

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/08/2027.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMOLECULARES E
FARMACOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

Luís Fernando Pereira Passeti

**Investigação do papel da Metformina na angiogênese e disfunção endotelial
em modelo *in vitro* de pré-eclâmpsia**

Prof^a Dr^a Valéria Cristina Sandrim
Dr^a Priscila Rezeck Nunes

Botucatu – SP
2026

Luís Fernando Pereira Passeti

**Investigação do papel da Metformina na angiogênese e disfunção endotelial
em modelo *in vitro* de pré-eclâmpsia**

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biomoleculares e Farmacológicas do
Instituto de Biociências de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valéria Cristina Sandrim
Coorientadora: Dr^a Priscila Rezeck Nunes

P287i Passeti, Luís Fernando Pereira
Investigação do papel da Metformina na angiogênese e
disfunção endotelial em modelo in vitro de pré-eclâmpsia / Luís
Fernando Pereira Passeti. -- Botucatu, 2026
59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Valéria Cristina Sandrim
Coorientadora: Priscila Rezeck Nunes

1. pré-eclâmpsia. 2. metformina. 3. angiogênese. 4.
disfunção endotelial. 5. estresse oxidativo. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Investigação do papel da Metformina na angiogênese e disfunção endotelial em modelo *in vitro* de pré-eclâmpsia

AUTOR: LUÍS FERNANDO PEREIRA PASSETI

ORIENTADORA: VALÉRIA CRISTINA SANDRIM **COORIENTADORA:** PRISCILA REZECK NUNES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Farmacologia e Biotecnologia pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALÉRIA CRISTINA SANDRIM (Participação Presencial)
Departamento de Biofísica e Farmacologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - IBB

Pesquisador PEDRO VARGAS PINILLA (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Imunologia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. MARIANA ROMÃO VEIGA (Participação Presencial)
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia / Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP Câmpus de Botucatu

Botucatu, 23 de fevereiro de 2026.



Flávia Danieli Martins Godinho
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Financiamento



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), N° processo 2024/13523-6, 2021/12010-7, 2024/01935-8, 2024/03439-8, 2024/10080-6.



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), N° processos 308504/2021-6, e 444682/2024-4.



Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) N° processos 88887.948965/2024-00.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Simone e João Luís, e aos meus avós maternos, Maria Alaide e Elmo, e paternos, Maria Aldair e João Delcides. Vocês são minha fonte de admiração e meu alicerce. Agradeço pelo amor e pelo apoio incondicional; se hoje cheguei até aqui, foi por vocês, que não mediram distâncias nem esforços para que eu pudesse crescer e sonhar. Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e resiliência que me sustentaram ao longo de toda a caminhada até aqui.

Aos meus pais, Simone e João Luís, cujo apoio incondicional foi imprescindível para que eu chegasse até este momento.

Ao meu irmão mais novo, João Pedro, que carinhosamente me chama de “tato”. Amo você e tenho muito orgulho de ti. Sou grato pela nossa relação e pelo seu apoio, sempre expresso à sua maneira única.

À minha avó Maria Aldair (*in memoriam*), a quem tanto admiro, pelo carinho, pela paixão em ensinar e pela devoção ao próximo. Sei que, mesmo após a partida, continua a torcer por mim.

A toda a minha família (avôs, avó, tios, tias, primos e primas), pelo incentivo constante e pelas conquistas compartilhadas. Em especial, à minha tia Edna e a seu marido, Raul, pelo apoio e incentivo aos estudos.

Ao meu namorado, Gustavo, por ser paz em meio à tempestade, por sempre me lembrar do quanto sou capaz e de tudo o que já alcancei. Obrigado pelo companheirismo, pela amizade, por tudo o que fez e faz por mim e, principalmente, por ser quem você é.

À minha amiga Mariana, cuja amizade começou no laboratório e hoje se estende à vida cotidiana. Dividimos não só a bancada, mas também um lar. Obrigado por me ouvir, acolher e apoiar. Admiro você e tenho muito orgulho da nossa amizade.

As minhas amigadas, Adriane, Aline Rodrigues, Aline Salgueiro, Ana Maria, Carolina, Caio, Daniela, Estefani, Fellipe, Fernanda, Gabriela Franco, Gabriela Ribeiro, Gabriela Zampieri, Heloísa, Isabella, Isadora, Julyane, Karoliny, Laisla, Larissa, Leilane, Leonardo, Letícia, Mariana, Matheus Candil, Mateus Machado, Millena, Nina, Pedro, Priscila, Sheron, Thainá, Vinicius, Vitor por serem presença, apoio e acolhimento em todos os momentos. Obrigado por caminharem comigo, por ouvirem, incentivarem e tornarem essa jornada mais leve, mesmo nos dias mais difíceis. É muito especial crescer e acompanhar o crescimento de vocês.

À minha coorientadora, Dr^a Priscila Rezeck Nunes, pela parceria, amizade e apoio ao longo desta trajetória. Sua disponibilidade, generosidade e dedicação

foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela confiança e pelos ensinamentos. Sou grato por termos caminhado juntos nesses dois anos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Valéria Cristina Sandrim, por me acolher e integrar à sua equipe de pesquisa. Agradeço pela confiança depositada em mim e em meu trabalho, bem como pelo incentivo à construção do conhecimento científico.

Ao Departamento de Biofísica e Farmacologia, em especial às minhas amigas de laboratório (Priscila, Daniela, Thainá, Mariana, Gabriela, Karoliny e Juliany), pelo apoio e companheirismo, que tornaram essa jornada mais leve. Agradeço também a todos os professores, técnicos e servidores do departamento pela colaboração e convivência.

Ao Laboratório de Imunologia da Reprodução, em especial à Dr^a Vanessa Rocha Ribeiro Vasques, Dr^a Mariana Romão Veiga e à amiga Gabriela de Oliveira Franco, pelo acolhimento durante o período de reforma do departamento, pelas trocas de conhecimento e pela amizade.

À Dr^a. Larissa Ragozo Cardoso de Oliveira, por me auxiliar na execução e análise de uma parte fundamental do meu trabalho, por destinar o seu tempo para participar desta pesquisa.

À minha psicóloga, Vanessa Carmo, pelo acompanhamento ao longo desses anos. Obrigado por caminhar comigo na jornada de autoconhecimento e por contribuir para que eu me tornasse uma versão melhor de mim mesmo.

Às gestantes que aceitaram participar deste estudo. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB/UNESP) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, por viabilizarem a realização deste trabalho.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, pela disponibilidade, simpatia, gentileza e eficiência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a realização deste projeto (Processo nº 2024/03439-8).

A todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha trajetória e contribuíram para minha formação pessoal e profissional, meu sincero agradecimento.

Epígrafe

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê
Arthur Schopenhauer

RESUMO

A pré-eclâmpsia (PE) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materna-fetal no mundo e se caracteriza por hipertensão após a 20ª semana de gestação, associada à proteinúria e/ou disfunção de órgãos-alvo. Quando diagnosticada antes da 34ª semana, classifica-se como PE precoce (PEP), e a partir desse período, como PE tardia (PET). A fisiopatologia da PE envolve invasão trofoblástica deficiente, o que compromete a remodelação das arteríolas espirais, leva a hipóxia placentária e a liberação de fatores antiangiogênicos, como sFlt-1 e sENG. A metformina (MET), fármaco utilizado no tratamento do diabetes tipo 2 e na síndrome do ovário policístico, apresenta efeitos vasculares e anti-inflamatórios e tem sido considerada uma potencial estratégia terapêutica na PE. Neste estudo, investigamos os efeitos da MET sobre vias angiogênicas, estresse oxidativo e função endotelial em HUVECs incubadas com plasma de gestantes saudáveis (GS) e com PE em diferentes períodos gestacionais. Tratamos HUVECs com MET (1 μ M) e as incubamos por 24 h com plasma de gestantes saudáveis precoce (GSP), saudáveis tardia (GST), pré-eclâmpicas precoce (PEP) e pré-eclâmpicas tardia (PET). Avaliamos a expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 por citometria de fluxo e a expressão de VEGF por qPCR. Analisamos o estresse oxidativo e a capacidade antioxidante por ensaios fluorimétricos e colorimétricos, o potencial de membrana mitocondrial e o mtROS por citometria de fluxo, os níveis de sFlt-1 e sENG por ELISA e a migração celular pelos ensaios de *wound healing* e *transwell*. As HUVECs incubadas com plasma de PEP apresentaram aumento dos níveis de sFlt-1 e sENG em relação ao grupo GSP, e a MET reduziu os níveis de sFlt-1. A expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 não diferiu entre os grupos. As HUVECs incubadas com plasma de PET apresentaram maior expressão de VEGF em comparação ao grupo GST, e a MET mostrou tendência de aumento dessa expressão nas HUVECs incubadas com plasma de PEP. No ensaio de *transwell*, HUVECs tratadas com plasma de PEP apresentaram menor migração celular em comparação ao grupo GSP, e a MET melhorou esse processo. No ensaio de *wound healing*, não observamos diferenças entre os grupos. A MET aumentou a capacidade antioxidante e o potencial de membrana mitocondrial principalmente no grupo PET, sem alterar significativamente o mtROS. Em conjunto, os resultados indicam que a MET modula predominantemente vias angiogênicas na PEP, evidenciadas pela redução de sFlt-1 e pela melhora da migração celular, e mecanismos relacionados ao estresse oxidativo na PET, caracterizados pelo aumento da capacidade antioxidante e do potencial de membrana mitocondrial. Esses achados sugerem que a MET exerce um papel modulador na disfunção endotelial associada à PE e reforçam seu potencial terapêutico nesse contexto.

Palavras-chave: pré-eclâmpsia, metformina, angiogênese, disfunção endotelial, estresse oxidativo

Abstract

Pre-eclampsia (PE) is a major cause of maternal and fetal morbidity and mortality worldwide and is characterized by hypertension after the 20th week of gestation, associated with proteinuria and/or target organ dysfunction. PE is classified as early-onset (PEP) when diagnosed before the 34th week of gestation and as late-onset (PET) when diagnosed thereafter. The pathophysiology of PE involves impaired trophoblastic invasion and inadequate spiral artery remodeling, resulting in placental hypoxia and the release of antiangiogenic factors, including sFlt-1 and sENG. Metformin (MET), a drug widely used in the treatment of type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome (PCOS), exhibits vascular and anti-inflammatory properties and has emerged as a potential therapeutic strategy in PE. In this study, we investigated the effects of MET on angiogenic signaling, oxidative stress, and endothelial function in HUVECs incubated with plasma from healthy pregnant women (GS) and women with PE at different gestational stages. HUVECs were treated with MET (1 μ M) and incubated for 24h with plasma from early healthy pregnant women (GSP), late healthy pregnant women (GST), early pre-eclamptic women (PEP), and late pre-eclamptic women (PET). VEGFR-1 and VEGFR-2 expressions were assessed by flow cytometry, and VEGF expression by qPCR. Oxidative stress and antioxidant capacity were evaluated using fluorimetric and colorimetric assays; mitochondrial membrane potential and mtROS were analyzed by flow cytometry; sFlt-1 and sENG levels were quantified by ELISA; and cell migration was assessed using wound healing and transwell assays. HUVECs incubated with PEP plasma exhibited increased sFlt-1 and sENG levels compared with the GSP group, whereas MET reduced sFlt-1 levels. VEGFR-1 and VEGFR-2 expressions did not differ among groups. HUVECs incubated with PET plasma showed increased VEGF expression compared with the GST group, and MET tended to enhance VEGF expression in HUVECs incubated with PEP plasma. In the transwell assay, PEP plasma reduced endothelial cell migration compared with the GSP group, and MET improved this response. No differences were observed among groups in the wound healing assay. MET increased antioxidant capacity and mitochondrial membrane potential predominantly in the PET group, without significantly affecting mtROS levels. Collectively, these findings indicate that MET preferentially modulates angiogenic pathways in PEP, evidenced by reduced sFlt-1 levels and improved endothelial migration, and oxidative stress-related mechanisms in PET, characterized by enhanced antioxidant capacity and mitochondrial membrane potential. These results suggest that MET exerts a modulatory effect on endothelial dysfunction associated with PE and supports its therapeutic potential in this context.

Keywords: pre-eclampsia, metformin, angiogenesis, endothelial dysfunction, oxidative stress

LISTA DE ABREVIações E SIGLA

- AMP** – *Adenosine monophosphate*, adenosina monofosfato
- AMPK** – *AMP-activated protein kinase*, proteína quinase ativada por AMP
- ANOVA** – *Analysis of variance*, análise de variância
- ATP** – *Adenosine triphosphate*, trifosfato de adenosina
- DCF** – *Dichlorofluorescein*, diclorofluoresceína
- DCFH-DA** – *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate*, diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
- DNA** – *Deoxyribonucleic acid*, ácido desoxirribonucleico
- ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ensaio de Imunoabsorção Enzimática, ensaio imunoenzimático
- eNOS** – *Endothelial nitric oxide synthase*, sintase endotelial do óxido nítrico
- GSP** – Gestantes saudáveis “precoce”
- GST** – Gestantes saudáveis “tardia”
- GS** – Gestantes saudáveis
- HIF-1** – *Hypoxia-Inducible Factor 1*, fator induzível por hipóxia
- HIF-1 α** – *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*, fator induzível por hipóxia alfa
- HPRT1** – *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*, hipoxantina fosforribosiltransferase 1
- HUVEC** – *Human umbilical vein endothelial cells*, células endoteliais de veia umbilical humana
- JC-1** – 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, iodeto de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
- MET** – *Metformin hydrochloride*, cloridrato de metformina
- mtROS** – *Mitochondrial reactive oxygen species*, espécies reativas de oxigênio mitocondriais
- MTT** – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- NO** – *Nitric oxide*, óxido nítrico
- Nrf2** – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, fator nuclear relacionado ao eritroide 2
- PE** – Pré-eclâmpsia
- PEP** – Pré-eclâmpsia precoce
- PET** – Pré-eclâmpsia tardia

PIGF – *Placental growth factor*, fator de crescimento placentário

qPCR – *Quantitative polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA – *Ribonucleic Acid*, ácido ribonucleico

RPLP0 – *Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*, proteína ribossomal P0

ROS – *Reactive oxygen species*, espécies reativas de oxigênio

sENG – *Soluble endoglin*, endoglina solúvel

sFlt-1 – *Soluble fms-like tyrosine kinase-1*, tirosina quinase-1 semelhante a fms solúvel

SOP – Síndrome dos ovários policísticos

TGF-β - *Transforming Growth Factor beta*, fator de crescimento transformador beta

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1 – *Vascular endothelial growth factor receptor 1*, receptor 1 do fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 – *Vascular endothelial growth factor receptor 2*, receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

Sumário

1	Introdução	14
1.1	Pré-eclâmpsia	14
1.2	Desbalanço angiogênico e estresse oxidativo na fisiopatologia da PE	16
1.3	Prevenção e tratamento	17
1.4	Metformina	17
2	Objetivos	19
2.1	Geral	19
2.2	Específicos	19
2.2.1	Angiogênese e disfunção endotelial	19
2.2.2	Estresse oxidativo e função mitocondrial	19
3	Metodologia	20
3.1	População de Estudo	20
3.2	Cultivo Celular	21
3.3	Ensaio de Viabilidade e Citotoxicidade	21
3.4	Citometria de fluxo	22
3.5	Ensaio imunoenzimático	23
3.6	Ensaio de <i>Wound Healing</i>	23
3.7	Ensaio de <i>Transwell</i>	24
3.8	Estado de estresse oxidativo	24
3.8.1	Detecção de ROS	24
3.8.2	Capacidade antioxidante	25
3.8.3	Superóxido mitocondrial	25
3.9	Potencial de membrana mitocondrial	26
3.10	Análise de expressão gênica por PCR em tempo real	26
3.11	Análise Estatística	27
4	Resultados	27
4.1	Parâmetros Clínicos da População de Estudo	27
4.2	Efeitos da MET na Viabilidade e Citotoxicidade celular	29
4.3	Efeitos da MET sobre fatores antiangiogênicos, angiogênicos e seus receptores	29
4.4	Efeitos da MET na migração celular	33
4.4.1	Ensaio de <i>Wound Healing</i>	33
4.4.2	Ensaio de <i>Transwell</i>	34
4.5	Efeitos da MET sobre a produção de ROS e capacidade antioxidante	35
4.6	Efeitos da MET no potencial de membrana e produção de mtROS	36
5	Discussão	38
6	Referências	45
7	Anexos	54

1 Introdução

1.1 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade materno-fetal, acometendo de 2 a 8% das gestações em todo o mundo segundo o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG, 2020). No Brasil, a PE é responsável por 8,1% a 22% das mortes obstétricas em regiões de alta e baixa renda respectivamente (Giordano et al., 2014; Ramos; Sass; Costa, 2017). Clinicamente, a PE é caracterizada por hipertensão arterial associada à proteinúria a partir da 20ª semana de gestação ou nos primeiros dias pós-parto. Entretanto, na ausência de proteinúria, o diagnóstico pode ser estabelecido pela presença de disfunção de órgãos-alvo, incluindo insuficiência renal, alterações hepáticas, complicações neurológicas e/ou hematológicas, além de disfunção uteroplacentária ou restrição de crescimento fetal (Mol et al., 2016; Tranquilli et al., 2014).

Além disso, o boletim prático promovido pelo ACOG (2020) também estabeleceu fatores de risco alto, moderado e baixo que estão atrelados ao desenvolvimento da PE. Dentre os fatores de risco altos estão: histórico de PE, gestação múltipla, hipertensão crônica, diabetes tipo 1 ou 2, doença renal e doenças autoimunes. Em seguida, os fatores de risco moderado são: nuliparidade, obesidade, histórico familiar de PE, características sociodemográficas, idade maior ou igual a 35 anos e fatores de histórico pessoal. Por último, o fator de risco baixo é composto por: parto a termo anterior sem complicações.

O estado da arte sobre a fisiopatologia da PE tem ampliado a compreensão sobre as principais causas dessa síndrome e uma das teorias subjacentes é o modelo de dois estágios, representado na figura 1.

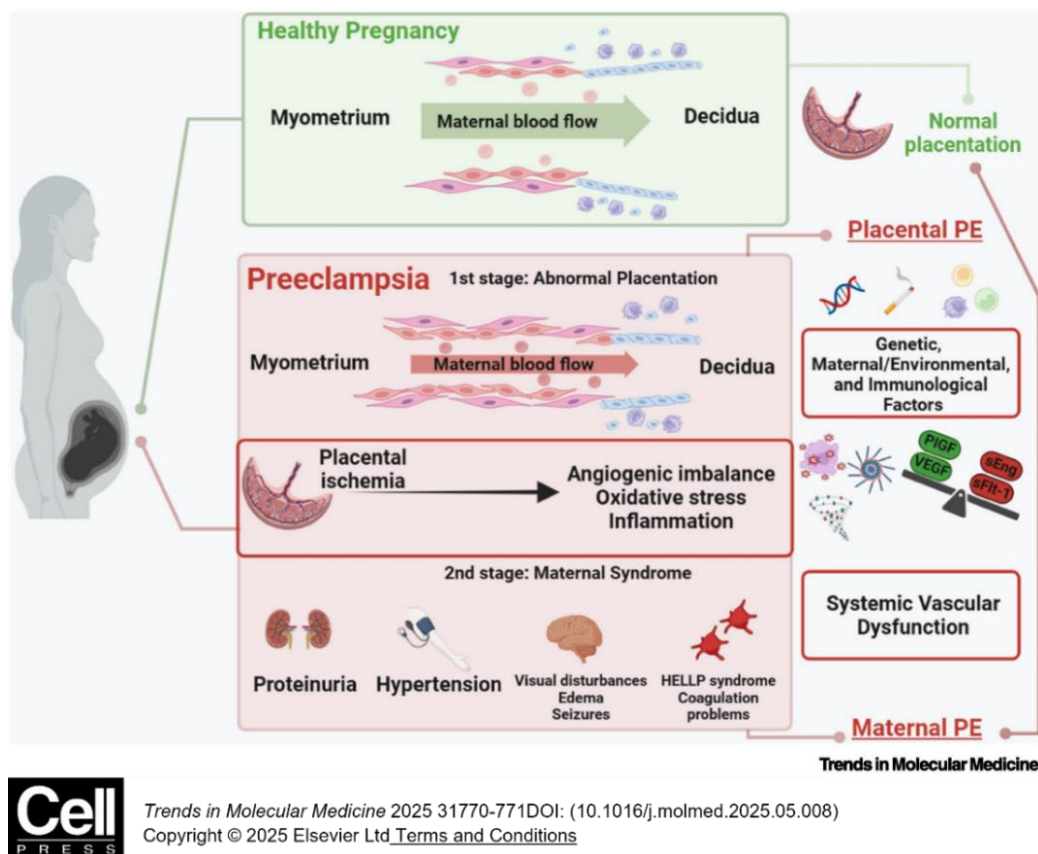


Figura 1 Gestação Saudável e Modelo PE de dois estágios. Reproduzido de NUNES, Priscila R.; PALEI, Ana C. T.; SANDRIM, Valeria C. Understanding preeclampsia: from phenotypes to treatment. Trends in Molecular Medicine, v. 31, n. 8, p. 770–771, 1 ago. 2025.

O primeiro estágio, chamado de placentário, associado 12% de todos os casos de PE (Erez et al., 2022), resulta de invasão trofoblástica deficiente, que leva à má perfusão e à isquemia placentária. Essa condição promove a liberação de fatores angiogênicos, inflamatórios e oxidativos (Burton et al., 2019; George; Granger, 2011). Em sequência, o segundo estágio é materno e representa 88% de todos os casos de PE (Erez et al., 2022), caracterizado por disfunção endotelial, hipertensão e inflamação (Redman; Sargent, 2005; Tamás et al., 2022). Vale ressaltar que múltiplos fatores ambientais e genéticos influenciam ambos os estágios e a gravidade da PE (Roberts et al., 2021), sendo que, em cada gestante afetada, esses estágios ocorrem em graus distintos e individuais. Dito isso, a PE pode ser classificada em dois subtipos: pré-eclâmpsia precoce (PEP), quando a síndrome se manifesta antes da 34ª semana de gestação; e pré-eclâmpsia tardia (PET), quando a manifestação a partir da 34ª semana (FIGO, 2016).

1.2 Desbalanço angiogênico e estresse oxidativo na fisiopatologia da PE

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos já existentes (Flamme; Frölich; Risau, 1997) que envolve diversas etapas, como aumento da permeabilidade, migração celular e formação de tubos. (Milkiewicz et al., 2006). Na PE, a liberação de fatores antiangiogênicos pela placenta, como sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosine kinase-1*) e sENG (*soluble endoglin*), na circulação materna ocasiona lesão endotelial. Essas moléculas atuam como sequestradores do PlGF (*Placental Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*), impedindo sua ligação aos receptores de membrana e inibindo a formação de novos vasos sanguíneos, resultando em desequilíbrio angiogênico significativo e disfunção endotelial sistêmica (Dymara-Konopka; Laskowska; Błażewicz, 2018; Levine et al., 2004; Maynard et al., 2003).

Dados da literatura mostram que níveis excessivos de sFlt-1 em gestantes com PE podem causar disfunção endotelial, hipertensão e proteinúria, ao sequestrar o VEGF e o PlGF circulantes (Maynard et al., 2003; Sandrim et al., 2008). De forma semelhante, estudos indicam que níveis elevados de sENG se correlacionam com a gravidade da doença, redução da formação de tubos capilares *in vitro* e aumento da permeabilidade vascular e hipertensão *in vivo*, podendo atuar em conjunto com o sFlt-1 em formas graves de PE (Venkatesha et al., 2006). Além disso, os fatores angiogênicos PlGF, VEGF e TGF- β estimulam a produção de NO (*Nitric Oxide*), um importante vasodilatador com múltiplas funções endoteliais (Levine et al., 2004; Toporsian et al., 2005; Venkatesha et al., 2006). Nesse contexto, dados do nosso grupo mostraram que HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) incubadas com plasma de gestantes com PE apresentaram níveis reduzidos de NO comparado àquelas tratadas com plasma do grupo saudável (Bertozzi-Matheus et al., 2024; Bueno-Pereira et al., 2022a, 2022b). De forma consistente, outro estudo reportou correlação negativa entre sFlt-1 e nitrito, metabólito do NO (Sandrim et al., 2008).

Adicionalmente, o estresse oxidativo desempenha papel relevante em PE (Chiarello et al., 2020), sendo desencadeado principalmente pela hipóxia placentária, uma vez que essa condição promove a atividade HIF-1 α (*Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*), que reprograma o metabolismo da glicose e aumenta a produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*) em especial a de mtROS (*Mitochondrial Reactive Oxygen*

Species), que contribuem para a disfunção endotelial e a progressão da doença (Lee; Chandel; Simon, 2020; Sferruzzi-Perri et al., 2019; Xu et al., 2018).

1.3 Prevenção e tratamento

A prevenção e o tratamento farmacológico da PE continuam sendo grandes desafios na prática clínica. Atualmente, a principal estratégia farmacológica de prevenção é o uso de aspirina em baixa dose, recomendada para gestantes com fatores de risco específicos (ACOG, 2020; Henderson et al., 2014). Em relação ao manejo farmacológico, os anti-hipertensivos permanecem como o pilar do tratamento, sendo metildopa, labetalol e nifedipino os mais utilizados mundialmente conforme diretrizes da ACOG (2020) e revisado por Sharma (2024) e colaboradores. Contudo, cerca de 40% das pacientes não respondem adequadamente ao tratamento anti-hipertensivo (Luizon et al., 2016; Sandrim et al., 2010). Além disso, a PE não se limita ao período gestacional, e suas complicações podem persistir no período pós-parto. Evidências indicam que mulheres com histórico de PE apresentam maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares no futuro (Bellamy et al., 2007).

1.4 Metformina

Considerando as limitadas opções de tratamento, a ausência de uma resolução definitiva para a PE e que cerca de 40% das pacientes não respondem adequadamente às terapias anti-hipertensivas, torna-se essencial aprofundar a investigação de novas estratégias terapêuticas, especialmente aquelas que possam ser combinadas em abordagens multifatoriais capazes de atuar sobre diferentes vias envolvidas na fisiopatologia da PE.

Nesse contexto, a metformina (MET), apresenta-se como uma opção promissora, no tratamento da PE e demais distúrbios hipertensivos da gestação por suas ações antiinflamatórias, antioxidantes, na promoção da síntese de NO e na manutenção da integridade vascular. (Poniedziałek-Czajkowska et al., 2021; Romero et al., 2017).

A MET pertence à classe das biguanidas e é amplamente empregada no tratamento de diabetes tipo 2 e da diabetes gestacional, sendo classificada como nível B de segurança na gestação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) ("Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020", [S.d.]). Segundo a bula do Glifage® (Merck, 2025), suas doses variam entre 500mg, 850mg e 1g. Dependendo

da posologia a MET atinge equilíbrio estacionário entre 24 e 48h, com concentrações plasmáticas inferiores a 1µg/mL e níveis máximos não excedem 5 µg/mL. Além disso, a MET não se associa às proteínas plasmáticas favorecendo sua distribuição e excreção.

Dentre os mecanismos de ação da MET, destacam-se aqueles com ação mitocondrial, onde o fármaco inibe o complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons (ETC), o que reduz a oxidação do NADH e a síntese de ATP. Esse efeito promove a ativação da adenosina monofosfato quinase (AMPK) que resulta em redução da produção hepática de glicose e aumento do consumo muscular da glicose (El-Mir et al., 2000; Oliveras-Ferraro; Vazquez-Martin; Menendez, 2009; Zhou et al., 2001). Estudos mostraram que a ativação da via AMPK também exerce papel relevante sobre o sistema cardiovascular, reduzindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio além de seu envolvimento na capacidade antioxidante e produção de NO (Scheen; Esser; Paquot, 2015; Yu et al., 2016).

Além disso, Brownfoot (2016) e colaboradores destacaram a capacidade da MET em reduzir de forma dose-dependente os níveis circulantes de sFlt-1 e sENG em células endoteliais, citotrofoblastos e explantes placentários de PE. O grupo relatou que esse feito foi observado pela capacidade do fármaco em inibir o complexo I da ETC. Outro estudo feito por Yu (2016) e colaboradores, demonstraram que a MET melhora as funções angiogênicas em células progenitoras endoteliais de camundongos diabéticos por meio da ativação da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) via AMPK/eNOS. Essa ativação levou ao aumento da fosforilação da eNOS e da produção de NO, resultando em maior migração, formação de tubos e capacidade de reparo vascular. Os autores ainda observaram que a inibição da AMPK aboliu esses efeitos, confirmando a dependência da via AMPK/NO para a ação pró-angiogênica da MET. Ambos os estudos mostraram que a MET foi eficaz em atenuar os fatores antiangiogênicos e a disfunção endotelial.

Apesar do crescente reposicionamento da MET em outros cenários, ainda são escassos os estudos clínicos que avaliaram seu papel na PE. Na literatura, trabalhos que investigaram os efeitos da MET em gestantes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) sugerem que seu uso pode reduzir a incidência de complicações gestacionais, entre elas a PE, frequentemente relatada como achado secundário

(Brand; Gottwald-Hostalek; Andag-Silva, 2025; De Leo et al., 2011; Saadati et al., 2025; Zeng et al., 2016).

Por essas razões, o presente estudo buscou compreender melhor os efeitos da MET sobre a angiogênese, além de avaliar sua ação na disfunção endotelial e no estresse oxidativo na fisiopatologia da PE. A hipótese é que a MET diminua a expressão de sFlt-1 e sENG, melhore os processos angiogênicos como migração e diminua marcadores de estresse oxidativo.

6 Referências

BELLAMY, Leanne *et al.* Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 335, n. 7627, p. 974, 8 nov. 2007.

BERTOZZI-MATHEUS, Mariana *et al.* EGCG, a Green Tea Compound, Increases NO Production and Has Antioxidant Action in a Static and Shear Stress In Vitro Model of Preeclampsia. **Antioxidants**, v. 13, n. 2, 2024.

BRAND, Kerstin M G; GOTTWALD-HOSTALEK, Ulrike; ANDAG-SILVA, Aimee. Update on the therapeutic role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome: Effects on pathophysiologic process and fertility outcomes. **Women's Health**, v. 21, p. 17455057241311760, 3 fev. 2025.

BROWNFOOT, Fiona C. *et al.* Metformin as a prevention and treatment for preeclampsia: Effects on soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin secretion and endothelial dysfunction. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 214, n. 3, p. 356.e1-356.e15, 1 mar. 2016.

BUENO-PEREIRA, Thaina Omia *et al.* Nebivolol Increases Nitric Oxide Synthase via β_3 Adrenergic Receptor in Endothelial Cells Following Exposure to Plasma from Preeclamptic Patients. **Cells**, v. 11, n. 5, 2022a.

BUENO-PEREIRA, Thaina Omia *et al.* Markers of Endothelial Dysfunction Are Attenuated by Resveratrol in Preeclampsia. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, 2022b.

BURTON, Graham J. *et al.* Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. **BMJ**, v. 366, p. l2381, 15 jul. 2019.

CHAIWORAPONGSA, Tinnakorn *et al.* Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia: Young Investigator Award. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 190, n. 6, p. 1541–1547, 1 jun. 2004.

CHAIWORAPONGSA, Tinnakorn *et al.* Plasma soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 concentration is elevated prior to the clinical diagnosis of pre-eclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 3–18, 1 jan. 2005.

CHIARELLO, Delia I. *et al.* Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 2, p. 165354, 2020.

DE LEO, V. *et al.* The administration of metformin during pregnancy reduces polycystic ovary syndrome related gestational complications. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 157, n. 1, p. 63–66, 1 jul. 2011.

DEER, Evangeline *et al.* The Role of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Women's Reproductive Disorders: Implications for Polycystic Ovary Syndrome and Preeclampsia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 13, 2025.

Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020. [S.d.].

DYMARA-KONOPKA, Weronika; LASKOWSKA, Marzena; BŁAŻEWICZ, Anna. Angiogenic Imbalance as a Contributor of Preeclampsia. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 797–815, 26 set. 2018.

EL-MIR, Mohamad-Yehia *et al.* Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 223–228, 2000.

EREZ, Offer *et al.* Preeclampsia and eclampsia: the conceptual evolution of a syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 226, n. 2, Supplement, p. S786–S803, 2022.

ESPINOZA, Jimmy *et al.* **ACOG PRACTICE BULLETIN Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists**. [S.l.: S.n.].

FERRARA, Napoleone. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 1 ago. 2004.

FIGO. **The FIGO textbook of pregnancy hypertension : an evidence-based guide to monitoring, prevention and management**. [S.l.]: Global Library of Women's Medicine, 2016.

FLAMME, Ingo; FRÖLICH, Thomas; RISAU, Werner. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *In*: nov. 1997.

GEORGE, Eric M.; GRANGER, Joey P. Mechanisms and Potential Therapies for Preeclampsia. **Current Hypertension Reports**, v. 13, n. 4, p. 269–275, 2011.

GIORDANO, Juliana C. *et al.* The Burden of Eclampsia: Results from a Multicenter Study on Surveillance of Severe Maternal Morbidity in Brazil. **PLOS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97401-, 13 maio 2014.

GLIFAGE® CLORIDRATO DE METFORMINA: Comprimidos revestidos. Responsável: Merck S.A. de C.V. Rio de Janeiro: Merck S.A. de C.V., 2025. Bula para o profissional de saúde. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=Glifage>. Acesso em: 17 out. 2025.

GRANGER, Joey P. *et al.* Pathophysiology of Hypertension During Preeclampsia Linking Placental Ischemia With Endothelial Dysfunction. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 718–722, 1 set. 2001.

GYNECOLOGISTS, American College of Obstetricians and. Gestational hypertension and preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, number 222. **Obstet Gynecol**, v. 135, n. 6, p. e237–e260, 2020.

HARSEM, Nina K.; BRAEKKE, Kristin; STAFF, Anne Cathrine. Augmented oxidative stress as well as antioxidant capacity in maternal circulation in preeclampsia. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 128, n. 1, p. 209–215, 1 set. 2006.

HENDERSON, Jillian T. *et al.* Low-Dose Aspirin for Prevention of Morbidity and Mortality From Preeclampsia: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of Internal Medicine**, v. 160, n. 10, p. 695–703, 20 maio 2014.

JONKMAN, James E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440–451, 3 set. 2014.

LEE, Pearl; CHANDEL, Navdeep S.; SIMON, M. Celeste. Cellular adaptation to hypoxia through hypoxia inducible factors and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 5, p. 268–283, 2020.

LEVINE, Richard J. *et al.* Circulating Angiogenic Factors and the Risk of Preeclampsia. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 7, p. 672–683, 2004.

LEVINE, Richard J. *et al.* Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 10, p. 992–1005, 7 set. 2006.

LUIZON, Marcelo R. *et al.* Antihypertensive Therapy in Pre-Eclampsia: Effects of Plasma from Nonresponsive Patients on Endothelial Gene Expression. **Pharmacogenomics**, v. 17, n. 10, p. 1121–1127, 1 jul. 2016.

MARÍN, Reinaldo *et al.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in early-onset and late-onset preeclampsia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 12, p. 165961, 2020.

MAYNARD, Sharon E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 649–658, 1 mar. 2003.

MAYNARD, Sharon; EPSTEIN, Franklin H.; KARUMANCHI, S. Ananth. **Preeclampsia and angiogenic imbalance**. **Annual Review of Medicine**, 2008.

MILKIEWICZ, Malgorzata *et al.* **Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation**. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, mar. 2006.

MOL, Ben W. J. *et al.* Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 999–1011, 2016.

NUNES, Priscila R.; PALEI, Ana C. T.; SANDRIM, Valeria C. Understanding preeclampsia: from phenotypes to treatment. **Trends in Molecular Medicine**, v. 31, n. 8, p. 770–771, 1 ago. 2025.

NUNES, Priscila Rezeck *et al.* Glibenclamide Increases Nitric Oxide Levels and Decreases Oxidative Stress in an In Vitro Model of Preeclampsia. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, 2022.

OLIVERAS-FERRAROS, Cristina; VAZQUEZ-MARTIN, Alejandro; MENENDEZ, Javier A. Genome-wide inhibitory impact of the AMPK activator metformin on [kinesins, tubulins, histones, auroras and polo-like kinases] M-phase cell cycle genes in human breast cancer cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 10, p. 1633–1636, 15 maio 2009.

ONKEN, Brian; DRISCOLL, Monica. Metformin Induces a Dietary Restriction–Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLOS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8758–, 18 jan. 2010.

PONIEDZIAŁEK-CZAJKOWSKA, Elżbieta *et al.* Prevention of Hypertensive Disorders of Pregnancy—Is There a Place for Metformin? **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 13, p. 2805, 2021.

POTTECHER, Julien *et al.* In Vitro Plasma-Induced Endothelial Oxidative Stress and Circulating Markers of Endothelial Dysfunction in Preeclampsia: An Observational Study. **Hypertension in Pregnancy**, v. 28, n. 2, p. 212–223, 1 jan. 2009.

RAMOS, José Geraldo Lopes; SASS, Nelson;; COSTA, Sérgio Hofmeister Martins. **Pré-eclâmpsia nos seus diversos aspectos. Série Orientações e Recomendações FEBRASGO.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <https://www.febRASGO.org.br/media/k2/attachments/12-PRE_ECLAYMPSIA.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2025.

REDMAN, Christopher W.; SARGENT, Ian L. Latest Advances in Understanding Preeclampsia. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1592–1594, 2005.

ROBERTS, James M. *et al.* Subtypes of Preeclampsia: Recognition and Determining Clinical Usefulness. **Hypertension**, v. 77, n. 5, p. 1430–1441, 1 maio 2021.

ROMERO, Roberto *et al.* Metformin, the aspirin of the 21st century: its role in gestational diabetes mellitus, prevention of preeclampsia and cancer, and the promotion of longevity. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 217, n. 3, p. 282–302, 2017.

SAADATI, Saeede *et al.* Metformin use in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): Opportunities, benefits, and clinical challenges. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 27, n. S3, p. 31–47, 1 jun. 2025.

SANDRIM, V. C. *et al.* eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 10, n. 1, p. 40–45, 2010.

SANDRIM, Valeria C. *et al.* Nitric oxide formation is inversely related to serum levels of antiangiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase-1 and soluble endogline in preeclampsia. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 402–407, 2008.

SCHEEN, A. J.; ESSER, N.; PAQUOT, N. Antidiabetic agents: Potential anti-inflammatory activity beyond glucose control. **Diabetes & Metabolism**, v. 41, n. 3, p. 183–194, 2015.

SCHRÖDER-HEURICH, Bianca *et al.* The Role of Centrosome Misorientation and miR-1270 in Impaired Endothelial Cell Migration in Preeclampsia. **The FASEB Journal**, v. 39, n. 18, p. e71043, 30 set. 2025.

SFERRUZZI-PERRI, Amanda N. *et al.* Placental mitochondria adapt developmentally and in response to hypoxia to support fetal growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 5, p. 1621–1626, 29 jan. 2019.

SHARMA, Dhruvikumari D. *et al.* The Management of Preeclampsia: A Comprehensive Review of Current Practices and Future Directions. **Cureus**, v. 16, n. 1, p. e51512, 2024.

SHIBUYA, Masabumi. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1097–1105, 3 out. 2011.

SHIN, Hyun-Soo *et al.* Metformin ameliorates the Phenotype Transition of Peritoneal Mesothelial Cells and Peritoneal Fibrosis via a modulation of Oxidative Stress. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5690, 2017.

TAMÁS, Péter *et al.* Preeclampsia subtypes: Clinical aspects regarding pathogenesis, signs, and management with special attention to diuretic administration. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 274, p. 175–181, 1 jul. 2022.

TOPORSIAN, Mourad *et al.* A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Circulation Research**, v. 96, n. 6, p. 684–692, 1 abr. 2005.

TRANQUILLI, A. L. *et al.* The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. **Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health**, v. 4, n. 2, p. 97–104, 2014.

VENKATESHA, Shivalingappa *et al.* Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 642–649, jun. 2006.

VIANA-MATTIOLI, Sarah *et al.* SIRT1-dependent effects of resveratrol and grape juice in an in vitro model of preeclampsia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 110659, 2020.

VIRTANEN, Anita *et al.* Therapeutic doses of metformin do not have impact on angiogenesis in presence of sera from pre-eclamptic, IUGR and healthy pregnancies. **Pregnancy Hypertension**, v. 22, p. 7–13, 2020.

WANG, Xinrong *et al.* Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. Volume 8-2020, 2020.

XU, Zhongwei *et al.* Proteomics Analysis Reveals Abnormal Electron Transport and Excessive Oxidative Stress Cause Mitochondrial Dysfunction in Placental Tissues of Early-Onset Preeclampsia. **PROTEOMICS – Clinical Applications**, v. 12, n. 5, p. 1700165, 1 set. 2018.

YU, Jia-Wen *et al.* Metformin improves the angiogenic functions of endothelial progenitor cells via activating AMPK/eNOS pathway in diabetic mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, n. 1, p. 88, 2016.

ZENG, Xian-Ling *et al.* Effects of metformin on pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: A meta-analysis. **Medicine**, v. 95, n. 36, 2016.

ZHOU, Gaochao *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 15 out. 2001.

ZOROV, Dmitry B.; JUHASZOVA, Magdalena; SOLLITT, Steven J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 909–950, 1 jul. 2014.