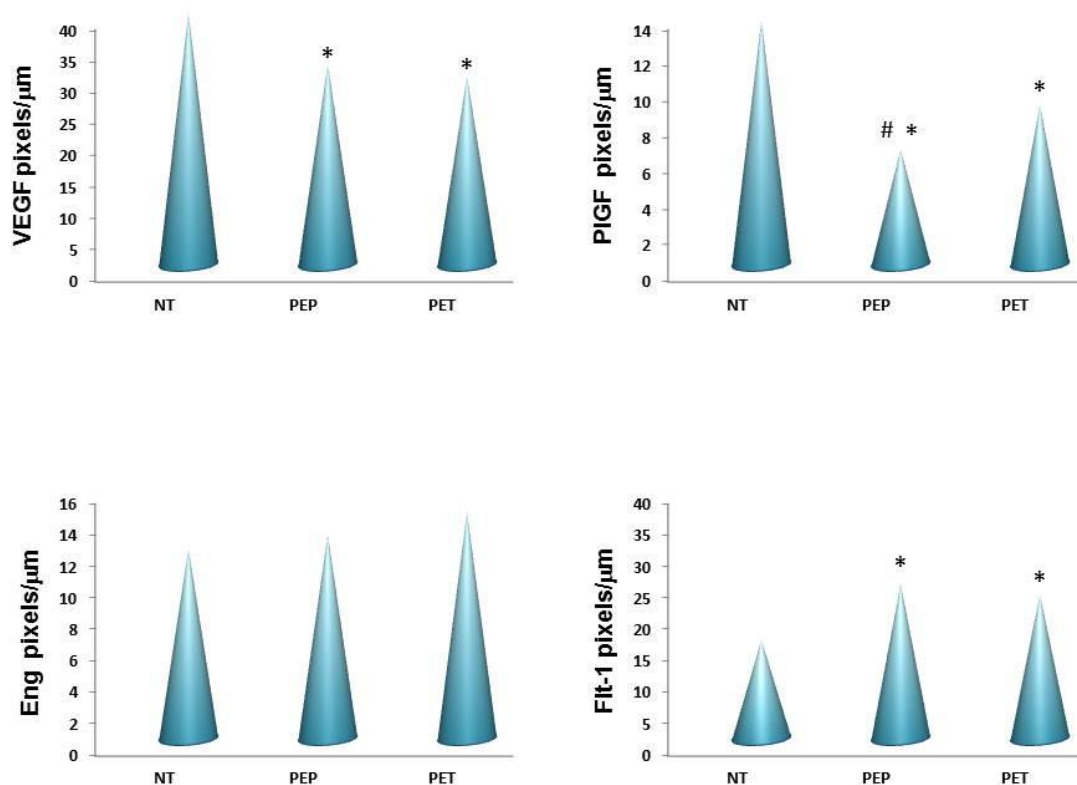


Figura 4. Expressão de fatores pró-angiogênicos (VEGF e PlGF) e anti-angiogênicos (Eng e Flt-1) em placenta de gestantes normotensas, de portadoras de PE precoce e de PE tardia. Os resultados são representados em pixels/μm.

*($p < 0,05$) vs gestantes NT; # ($p < 0,05$) vs PET (teste de Kruskal-Wallis).

NT- Normotensa; PEP- pré-eclâmpsia precoce; PET- pré-eclâmpsia tardia.

5. DISCUSSÃO

A PE está associada com invasão deficiente, das arteríolas espiraladas, pelo citotrofoblasto (Zhou et al., 1998). Conseqüentemente, as células do citotrofoblasto viloso permanecem em ambiente de hipóxia, o que desencadeia a angiogênese anormal observada nessa patologia (Munaut et al., 2008).

No presente estudo avaliamos a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias e de fatores pró e anti-angiogênicos, por imunistoquímica, em placenta de gestantes portadoras de PE, classificadas em PE precoce e tardia. Inicialmente observamos que a localização das citocinas e dos fatores angiogênicos no tecido placentário foi semelhante entre gestantes normotensas e portadoras de PE. Todas as citocinas (TNF- α , GM-CSF, IL-10 e TGF- β_1) foram detectadas no citoplasma do sinciciotrofoblasto. A expressão de TNF- α e GM-CSF foi também observada no citoplasma do citotrofoblasto, enquanto IL-10 esteve presente no citoplasma de células mesenquimais e TGF- β_1 no endotélio do capilar fetal.

Os fatores pró-angiogênicos VEGF e PlGF apresentaram expressão positiva no citoplasma do sinciciotrofoblasto e endotélio do capilar fetal. VEGF também se mostrou presente no citoplasma de células mesenquimais. O fator anti-angiogênico Flt-1 foi detectado nas mesmas estruturas que expressavam VEGF, enquanto Eng só foi detectada no citoplasma do sinciciotrofoblasto.

Enquanto a localização dos fatores e citocinas foi semelhante entre os grupos de gestantes normotensas e pré-eclâmpticas, a diferença entre os grupos foi evidenciada pela maior ou menor intensidade de expressão dessas citocinas e fatores nos tecidos placentários dessas gestantes.

A expressão de citocinas, avaliada por imunistoquímica, na placenta de gestantes normotensas e portadoras de PE tem sido pouco estudada na literatura. Alguns trabalhos mostraram presença de TNF- α no sinciciotrofoblasto, em células do citotrofoblasto, células endoteliais vasculares, células decíduais e do estroma dos vilos (Karfi et al., 2006; Feng et al., 2011; GoksuErol et al., 2012; Zhou et al., 2012). Zhou et al. (2012) avaliaram a expressão de TNF- α em placenta de gestantes normais e com PE pela detecção de mRNA, imunistoquímica e western blot. Os autores verificaram que a localização da citocina foi semelhante na placenta dos dois grupos de gestantes, mas a intensidade da expressão foi

maior na PE. No presente trabalho a expressão de TNF- α mostrou-se significativamente mais intensa em placenta gestantes portadoras de PE quando comparadas às normotensas e, entre as pré-eclâmpticas a expressão foi significativamente maior na PE precoce. Segundo Feng et al. (2011), a expressão de TNF- α é baixa nos tecidos placentários de gestantes normais, sugerindo que a secreção dessa citocina durante a gestação mantém as funções normais da placenta. Os autores detectaram expressão mais acentuada e anormal de TNF- α na placenta e no plasma de gestantes com PE grave, sugerindo que em altas concentrações o TNF- α afeta a proliferação e reconstrução vascular, resultando em isquemia/anoxia e causando o aparecimento e progressão da PE.

Ao contrário da elevada expressão de TNF- α nas gestantes com PE, a quantificação da IL-10 revelou produção significativamente menor de IL-10 em tecido placentário dessas gestantes, quando comparadas às gestantes normotensas, em concordância com os resultados de outros autores (Hennessy et al., 1999; Makris et al., 2006), mostrando que gestantes com PE apresentam deficiência de produção de IL-10 na placenta de termo. Além da menor expressão de IL-10 na placenta, essa citocina apresenta menor concentração na circulação de gestantes portadoras de PE (Freeman et al., 2004; Makris et al., 2006), ou ainda menor produção endógena dessa citocina por monócitos do sangue periférico dessas gestantes (Cristofalo et al., 2013). Estes dados mostram que a produção deficiente da IL-10 na PE pode decorrer da resposta inflamatória sistêmica intensa, na qual a IL-10, estando em baixas concentrações, não consegue exercer, adequadamente, sua ação imunomoduladora observada na gestação normal.

A expressão de TGF- β_1 e de GM-CSF não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados. GM-CSF e TGF- β_1 foram detectados na camada do sinciciotrofoblasto, enquanto o TGF- β_1 também esteve presente no endotélio do capilar fetal. Em placenta de termo de gestantes normais essa citocina é expressa na camada do sinciciotrofoblasto, placa coriônica e trofoblasto extraviloso (Schilling & Yeh, 2000). Na literatura, a expressão de TGF- β_1 em placenta de gestantes com PE é controversa, podendo estar aumentada em relação às gestantes normotensas (Benian et al., 2002; Wang et al., 2006), ou não alterada, sugerindo que esta citocina pode não estar envolvida na fisiopatologia

da PE (Lyll et al., 2001). Com relação ao GM-CSF, Hayashi et al. (2004) observaram níveis mais elevados da citocina em homogenato de placenta e no soro de gestantes portadoras de PE, em comparação às gestantes normais. Na literatura não há relatos da expressão de GM-CSF em placenta de gestantes pré-eclâmpticas detectada por imunistoquímica. A discrepância entre nossos resultados e os de Hayashi et al. (2004) podem estar relacionados à determinação de GM-CSF por diferentes métodos. A maior concentração da citocina encontrada no soro das gestantes poderia contribuir para os valores mais elevados, detectados no homogenato da placenta por esses autores.

Os processos de angiogênese e vasculogênese são dependentes de importantes fatores de crescimento endotelial. Durante a gravidez normal, a homeostasia vascular é mantida pela liberação de níveis fisiológicos de VEGF na circulação materna (Ebos et al., 2004), que juntamente com o PIGF, encontram-se em altas concentrações em grávidas normais e em baixas concentrações nas pacientes com PE (Maynard et al., 2003; Venkatesha et al., 2006; Zhou et al., 2010). No presente trabalho, observamos que tanto VEGF quanto PIGF apresentaram expressão significativamente diminuída no sinciciotrofoblasto e no endotélio do capilar fetal da placenta de gestantes portadoras de PE quando comparadas às gestantes normotensas. Esses resultados sugerem a ocorrência de anormalidades no crescimento e formação de novos vasos e, conseqüentemente, anomalia na remodelação vascular placentária, principalmente em gestantes portadoras de PE precoce que apresentaram menor intensidade de expressão de PIGF em relação às gestantes com PE tardia. A expressão de PIGF no citoplasma do sinciciotrofoblasto e no estroma de vilos placentários, semelhante em gestantes portadoras de PE e em gestantes normais também foi descrita por Shen et al. (2006). Entretanto, esses autores também observaram menor expressão desse fator angiogênico em placenta de gestantes com PE leve ou grave quando comparadas às gestantes normais. A menor expressão de PIGF (Weed et al., 2012) e VEGF (Kim et al., 2012), em tecido placentário de gestantes portadoras de PE sugerem que esses fatores angiogênicos estão associados com a patogênese da PE.

Um balanço adequado entre os fatores angiogênicos VEGF e PIGF com seus receptores específicos é importante para a vasculogênese efetiva, angiogênese e desenvolvimento da placenta durante a gestação (Tripathi et al.,

2008). Por outro lado, a alteração desse balanço está associada com disfunção endotelial e a síndrome da PE (Bdolah et al., 2004).

Nossos resultados mostraram padrão mais intenso de marcação de Flt-1, receptor de VEGF, nos tecidos placentários de gestantes portadoras de PE do que nas normotensas, em concordância com outros autores (Munaut et al., 2012). Durante a gestação, a placenta é a principal fonte de sFlt-1 na circulação materna (Maynard et al., 2003), sendo essa produção maior na placenta de gestantes com PE em comparação com gestantes normais (Gu et al., 2008). Tripathi et al. (2008) verificaram maior expressão de VEGFR-1 (Flt-1) em várias estruturas placentárias, tais como sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto, células de Hofbauer e células endoteliais de ambos os grupos de gestantes com PE precoce e tardia, em comparação com gestantes normais, além de maior concentração da forma solúvel desse fator anti-angiogênico na circulação de gestantes com PE. Outros estudos apontam que níveis de sFlt-1 materno estão aumentados em gestantes portadoras de PE, principalmente em PE grave e PE precoce (Powers et al., 2005; Levine et al., 2004). Assim, a alta sensibilidade e especificidade dos testes para determinação de sVEGFR-1 ou sFlt-1 no plasma de gestantes portadoras de PE, pode sugerir o emprego desse biomarcador para diagnóstico da PE precoce (Tripathi et al., 2008).

Em concordância com outros autores a Eng foi detectada no sinciciotrofoblasto (Gougos et al., 1992), porém não apresentou diferença significativa entre os grupos de gestantes pré-eclâmpticas e normotensas. Estudos *in vitro* foram realizados por Munaut et al. (2008) para avaliar o efeito das condições de hipóxia (1% O₂) e normoxia (20% O₂) sobre a síntese de PlGF, VEGFR-1 e Eng em cultura de vilos de placenta de primeiro trimestre. Os resultados mostraram expressão de VEGFR-1 e síntese de sVEGFR-1 aumentadas e expressão diminuída de PlGF, enquanto a de Eng não foi alterada. Esses resultados suportam a hipótese de que na PE a maior produção de VEGFR-1 pelos tecidos placentários está associada às condições de hipóxia, sendo responsável pela depleção de VEGF na circulação materna; os baixos níveis de PlGF estão relacionados não apenas à neutralização por VEGFR-1, mas também à menor produção de mRNA e da proteína induzidas pela hipóxia, enquanto a Eng não é modulada pela hipóxia. Assim, diferentes mecanismos patogênicos placentários podem estar envolvidos na

expressão diferencial e síntese de sVEGFR-1 e sEng nas gestantes portadoras de PE.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostram que na placenta de gestantes portadoras de PE ocorre desbalanço entre TNF- α e IL-10 e entre PlGF e VEGF com Flt-1, em comparação às gestantes normotensas. A maior intensidade de expressão de TNF- α e menor PlGF na placenta de gestantes com PE precoce permite diferenciar essas duas formas da doença e sugere maior comprometimento placentário na PE precoce.

6. REFERÊNCIAS

Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res.* 2004;29;95(9):884-91.

Amash A, Huleihel M, Sheiner E, Sapir O, Holcberg G. Preeclampsia as a maternal vascular disease. *Harefuah.* 2007; 146(9):707-12.

American College of Obstetricians and Gynecologists. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. ACOG Practice Bulletin no. 33. Washington, DC.: ACOG; 2002.

Ayatollahi M, Geramizadeh B, Samsami A. Transforming growth factor beta-1 influence on fetal allografts during pregnancy. *Transplant Proc.* 2005; 37(10):4603-4.

Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: newer insights. *Semin Nephrol.* 2004;24(6):548-56.

Benian A, Madazli R, Aksu F, Uzun H, Aydin S. Plasma and placental levels of interleukin-10, transforming growth factor-beta1, and epithelial-cadherin in preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2002;100(2):327-31.

Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11(5):309-16.

Cristofalo R, Bannwart-Castro CF, Magalhães CG, Borges VT, Peraçoli JC, Witkin SS, Peraçoli MT. Silibinin attenuates oxidative metabolism and cytokine production by monocytes from preeclamptic women. *Free Radic Res.* 2013 Jan 15.

Dekker GA, Sibai BM. The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol.* 1999; 23(1):24-33.

Dimitrakova ED, Dimitrakov JD, Karumanchi SA, Pehlivanov BK, Milchev NP, Dimitrakov DI. Placental soluble fms-like tyrosine-kinase-1 (sFlt-1) in pregnant women with preeclampsia. *Folia Med.* 2004; 46(1):19-21.

Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res.* 2004; 2(6): 315-26.

Feng C, Tao Y, Shang T, Yu M. Calprotectin, RAGE and TNF- α in hypertensive disorders in pregnancy: expression and significance. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;283(2):161-6.

Freeman DJ, McManus F, Brown EA, Cherry L, Norrie J, Ramsay JE, Clark P, Walker ID, Sattar N, Greer IA: Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension* 2004; 44(5):708–714.

George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. *Curr Hypertens Rep* 2011;13(4):269-75.

Gilbert JS, Ryan MJ, La Marca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(2):H541-50.

Goksu Erol AY, Nazli M, Yildiz SE. Expression levels of cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor- α and inducible NO synthase in placental tissue of normal and preeclamptic pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(6):826-30.

Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Bühring HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol.* 1992;4(1):83-92.

Gu Y, Lewis DF, Wang Y. Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):260-6.

Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv.* 2005; 60(12):807-16.

Hayashi M, Ohkura T, Inaba N. Increased levels of serum macrophage colony-stimulating factor before the onset of preeclampsia. *Horm Metab Res.* 2003; 35(10):588-92.

Hayashi M, Hamada Y, Ohkura T. Elevation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the placenta and blood in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(2):456-61.

Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O: Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* 2003, 131(3):498–505

Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor- α from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol.* 2004;164(3):1049-61.

Hennessey A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol.* 1999;163(6):3491-5.

Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008; 51(4):970-5.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*. 2006;132(2):217-32.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 226(2):324-8.

Khan F, Belch JJ, MacLeod M, Mires G. Changes in endothelial function precede the clinical disease in women in whom preeclampsia develops. *Hypertension*. 2005; 46(5):1123-8.

Kharfi A, Bureau M, Giguère Y, Moutquin JM, Forest JC. Dissociation between increased apoptosis and expression of the tumor necrosis factor-alpha system in term placental villi with preeclampsia. *Clin Biochem*. 2006;39(6):646-51.

Kim SC, Park MJ, Joo BS, Joo JK, Suh DS, Lee KS. Decreased expressions of vascular endothelial growth factor and visfatin in the placental bed of pregnancies complicated by preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res*. 2012;38(4):665-73.

Knackstedt M, Ding JW, Arck PC, Hertwig K, Coulam CB, August C, Lea R, Dudenhausen JW, Gorczynski RM, Levy GA, Clark DA. Activation of the novel prothrombinase, fg12, as a basis for the pregnancy complications spontaneous abortion and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2001;46(3):196-210.

Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP et al. Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*. 2006; 355(10):992-1005.

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med*. 2004; 350(7):672-83.

Lim JH, Kim SY, Park SY, Yang JH, Kim MY, Ryu HM. Effective prediction of preeclampsia by a combined ratio of angiogenesis-related factors. *Obstet Gynecol*. 2008;111(6):1403-9.

Lyll F, Greer IA, Boswell F, et al. Suppression of serum vascular endothelial growth factor immune reactivity in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*, 1997,104(2):223-228.

Lyll F, Simpson H, Bulmer JN, Barber A, Robson SC. Transforming growth factor-beta expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol*. 2001;159(5):1827-38.

Makris A, Xu B, Yu B, Thornton C, Hennessy A. Placental deficiency of interleukin-10 (IL-10) in preeclampsia and its relationship to an IL10 promoter polymorphism. *Placenta*. 2006;27(4-5):445-51.

Masuyama H, Suwaki N, Nakatsukasa H, Masumoto A, Tateishi Y, Hiramatsu Y. Circulating angiogenic factors in preeclampsia, gestational proteinuria, and preeclampsia superimposed on chronic glomerulonephritis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 194(2):551-6.

Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria. *J Clin Invest* 2003,111(5):649-658 preeclampsia.

Meekins JW, Pijnenborg R, Hanssens M, McFadyen IR, van Asshe A. A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol*. 1994;101(8):669-74.

Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Blacher S, Berndt S, Frankenne F, Foidart JM. Hypoxia is responsible for soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) but not for soluble endoglin induction in villous trophoblast. *Hum Reprod*. 2008;23(6):1407-15.

Munaut C, Lorquet S, Pequeux C, Coulon C, Le Goarant J, Chantraine F, Noël A, Goffin F, Tsatsaris V, Subtil D, Foidart JM. Differential expression of Vegfr-2 and its soluble form in preeclampsia. *PLoS One*. 2012;7(3):e3347.

Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(5):169-75

National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(1):S1-S22.

Orsi NM, Tribe RM. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20(4):462-9.

Paternoster DM, Fantinato S, Manganelli F, Nicolini U, Milani M, Girolami A. Recent progress in the therapeutic management of pre-eclampsia. *Expert Opin Pharmacother*. 2004; 5(11):2233-9.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Brosens I. Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*. 1983; 4(4):397-413.

Powers RW, Roberts JM, Cooper KM, 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* 2005;193(1):185–91.

Raghupathy R, Kalinka J. Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. *Front Biosci*. 2008; 13:985-94.

Redman CW, Sacks GP, Sargent IL: Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 180:499-506.

Redman CW, Sargent IL. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*. 2000; 21(7):597-602.

Redman CW, Sargent IL. Preeclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta*. 2003; 24(suppl A):S21-S27.

Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308(5728):1592-4.

Rein DT, Breidenbach M, Hönsheid B, Friebe-Hoffmann U, Engel H, Göhring UJ et al. Preeclamptic women are deficient of interleukin-10 as assessed by cytokine release of trophoblast cells in vitro. *Cytokine*. 2003; 23(4-5):119-25.

Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet* 1999;354 (9181):788-9.

Robillard PY. Interest in preeclampsia for researchers in reproduction. *J Reprod Immunol*. 2002; 53(1-2):279-87.

Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, Kusanovic JP, Gotsch F, Erez O, Mazaki-Tovi S, Gomez R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Levine RJ, Karumanchi SA. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small for gestational age neonate. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008;21(1):9-23.

Royle C, Lim S, Xu B, Tooher J, Ogle R, Hennessy A. Effect of hypoxia and exogenous IL-10 on the pro-inflammatory cytokine TNF-alpha and the anti-angiogenic molecule soluble Flt-1 in placental villous explants. *Cytokine*. 2009; 47(1):56-60.

Saito S, Shiozaki A, Nakashima A, Sakai M, Sasaki Y. The role of the immune system in preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2007; 28(2):192-209.

Saraiva, M., O'Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2010; 10(3):170-181.

Schilling B, Yeh J. Transforming growth factor-beta(1), -beta(2), -beta(3) and their type I and II receptors in human term placenta. *Gynecol Obstet Invest*. 2000;50(1):19-23.

Sharpe-Timms KL, Bruno PL, Penney LL, Bickel JT. Immuno- histochemical localization of granulocyte-macrophage colony- stimulating factor in matched endometriosis and endometrial tissues. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:740-5.

Shen H, Liu H, Chen H, Guo Y, Zhang M, Xu X, Xiang W. Analysis of placental growth factor in placentas of normal pregnant women and women with hypertensive disorders of pregnancy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26(1):116-9.

Sibai B, Dekker G, Kupfermink M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005; 365(9461):785-99.

Signore C, Mills JL, Qian C, Yu K, Lam C, Epstein FH, Karumanchi SA, Levine RJ. Circulating angiogenic factors and placental abruption. *Obstet Gynecol*. 2006; 108(2):338-44.

Silasi M, Cohen B, Karumanchi SA, Rana S. Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010; 37(2):239-53.

Szarka A, Jr JR, Lázár L, Bekő G, Molvarec A. Circulating cytokines , chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunology*. 2010;11(1):59.

Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188(1):177-82.

Tripathi R, Rath G, Jain A, Salhan S. Soluble and membranous vascular endothelial growth factor receptor-1 in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Ann Anat*. 2008;20;190(5):477-89.

Tsatsaris V, Goffin F, Munaut C, Brichant JF, Pignon MR, Noel A, Schaaps JP, Cabrol D, Frankenne F, Foidart JM. Overexpression of the soluble vascular endothelial growth factor receptor in preeclamptic patients: pathophysiological consequences. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(11):5555-63.

Unal ER, Robinson CJ, Johnson DD, Chang EY. Second-trimester angiogenic factors as biomarkers for future-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 197(2):211.e1-4.

Vatten LJ, Eskild A, Nilsen TI, Jeansson S, Jenum PA, Staff AC. Changes in circulating level of angiogenic factors from the first to second trimester as predictors of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 196(3):239.e1-6.

Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006;12(6):642-9.

von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003; 22(2):143-8.

Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2009; 24:147-58.

Wang Y, Zhang X, Cheng GM, Ren CC. Expression of transforming growth factor-beta 1, vascular cell adhesion molecule-1 and endothelium-selectin in placenta of patients with pre-eclampsia]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2006;41(8):514-7.

Weed S, Bastek JA, Anton L, Elovitz MA, Parry S, Srinivas SK. Examining the correlation between placental and serum placenta growth factor in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(2):140.

Zhou Y, Genbacev O, Damsky CH, Fisher SJ. Oxygen regulates human cytotrophoblast differentiation and invasion: implications for endovascular invasion in normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Reprod Immunol*. 1998;39(1-2):197-213.

Zhou Q, Liu H, Qiao F, Wu Y, Xu J. VEGF deficit is involved in endothelium dysfunction in preeclampsia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2010;30(3):370-4.

Zhou P, Luo X, Qi HB, Zong WJ, Zhang H, Liu DD, Li QS. The expression of pentraxin 3 and tumor necrosis factor-alpha is increased in preeclamptic placental tissue and maternal serum. *Inflamm Res*. 2012;61(9):1005-12.



Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 04 de julho de 2011.

Of. 278/11-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Maria Terezinha Serrão Peraçoli
Departamento de Micro/Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu.

Prezada Dr^a Terezinha,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 3923-2011) "Análise imunohistoquímica de citocinas e de fatores pró e anti-angiogênicos em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia", a ser conduzido por Ingrid Cristina Well, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pelo Prof. Titular José Carlos Peraçoli, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 04 de Julho de 2.011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Análise imunoistoquímica de citocinas e de fatores pró e anti-angiogênicos em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia" aprovado pelo CEP em 04/07/2011, teve seu título alterado para "Alterações histopatológicas e expressão de citocinas e de fatores angiogênicos em placenta de gestantes portadoras de pré-eclâmpsia", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 16/01/2013

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) 
Ingrid Cristina Weel

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) 
Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Programa de Pós Graduação em Ginecologia Obstetrícia e Mastologia.